

UCH-FC
Biotecnología
S 613
C-1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

“Ingeniería de la biosíntesis de carotenoides en zanahoria (*Daucus carota*) mediante la expresión de genes involucrados en la síntesis de sus precursores metabólicos.”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Kevin Matías Simpson Alfaro

Director del Seminario de Título

Dra. Claudia Stange K.

Agosto 2013

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **SR. KEVIN MATÍAS SIMPSON ALFARO** “**Ingeniería de la biosíntesis de carotenoides en zanahoria (*Daucus carota*) mediante la expresión de genes involucrados en la síntesis de sus precursores metabólicos**” ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Claudia Stange
Directora Seminario de Título

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser 'Claudia Stange', sobre una línea horizontal.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Marcelo Baeza
Presidente Comisión



Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser 'Marcelo Baeza', sobre una línea horizontal.

Dra. Liliana Cardemil
Evaluador

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser 'Liliana Cardemil', sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Octubre de 2013



A mi Tata, mi Lela y mi Abuelita, por todo el amor y cariño que permanecerá por siempre.



Vine a nacer a finales del invierno de 1988, justo un día después de que mi padre lo hiciera unos 30 años antes. Toda mi vida la he vivido en Santiago, en la misma casa que mi Tata y mi padre construyeron. Desde pequeño he estado rodeado del cariño de mis abuelos y mis padres, cariño que me ha sido fundamental para alcanzar todas las metas que me he propuesto.

A pesar de que mi primer amor fueron los dinosaurios y la paleontología (amor que aún espero algún día re-encontrar), desde pequeño manifesté un interés innato por las ciencias, jugando con un microscopio de juguete que me regalaron en el colegio, investigando el comportamiento de los insectos de mi jardín (sin mencionar las veces que muchos fueron sacrificados para saciar mi curiosidad) o fascinarme con todas las cosas que aprendía en las clases de ciencias naturales.

Cuando entré Instituto Nacional, tenía en mente la idea de convertirme en médico, tal vez porque hasta ese entonces era la única carrera que conocía en la que se utilizaba las ciencias naturales. Sin embargo, a medida que avanzaban los años en el Instituto, me fui dando cuenta de mi verdadero amor por las ciencias. Al principio fueron las tres, física, química y biología. Sin embargo, cuando conocí la biología molecular y la genética fue como si una explosión se desatara en mi cabeza, e inmediatamente comprendí lo que quería hacer con mi vida. Así fue como poco tiempo después conocí la carrera de Biotecnología, y desde entonces no ha habido un solo día en el que sienta que el camino que he elegido es el equivocado.

AGRADECIMIENTOS



En primer lugar agradecer a la profesora Claudia Stange, que desde el primer momento me ayudó sin dudarlo, cuando estaba en segundo año de universidad y me acerqué a ella para pedir su guía en mi monografía de bachillerato. Muchas gracias por la confianza y el cariño que siempre ha demostrado hacia mí.

Gracias a todas las personas que forman o formaron parte de mi equipo de trabajo CSK, por toda la ayuda y el know-how entregado durante este tiempo que he pasado en el laboratorio. Es especial agradecer a Charlie, Caro, Luisfe y Talo. Gracias a todos por aportar en mi desarrollo personal y sobre todo científico.

Gracias a mis compañeros de laboratorio y compañeros de universidad, por entregarme su conocimiento y amistad cuando lo necesité. En especial gracias Chantal, Kaky, Panchi y Andrés.

Gracias a las personas que hacen posible que todo siempre funcione como debería ser, o al menos lo más parecido a cómo debería. Gracias Seba, Ange, Profe Mike, Profe Lili, Profe Lore.

Gracias a mis amigos de la vida. Gracias por todos los buenos momentos, por la compañía, por los consejos, por el cariño y por la sensación de saber que siempre puedo contar con ustedes, aunque muchos ya no estén tan cerca como quisiera. Gracias Astur, Geno, Mora, Fabián, Javier, Javi, Guille, Pancho y Ariel.

Gracias a mi Abuelita, por todo el amor y cariño que dejaste en mí, a pesar del poco tiempo que estuvimos juntos. Gracias a mi Tata, por... por todo, no hay palabras que puedan describir lo que todo lo que hiciste por mí. Espero que desde algún lugar me estés viendo y que te sientas orgulloso de mí. Gracias a mi Lela, por ser mi segunda madre, por el amor, la preocupación y todo el tiempo que dedicas en mí.

A mi padre, por todo el amor y esfuerzo, por la preocupación y protección. Simplemente gracias por ser mi héroe, por ser el hombre que me gustaría llegar a ser algún día. A mi madre, por el amor, el apoyo, los consejos, los retos y sobre todo por aguantarme. Gracias por siempre empujarme a ser una mejor persona. Gracias a ambos, porque sin ustedes jamás hubiese llegado tan lejos.

A mi Amor, por todos estos años de amor incondicional, por los buenos y no tan buenos momentos, porque desde que estamos juntos nunca me ha faltado tu compañía. Gracias por amarme tanto. Porque a pesar de todo, haces que te amé como la primera vez que te vi.

Índice de Contenidos

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	4
1.1 Carotenoides: Estructura y función.....	4
1.2 Biosíntesis de los carotenoides.....	6
1.3 Precursores metabólicos de los carotenoides.....	8
1.4 La ruta del metileritritol fosfato (MEP).....	9
1.5 <i>Daucus carota</i> como modelo de estudio	11
1.6 Estrategia a utilizar	14
1.7 Hipótesis.....	15
1.8 Objetivo general	15
1.9 Objetivos específicos.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1 Cultivo de cepas bacterianas	16
2.2 Preparación de células quimiocompetentes	17
2.2.1 Preparación de <i>E. coli</i> quimiocompetente	17
2.2.2 Preparación de <i>A. tumefaciens</i> quimiocompetente.....	17
2.3 Transformación de células bacterianas quimiocompetentes	18
2.3.1 Transformación de <i>E. coli</i> quimiocompetentes	18
2.3.2 Transformación de <i>A. tumefaciens</i> quimiocompetentes	18
2.4 Extracción de ADN plasmidial a partir de células de <i>E. coli</i>	19
2.5 Digestiones enzimáticas.....	19
2.6 Diseño de partidores	19
2.7 Electroforesis en geles de agarosa	19
2.8 Purificación de bandas desde geles de agarosa	21
2.9 Reacción en cadena de la polimerasa PCR	21
2.9.1 PCR convencional.....	21
2.9.2 PCR convencional con enzima <i>Pfu</i> ADN polimerasa	22
2.9.3 PCR de colonias	22
2.9.4 RT-PCR.....	23

2.9.5 PCR cuantitativo en Tiempo Real (qRT)	24
2.9.6 RT-PCR semicuantitativo.....	25
2.10 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Daucus carota</i>	25
2.11 Transformación estable de explantes de <i>Daucus carota</i>	26
2.12 Transformación transitoria de hojas de <i>Nicotiana tabacum</i>	28
2.13 Vectores para la expresión constitutiva en <i>D. carota</i> de los genes <i>DXR</i> y <i>DXS</i> de <i>A. thaliana</i>	28
2.14 Generación de las construcciones pPSY2-DXR y pPSY2-DXS	29
2.14.1 Obtención de los genes <i>DXR</i> y <i>DXS</i> de <i>A. thaliana</i> y del promotor de <i>PSY2</i> de <i>D. carota</i>	29
2.14.2 Clonación de los fragmentos <i>DXR</i> , <i>DXS</i> y pPSY2 en el vector pCR8.....	30
2.14.3 Ligación de los genes <i>DXS</i> y <i>DXR</i> al vector pCR8-pPSY2	31
2.14.4 Clonación de las construcciones pPSY2-DXR y pPSY2-DXS al vector de destinación pMDC107: Recombinación mediante tecnología Gateway.....	32
2.15 Extracción de ARN a partir de tejido vegetal.....	34
2.16 Extracción de ADN a partir de tejido vegetal	35
2.17 Microscopía.....	36
2.18 Extracción de pigmentos.....	36
2.19 Cuantificación de clorofilas y carotenoides totales	36
2.20 Cromatografía líquida de alta eficiencia (High-performance liquid chromatography HPLC).....	38
2.21 Determinación de la concentración del perfil de carotenoides.....	38
RESULTADOS	39
3.1 Generación de las construcciones pPSY2-DXR y pPSY2-DXS	39
3.1.1 Clonación de los genes <i>DXR</i> y <i>DXS</i> de <i>A. thaliana</i> y del promotor de <i>PSY2</i> de <i>D. carota</i>	39
3.1.2 Clonación de los genes <i>DXR</i> y <i>DXS</i> de <i>A. thaliana</i> y el promotor de <i>PSY2</i> en el vector de entrada pCR8	40
3.1.3 Ligación de los genes <i>DXR</i> y <i>DXS</i> en el vector pCR8-pPSY2.....	42
3.1.4 Generación de los vectores de destinación pMDC107-pPSY2::DXR y pMDC107-pPSY2::DXS mediante recombinación Gateway.....	45
3.1.5 Transformación transitoria de <i>N. tabacum</i>	46
3.2 Expresión en <i>D. carota</i> de los genes <i>DXR</i> y <i>DXS</i> de <i>A. thaliana</i> bajo el promotor de la enzima <i>PSY2</i> de <i>D. carota</i>	47

3.2.1 Transformación estable de <i>D. carota</i> con las construcciones pMDC107-pPSY2-DXR y pMDC107-pPSY2-DXS.....	47
3.3 Expresión en <i>D. carota</i> de los genes <i>DXR</i> y <i>DXS</i> de <i>A. thaliana</i> bajo el promotor constitutivo 35SCaMV.....	49
3.3.1 Transformación de células de <i>A. tumefaciens</i> con los vectores 35S-DXR y 35S-DXS..	49
3.3.2 Embriogénesis somática de explantes de <i>D. carota</i> transformados con las construcciones 35S-DXR y 35S-DXS.....	50
3.4 Análisis molecular y bioquímico de la zanahorias regeneradas a partir de la transformación de explantes con las construcciones 35S-DXR y 35S-DXS.....	52
3.4.1 Identificación de las líneas de <i>D. carota</i> portadoras de los genes <i>DXR</i> y <i>DXS</i> de <i>A. thaliana</i>	52
3.4.2 Análisis de la expresión de los genes <i>DXR</i> y <i>DXS</i> de <i>A. thaliana</i> en las líneas transgénicas de <i>D. carota</i>	53
3.4.3 Cuantificación de clorofila y carotenoides totales.....	54
3.4.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia (High-performance liquid chromatography HPLC).....	59
3.4.5 Efecto en la expresión de los genes endógenos <i>PSY1</i> y <i>PSY2</i> en plantas de <i>D. carota</i> transgénicas que expresan <i>DXR</i> y <i>DXS</i> de <i>A. thaliana</i>	63
DISCUSIÓN	66
4.1 Generación de las construcciones pPSY2-DXR y pPSY2-DXS.....	66
4.2 Transformación estable de <i>D. carota</i> con las construcciones pMDC107-pPSY2::DXR y pMDC107-pPSY2::DXS.....	67
4.3 Niveles de clorofila y carotenoides totales de las líneas 35S-DXR y 35S-DXS.....	67
4.4 Perfil de carotenoides de las líneas 35S-DXR y 35S-DXS.....	70
4.5 Efecto en la expresión de los genes endógenos <i>PSY1</i> y <i>PSY2</i>	71
4.6 Relación entre la expresión de <i>DXR</i> y <i>DXS</i> , la expresión de <i>PSY1</i> y <i>PSY2</i> y el contenido de carotenoides.....	73
4.7 Niveles de expresión de los genes <i>DXR</i> y <i>DXS</i> de <i>A. thaliana</i> en zanahorias 35S-DXR y 35S-DXS.....	74
CONCLUSIONES	76
REFERENCIAS	77
ANEXO	80

Índice de Tablas

Tabla I. Partidores utilizados en este trabajo.....	20
Tabla II. Medios de cultivo de plantas de <i>D. carota</i>	27
Tabla III. Tamaño de las bandas esperadas al digerir los vectores pCR8-pPSY2::DXR y pCR8-pPSY2::DXS con diferentes enzimas de restricción.	44
Tabla IV. Niveles promedio de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales en las líneas transgénicas de <i>D. carota</i> DXR y DXS con respecto a las plantas silvestres	58
Tabla V. Perfil de carotenoides presentes en hojas y raíces de las líneas transgénicas de <i>D. carota</i> DXR y DXS con respecto a las plantas silvestres	62
Tabla A. Programas PCR.....	80

Índice de Figuras

Figura 1. Ruta de biosíntesis de carotenoides.	7
Figura 2. Ruta del metileritritol fosfato.....	10
Figura 3. Niveles de carotenoides durante el desarrollo de hojas y raíz en <i>D. carota</i>	12
Figura 4. Expresión relativa de <i>PSY1</i> y <i>PSY2</i> durante el desarrollo de las hojas y la raíz modificada de la zanahoria.	14
Figura 5. Construcciones <i>At.DXRns-pB7FWG2 (35S-DXR)</i> y <i>At.DXSfl-pB7FWG2 (35S-DXS)</i>	29
Figura 6. Vector de destinación <i>pMDC107</i>	33
Figura 7. Espectro de absorción de pigmentos extraídos a partir de hojas de tabaco.	37
Figura 8. Amplificación de los genes <i>DXR</i> y <i>DXS</i> a partir de ADN plasmidial.	39
Figura 9. Amplificación del promotor de <i>PSY2</i> a partir de ADN plasmidial.	40
Figura 10. PCR de colonias <i>pCR8-DXR</i> , <i>pCR8-DXS</i> y <i>pCR8-pPSY2</i>	41
Figura 11. Digestión enzimática de clones <i>pCR8-pPSY2</i> con la enzima <i>XhoI</i>	42
Figura 12. Purificación de las bandas correspondientes a los genes <i>DXR</i> y <i>DXS</i> y al promotor de <i>PSY2</i>	42
Figura 13. PCR direccional realizado a las colonias <i>pCR8-pPSY2::DXR</i> y <i>pCR8-pPSY2::DXS</i>	43
Figura 14. Digestión enzimática realizada a las colonias <i>pCR8-pPSY2::DXR</i> y <i>pCR8-pPSY2::DXS</i>	44
Figura 15. Construcciones <i>pCR8-pPSY2::DXR</i> y <i>pCR8-pPSY2::DXS</i>	45
Figura 16. PCR realizado a las colonias <i>pMDC107-pPSY2::DXR</i> y <i>pMDC107-pPSY2::DXS</i>	46
Figura 17. Expresión transitoria de GFP fusionado a <i>DXR</i> y a <i>DXS</i> en células epidermales de hojas de tabaco.	48
Figura 18. PCR de colonias de <i>A. tumefaciens</i> transformadas con las construcciones <i>35S-DXR</i> y <i>35S-DXS</i>	49
Figura 19. Embriogénesis somática en <i>D. carota</i>	51
Figura 20. Identificación de líneas transgénicas de <i>D. carota</i> para los genes <i>DXR</i> y <i>DXS</i> de <i>A. thaliana</i>	53
Figura 21. Expresión de los genes <i>DXR</i> y <i>DXS</i> de <i>A. thaliana</i> en hojas de zanahorias <i>35S-DXR</i> y <i>35S-DXS</i>	54
Figura 22. Cuantificación de los niveles de clorofila a y clorofila b en hojas de las líneas transgénicas <i>35S-DXR</i> y <i>35S-DXS</i> mediante espectrofotometría.	56
Figura 23. Cuantificación de los niveles de carotenoides totales en hojas y raíces de las líneas transgénicas <i>35S-DXR</i> y <i>35S-DXS</i> mediante espectrofotometría.	57

Figura 24. Promedio de los niveles de pigmentos en hojas y raíces de las líneas transgénicas de <i>D. carota</i> 35S-DXR y 35S-DXS.	58
Figura 25. Composición de carotenoides en las hojas de líneas transgénicas de <i>D. carota</i> 35S-DXR y 35S-DXS.	60
Figura 26. Composición de carotenoides en las raíces de líneas transgénicas de <i>D. carota</i> 35S-DXR y 35S-DXS.	61
Figura 27. Composición promedio de carotenoides presentes en hojas y raíces de líneas transgénicas de <i>D. carota</i> 35S-DXR y 35S-DXS.	62
Figura 28. Efecto de la sobreexpresión de genes de la ruta del MEP en la expresión de genes carotenogénicos en hojas de líneas transgénicas de <i>D. carota</i>	64
Figura 29. Niveles de expresión de los genes DXR y DXS de <i>A. thaliana</i> en las hojas líneas transgénicas de <i>D. carota</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2,4-D : Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- ABA : Ácido Abscísico
- ADN : Ácido desoxirribonucleico
- ADNc : Ácido desoxirribonucleico complementario
- ARN : Ácido ribonucleico
- CTAB : Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- D.O. : Densidad Óptica
- DNasa : Desoxi-ribonucleasa
- dNTP : Desoxinucleótido trifosfato
- DXR : Desoxixilulosa 5-fosfato reductoisomerasa
- DXS : Desoxixilulosa 5-fosfato sintasa
- GFP : Proteína fluorescente verde
- GGPP : Geranigeranil difosfato
- HPLC : Cromatografía líquida de alta resolución
- Kb : Kilobase
- MEP : Metileritritol fosfato
- MS : Murashige y Skoog
- pb : Pares de bases
- PCR : Reacción en cadena de la Polimerasa
- pPSY : Promotor de la enzima fitoeno sintasa
- PSY : Fitoeno sintasa
- qPCR : PCR cuantitativo en tiempo real
- RT : Transcripción Reversa o transcriptasa reversa

RESUMEN

Los carotenoides son compuestos isoprenoides sintetizados por todos los organismos fotosintéticos y por algunos no fotosintéticos. Por su vital importancia para plantas y mamíferos, se ha enfocado el estudio de la regulación de su síntesis en diversos modelos vegetales y bacterianos, con el fin de aumentar su composición en los alimentos. La síntesis de los carotenoides y clorofilas provienen del isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP). En plantas, estos precursores son sintetizados en plastidios en la ruta del metileritritol fosfato (MEP). Se ha descrito en diversos modelos vegetales, como *A. thaliana*, tomate y pimienta, que el aumento en la producción de carotenoides requiere del incremento de precursores sintetizados en la ruta MEP. Específicamente, se ha demostrado que el aumento en la expresión de *DXS* y *DXR*, dos genes claves pertenecientes a la ruta del MEP, genera un aumento en la cantidad de carotenoides, mientras que su disminución produce variegación y reducción en la pigmentación.

Daucus carota es un modelo especialmente interesante debido a que sintetiza α - y β -caroteno en la raíz modificada solo en oscuridad. Si bien se conoce la función de algunos de los genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides, no se ha determinado si la síntesis de carotenoides en este modelo se ve afectada por el flujo de precursores metabólicos sintetizados en la ruta del MEP.

En este Seminario de título, expresamos los genes *DXS* y *DXR* de *A. thaliana* y pudimos evidenciar que el gen *DXS* promueve un mayor aumento en la concentración de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales en las hojas de zanahorias que aquellas que expresan el gen *DXR*. En las raíces de las zanahorias transgénicas la expresión de *DXS* produjo un aumento en el contenido de carotenoides totales y en la expresión de los genes endógenos *PSY1* y *PSY2*.

Finalmente, se generaron construcciones en donde los genes *DXR* y *DXS* se encuentran dirigidos por el promotor de la enzima fitoeno sintasa de *D. carota*, el cual es activo principalmente en etapas tardías del desarrollo de la raíz. La transformación de plantas con estas construcciones permitirá obtener zanahorias que aumenten la expresión de los genes de la ruta del MEP principalmente en la raíz adulta de *D. carota*.

ABSTRACT

Carotenoids are isoprenoid compounds synthesized by all photosynthetic organisms and some non-photosynthetic. Because of its importance to plants and mammals, study of carotenoids has focused on the regulation of its synthesis in various plant and bacterial models in order to increase their composition in food. Carotenoids and chlorophylls derived from isopentenyl diphosphate (IPP) and its isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP). In plants, these precursors are synthesized in the plastidial methylerythritol phosphate (MEP) pathway. It has been reported in diverse plant (*A. thaliana*, tomato, pepper) that the increase in carotenoids production requires the increase of precursors synthesized in the MEP pathway. Specifically, the increase in the expression of *DXR* and *DXS*, genes that belong to the MEP pathway, generates an increased amount in carotenoids, while their down-regulation resulted in variegation and reduced pigmentation.

Daucus carota is a particularly interesting model that synthesizes α - and β -carotene in the modified root only in darkness. Despite knowing the function of some genes of the carotenoids biosynthetic pathway, it has not been determined if the synthesis of carotenoids in carrot is affected by the flow of metabolic precursors synthesized in the MEP pathway.

In this work we expressed in carrots the *DXS* and *DXR* genes of *A. thaliana* under the 35SCaMV promoter and we show that the *DXS* gene promotes a further increase in the concentration of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids than those expressing the *DXR* gene in the leaves of the transgenic carrots. In the roots of these carrots only the expression of *DXS* showed an increase in the total carotenoid content and in the expression of endogenous *PSY1* and *PSY2* genes.

Finally, constructs were generated in which the *DXR* and *DXS* genes are directed by the promoter of the *D. carota* phytoene synthase enzyme, which is mainly active in later stages of root development. Transformation of plants with these constructs will allow to obtain carrots with an increase in the expression of genes in the MEP pathway mainly in the root of adult carrots.

INTRODUCCIÓN

1.1 Carotenoides: Estructura y función

Los carotenoides son un abundante grupo de compuestos isoprenoides que son sintetizados no solo por todos los organismos fotosintéticos, como plantas (incluyendo algas) y cianobacterias, sino que también por algunas bacterias y hongos no fotosintéticos (Lu y Li, 2008). Estas moléculas se forman a partir de la condensación de ocho unidades isoprenoides de cinco carbonos para formar un esqueleto hidrocarbonado de 40 carbonos, el cual contiene hasta 15 doble enlaces conjugados y un grupo lineal o cíclico en cada extremo. Esta estructura es capaz de actuar como un cromóforo al absorber luz y generar color (Giorio y col., 2007; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). La cantidad y la configuración de los dobles enlaces, así como los grupos finales presentes en su estructura, son los responsables de conferir a los carotenoides las distintas características físicas, químicas y biológicas propias de estos compuestos, como la absorción de fotones a diferentes longitudes de onda, colores distintivos de cada carotenoide y una actividad antioxidante. Se han descrito más de 700 carotenoides diferentes, los cuales pueden dividirse en dos grandes grupos: los carotenos, que están compuestos solo por átomos de carbono e hidrógeno, y las xantófilas, que poseen átomos de oxígenos en su estructura (Giorio y col., 2007).

Los carotenoides también han sido reconocidos ampliamente como nutrientes esenciales y compuestos importantes para la salud (Fraser y Bramley, 2004; Krinsky y Johnson, 2005), y debido a que los animales no son capaces de sintetizarlos, estos necesitan incorporarlos en la dieta ya que son precursores de la vitamina A y retinoides (Bollag, 1996). En particular, se ha demostrado que el β -caroteno posee la mayor actividad provitamina A; que el licopeno posee una gran actividad antioxidante y que la luteína y zeaxantina protegen a las células de la mácula de la retina contra el daño

causado por la radiación (Giorio y col., 2007). Debido a que uno de los problemas nutricionales más importantes en varios países es la deficiencia en la dieta de vitamina A, la biofortificación de alimentos con carotenoides tipo pro-vitamina A es una alternativa sustentable para combatirla. Es por ello que la investigación y el desarrollo de la ingeniería metabólica de carotenoides en cultivos de consumo humano se ha vuelto relevante (Lu y Li, 2008).

En plastidios de organismos fotosintéticos los carotenoides funcionan como estabilizadores de membrana, además de actuar como pigmentos cosechadores de luz accesorios durante la fotosíntesis y proveer la coloración roja, naranja y amarilla a órganos no fotosintéticos como raíces, frutos y flores, facilitando la polinización (Grotewold, 2006; Rodriguez-Concepcion, 2010). También protegen a la célula vegetal del daño foto-oxidativo mediante la disipación del exceso de energía lumínica y la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (EROs) a través del ciclo de las xantófilas (Davison y col., 2002).

Adicionalmente, los carotenoides participan en la biosíntesis de reguladores del crecimiento como ácido abscísico (ABA) y estrigolactonas (Botella-Pavía y col., 2004; Pizarro y Stange, 2009). Se ha descrito que el ABA cumple funciones fundamentales en las plantas, actuando en el desarrollo, en mantener la dormancia de las semillas y modular la respuesta a distintos tipos de estrés ambiental, como la sequía, el frío y la salinidad (Barrero y col., 2008; Cutler y col., 2010). Por otro lado, se ha visto que las estrigolactonas se encuentran relacionadas con la interacción planta-microorganismo y en la inhibición de la ramificación de brotes en las plantas (Gomez-Roldan y col., 2008; Umehara y col., 2008).

1.2 Biosíntesis de los carotenoides

En plantas, los carotenoides son sintetizados en los plastidios de las células vegetales por la ruta del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP, ver más adelante) a partir de la condensación de dos moléculas de geranyl geranyl pirofosfato (GGPP). Esta reacción es catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY), y como resultado se genera el caroteno de 40 átomos de carbono, fitoeno (Figura 1) (Giuliano y col., 2008). A continuación, se introducen secuencialmente cuatro insaturaciones y dos isomerizaciones a la molécula incolora de fitoeno. Las desaturaciones son catalizadas por las enzimas fitoeno desaturasa (PDS) y ζ -caroteno desaturasa (ZDS), y conduce a la formación secuencial de fitoflueno, ζ -caroteno (el primer carotenoide de color amarillo), neurosporeno y licopeno, de color rojo (Cunningham y Gantt, 1998). Posteriormente el licopeno, que se encuentra como poli-cis licopeno, es isomerizado por las enzimas ζ -caroteno isomerasa (ZISO) y caroteno isomerasa (CRTISO) para dar origen a all-trans licopeno (Isaacson y col., 2002). (Auldridge y col., 2006; Ruyter-Spira y col., 2013).

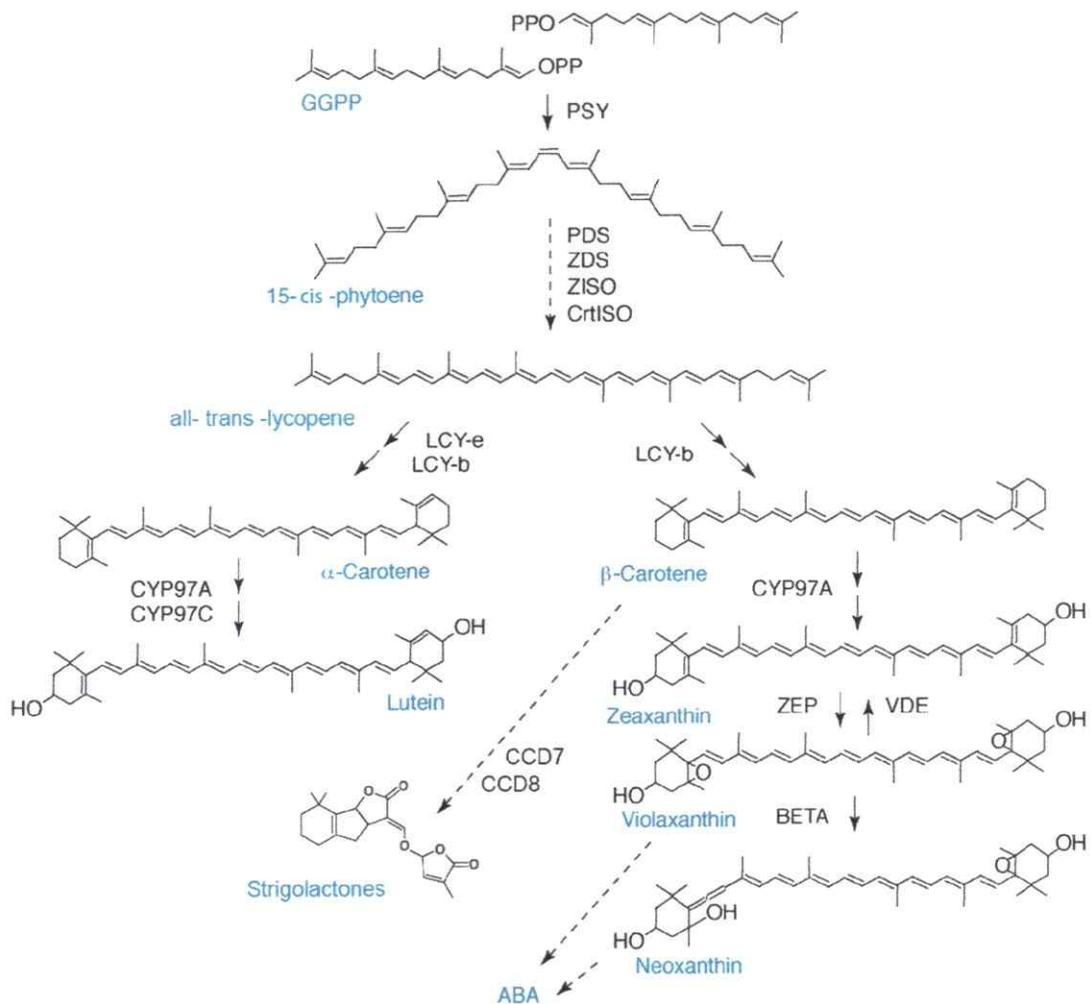


Figura 1. Ruta de biosíntesis de carotenoides. Se ilustra la ruta de síntesis de carotenoides a partir de la condensación de dos moléculas de geranyl-geranyl difosfato (GGPP) hasta la síntesis del ácido abscísico (ABA). El nombre de los compuestos se presenta en azul y el de las enzimas en negro. PSY: fitoeno sintasa; PDS: fitoeno desaturasa; ZDS: ζ-caroteno desaturasa; ZISO: ζ-caroteno isomerasa; CrtISO: caroteno isomerasa; LCY-b: licopeno β-ciclasa; LCY-e: licopeno ε-ciclasa; CYP97A: citocromo P450 caroteno β-hidroxilasa; CYP97C: citocromo P450 caroteno ε-hidroxilasa, VDE: violaxantina de-epoxidasa; ZEP: zeaxantina epoxidasa; BETA: beta ciclasa específica de cromoplastos; CCD7 y CCD8: dioxigenasas de ruptura de carotenoides 7 y 8. Esquema modificado a partir de Giuliano y col. 2008.

A pesar de que ampliamente se sabe que la síntesis de fitoeno a partir de GGPP catalizada por la enzima PSY es un punto clave de regulación en la producción de carotenoides (Welsch y col., 2007; Lu y Li, 2008; Maass y col., 2009; Rodríguez-Villalón y col., 2009), la naturaleza limitante de la actividad de PSY depende en gran medida de la disponibilidad de sus precursores metabólicos, lo cual ha sido

determinado en diversos modelos vegetales, como *A. thaliana* y tomate (*S. lycopersicum*) (Lois y col., 2000; Enfissi y col., 2005; Carretero-Paulet y col., 2006; Rodríguez-Villalon y col., 2009). Por lo tanto, debido a que el suministro de precursores metabólicos es punto clave en la producción de carotenoides, para producir un incremento en los niveles de carotenoides en plantas, es necesario también considerar aumentar el flujo de éstos (Lois y col., 2000; Botella-Pavia y col., 2004; Enfissi y col., 2005; Rodríguez-Concepcion, 2010).

1.3 Precursores metabólicos de los carotenoides

El precursor común de los carotenoides y de todos los isoprenoides es la molécula de 5 átomos de carbono isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP). La adición secuencial de moléculas de IPP a una molécula de DMAPP conduce a la formación de isoprenoides que crecen en complejidad, generándose geranil difosfato (GPP), farnesil difosfato (FPP) y geranigeranil difosfato (GGPP), los cuales son el punto de partida para la biosíntesis de diferentes isoprenoides (Rodríguez-Concepción, 2006). Todas las plantas son capaces de sintetizar isoprenoides que actúan como metabolitos primarios, ya que participan en procesos esenciales como en la respiración, fotosíntesis y en la regulación del crecimiento y desarrollo (Rodríguez-Concepción, 2006).

En plantas superiores existen dos rutas que sintetizan IPP y DMAPP: la ruta del Ácido Mevalónico (AMV), que sintetiza IPP citosólico para la producción de esteroides, brasinoesteroides, sesquiterpenos, poliprenoles y dolicol, además de la biosíntesis de ubiquinona en las mitocondrias (Enfissi y col., 2005); y la ruta del Metileritritol Fosfato (MEP), que sintetiza IPP plastidial para la producción de carotenoides y otros isoprenoides como giberelinas, monoterpenos, isoprenos, tocoferoles, filoquinonas,

plastoquinonas y la cadena lateral de clorofilas (Lange y col., 2000; Rodríguez-Concepción, 2006).

1.4 La ruta del metileritritol fosfato (MEP)

Todas las enzimas de la ruta del MEP son codificadas por genes nucleares y posteriormente destinadas a cloroplastos. El primer paso de esta ruta corresponde a la formación de desoxixilulosa 5-fosfato (DXP) a partir de la condensación de piruvato y gliceraldehído 3-fosfato (GAP), catalizado por la enzima desoxixilulosa 5-fosfato sintasa (DXS) (Figura 2). Posteriormente, se produce un rearrreglo intramolecular y la reducción de DXP por la enzima DXP reductoisomerasa (DXR) para formar metileritritol 4-fosfato (MEP). Luego de la acción secuencial de las enzimas 4-difosfocitidil-metileritritol sintasa (CMS), 4-difosfocitidil-metileritritol quinasa (CMK) y metileritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa (MCS) se produce la conversión de MEP a metileritritol 2,4-ciclodifosfato (ME-cPP), el cual es reducido por la enzima hidroximetilbutenil difosfato (HMBPP) sintasa (HDS) para formar HMBPP. Finalmente, el HMBPP es convertido en una mezcla de IPP y DMAPP por la enzima HMBPP reductasa (HDR) (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002).

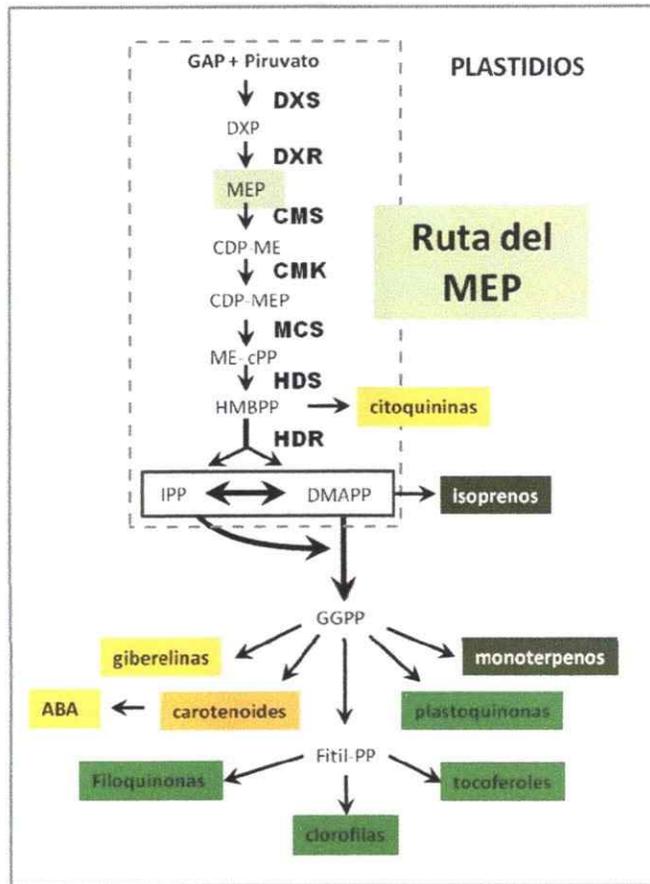


Figura 2. Ruta del metileritritol fosfato. Se ilustra la ruta del MEP. GAP, gliceraldehído 3-fosfato, DXP, desoxixilulosa 5-fosfato; MEP, metileritritol 4-fosfato; CDP-ME, 4-difosfocitidil-metileritritol; CDP-MEP, 4-difosfocitidil-metileritritol 2-phosphate; ME-cPP, metileritritol 2,4-ciclodifosfato; HMBPP, hidroximetilbutenil difosfato; IPP, isopentenil difosfato; DMAPP, dimetilalil difosfato; GGPP, geranylgeranyl difosfato; ABA, ácido abscísico. Las enzimas se indican en negrita: DXS, DXP sintasa; DXR, DXP reductoisomerasa; CMS, CDP-ME sintasa; CMK, CDP-ME quinasa; MCS, ME-cPP sintasa; HDS, HMBPP sintasa; HDR, HMBPP reductasa; GGDS, GGPP sintasa; PSY, fitoeno sintasa. Modificado de Lorenzo Carretero-Paulet (Carretero-Paulet y col., 2006).

Distintos estudios han determinado que DXS, y en menor medida DXR poseen un papel limitante en el control del flujo de la ruta del MEP en plantas (Rodríguez-Concepción, 2010). En este sentido, se ha determinado que plantas de *A. thaliana* que sobreexpresan el gen *DXS* poseen un incremento en los niveles de isoprenoides plastidiales, carotenoides y clorofilas (Estevez y col., 2001); que en tubérculos de papas y frutos de tomate (*S. lycopersicum*) la expresión del gen *DXS* de *E. coli* produce

un incremento en los niveles de carotenoides totales (Erfissi y col., 2005; Morris y col., 2006), y que en distintas variedades de naranja (*C. sinensis*) *DXS*, en conjunto con *PSY*, juegan un papel importante en la acumulación de carotenoides en los sacos de jugo (Fanciullino y col., 2008). Del mismo modo, se ha determinado que la sobreexpresión de *DXR* en plantas de *A. thaliana* produce un incremento en la acumulación de isoprenoides derivados de la ruta del MEP, como lo son las clorofilas y carotenoides (Carretero-Paulet y col., 2006). Por otro lado, también se ha visto que la disminución en la expresión de estos genes produce una reducción general en los niveles de los productos generados a partir de la ruta del MEP, una disminución en la pigmentación, defectos en el desarrollo de los cloroplastos, variegación y albinismo (Estevez y col., 2000; Mahmoud y Croteau, 2001; Carretero-Paulet y col., 2006; Xing y col., 2010). Sin embargo, otros genes que codifican para otras enzimas de la ruta del MEP, como el gen de la hidroximetilbutenil difosfato sintasa (HDS), no poseen esta correlación (Flores-Perez y col., 2008).

1.5 *Daucus carota* como modelo de estudio

Nuestro modelo de estudio, *Daucus carota*, es especialmente interesante debido a que sintetiza principalmente α -y β -caroteno en la raíz modificada solo en condiciones de oscuridad (Stange y col., 2008). Las raíces jóvenes de las zanahorias crecidas en oscuridad son de un color pálido y comienzan a acumular carotenoides a partir del octavo mes de crecimiento a diferencia de las hojas, donde en las primeras etapas de desarrollo se sintetizan carotenoides, principalmente luteína (Fuentes y col., 2012), como se ve en la figura 3.

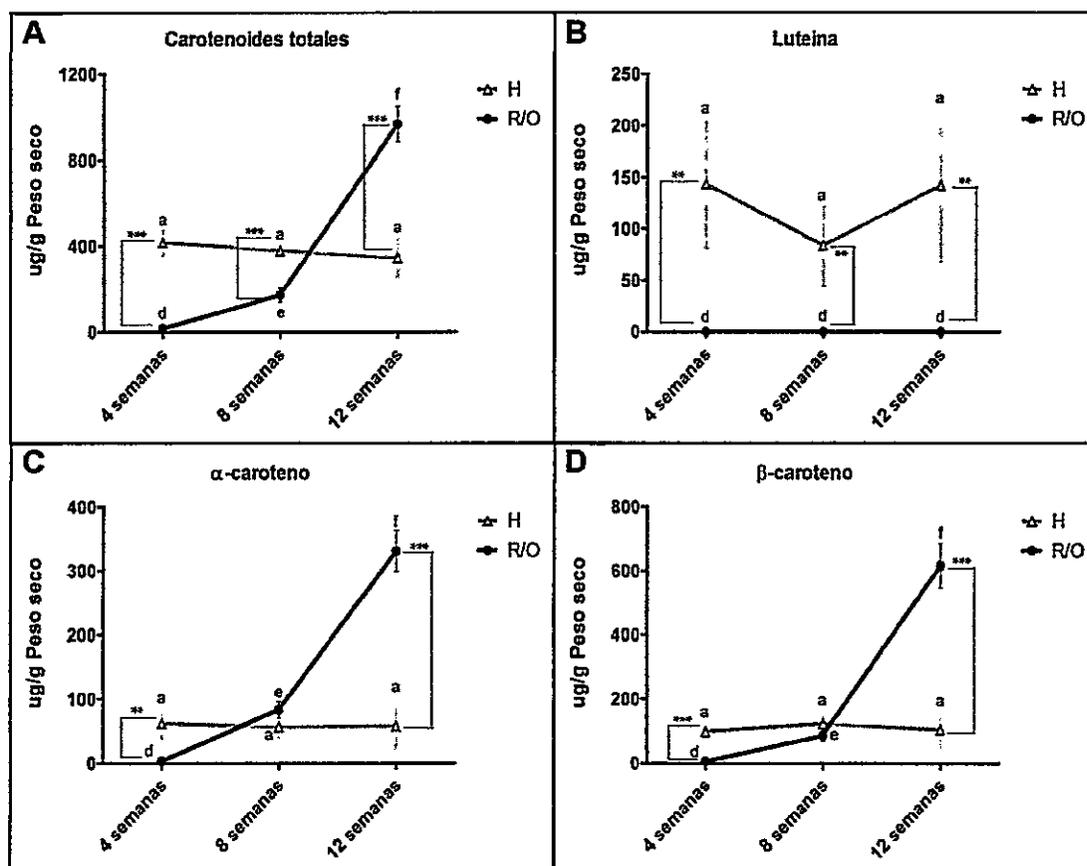


Figura 3. Niveles de carotenoides durante el desarrollo de hojas y raíz en *D. carota*. Diferentes letras indican diferencias significativas durante diferentes estados de desarrollo para las hojas (H) y la raíz (R/O), respectivamente, determinado por ANOVA de una vía y post-test de Tukey, $p < 0,05$. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los dos órganos en un mismo estado de desarrollo, determinado por Test de T no pareado de dos colas. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Gráfico extraído de (Fuentes y col., 2012).

En el año 2007 la secuencia del ADNc de algunos de los genes carotenogénicos de *D. carota* fueron anotados (Just y col., 2007). Nuestro grupo de trabajo se ha dedicado a estudiar y caracterizar la función de genes específicos pertenecientes a la ruta de biosíntesis de carotenoides en *D. carota*, como los que codifican para las enzimas fitoeno sintasa, licopeno β -ciclasa y ζ -caroteno desaturasa a través de metodologías como la complementación heteróloga en cepas carotenogénicas de *E. coli*, silenciamiento génico en *D. carota* y sobreexpresión en plantas (Moreno y col., 2013). En particular, con el fin de establecer los mecanismos que regulan la síntesis de carotenoides, se determinó el patrón de expresión de genes

pertenecientes a la ruta de carotenoides involucrados directamente en la síntesis de β -caroteno durante el desarrollo de hojas y raíz de *D. carota* (Fuentes y col., 2012). A partir de este estudio se determinó que de los dos genes *PSY* presentes en *D. carota*, el gen *PSY2* se encontraría relacionado con la síntesis de carotenoides principalmente en la raíz modificada debido a que, a pesar que ambos genes aumentan su expresión durante el desarrollo de la raíz, a las 12 semanas la expresión del gen *PSY2* aumenta más de 18 veces con respecto a la expresión de *PSY1* (Figura 4); por otro lado, el gen *PSY1* se encontraría asociado principalmente a la síntesis de carotenoides en hojas maduras de *D. carota*, ya que a las 12 semanas este gen aumenta su expresión más de 12 veces con respecto su expresión a las 4 semanas, mientras que la expresión del gen *PSY2* en hojas a las 12 semanas posee una disminución en comparación a las 4 semanas (Figura 4). Debido a que el gen *PSY2* presentan una mayor expresión en la raíz de reserva de *D. carota*, recientemente nuestro grupo obtuvo una región promotora de 769pb de este gen mediante la estrategia de GenomeWalker, en la cual se observan elementos en cis regulados por luz, fitohormonas y estrés (Fuentes, 2011).

A pesar de todo el estudio realizado en la ruta de biosíntesis de carotenoides en *D. carota*, no se han identificado los genes de la ruta del MEP de zanahoria y se desconoce si el flujo de precursores sintetizados en esta ruta limita la producción de carotenoides en este modelo de estudio.

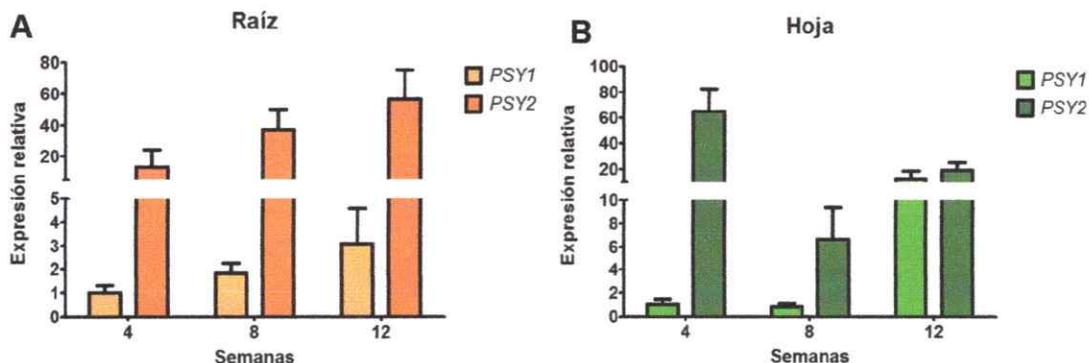


Figura 4. Expresión relativa de *PSY1* y *PSY2* durante el desarrollo de las hojas y la raíz modificada de la zanahoria. Niveles de transcrito de los genes *PSY1* y *PSY2* durante el desarrollo de hojas (A) y raíces (B) en zanahoria. Como calibrador se utilizó el nivel de expresión de *PSY1* a las 4 semanas. Diferentes letras indican diferencias significativas durante diferentes estados de desarrollo determinadas mediante test de Kruskal–Wallis y post-test de Dunn's, $p < 0,05$. A) Gráfico extraído de Fuentes 2012 y col. (Fuentes y col., 2012). B) Datos no publicados.

1.6 Estrategia a utilizar

En este trabajo se propone evaluar si la síntesis de carotenoides en *D. carota* se ve afectada por el flujo de precursores metabólicos sintetizados en la ruta del MEP. Para ello se generarán construcciones que permitan la expresión de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* bajo la dirección del promotor del gen *PSY2* de *D. carota* para obtener zanahorias que expresen estos genes en raíces adultas de zanahorias. Se usarán los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* debido a que aún no han sido identificado estos genes en *D. carota*. Estas construcciones serán utilizadas para la transformación estable de zanahorias y permitirán determinar el efecto de la expresión de los genes *DXR* y *DXS* en el contenido de carotenoides en las raíces de reserva de las zanahorias, un sistema vegetal tan distinto a los actualmente evaluados. Además, se analizará molecularmente líneas de *D. carota* que fueron transformadas con estos genes dirigidos por el promotor CAMV 35S. Mediante ensayos de PCR y RT-PCR se determinará la presencia y expresión de los transgenes, se realizará qRT para cuantificar el nivel de transcrito de genes carotenogénicos endógenos de líneas

transgénicas y se medirá el contenido de carotenoides en hojas y raíces de líneas transgénicas mediante HPLC.

1.7 Hipótesis

La expresión de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* en *D. carota* produce un aumento en la acumulación de carotenoides en hojas y en la raíz de reserva.

1.8 Objetivo general

Determinar si la biosíntesis de carotenoides en hojas y raíz de reserva de *D. carota* se encuentra limitada por la ruta del MEP.

1.9 Objetivos específicos

- Generar las construcciones pPSY2-DXR y pPSY2-DXS en las cuales los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* están dirigidos por el promotor del gen *PSY2* de *D. carota*.
- Obtener plantas transgénicas de *D. carota* que expresen los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* bajo el promotor 35S CaMV y bajo el promotor *PSY2* de *D. carota*.
- Análisis molecular y bioquímico de plantas de *D. carota* regeneradas a partir de la transformación de explantes con las construcciones 35S-DXR y 35S-DXS.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cultivo de cepas bacterianas

Para la obtención de células de *Escherichia coli* y de *Agrobacterium tumefaciens* quimiocompetentes se utilizaron alícuotas que contenían células de *E. coli* Mach1TM-T1, de genotipo F⁻ ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 hsdR* (*r_k⁻,m_k⁺*) Δ *recA1398 endA1 tonA* (Invitrogen) y células de *A. tumefaciens* de genotipo GV3101: C58, plásmido Ti curado, Gen^R, Rif^R, respectivamente.

Los cultivos de *E. coli* en medio líquido se realizaron mediante la inoculación de células de *E. coli* de una alícuota stock en LB líquido (Tryptona 2% p/v, NaCl 0,8% p/v, Extracto de levadura 0,5% p/v) suplementado con el antibiótico de selección correspondiente, de acuerdo a la resistencia que portaban los vectores usados para transformar las células. El cultivo se mantuvo durante 16 h a 37°C en agitación. Los cultivos en medio sólido de *E. coli* se realizaron en placas Petri con medio LB sólido (medio LB líquido con Agar-agar 1,6%) suplementando con el antibiótico de selección adecuado, y las placas fueron incubadas durante 16 h a 37°C.

Los cultivos líquidos de *A. tumefaciens* se realizaron mediante la inoculación de células de *A. tumefaciens* provenientes de la alícuota stock en medio LB líquido suplementado con rifampicina 20 mg/L, gentamicina 100 mg/L y el antibiótico de selección correspondiente al plásmido de interés. El cultivo líquido se mantuvo a 28°C por 26 h en agitación. Del mismo modo, los cultivos en medio sólido de *A. tumefaciens* se realizaron en placas Petri con medio LB sólido suplementado con los antibióticos mencionados, y las placas fueron incubadas durante 48 h a 28°C.

Tanto para los cultivos de *E. coli* como para las de *A. tumefaciens*, el almacenamiento de alícuotas de células a partir de los cultivos líquidos se realizó en una mezcla de 500 uL del cultivo con 300 uL de glicerol 80% estéril.

2.2 Preparación de células quimiocompetentes

2.2.1 Preparación de *E. coli* quimiocompetente

Para la obtención de células de *E. coli* quimiocompetentes, se inoculó una alícuota del *E. coli* Mach1 en 250 mL de medio SOB (Tryptona 2% p/v, Extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM) y se incubó en agitación a 37°C hasta una D.O.₆₀₀ de 0,3. Se repartió en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugó a 3000 g por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el precipitado de células de cada Falcon se resuspendió suavemente en 20 mL de búffer CCMB80 (10 mM KOAc pH 7,0, 80 mM CaCl₂·2H₂O, 20 mM MnCl₂·4H₂O, 10 mM MgCl₂·6H₂O, 10% glicerol (100 ml/L)). El cultivo se incubó en hielo durante 20 min y se centrifugó a 2000 g por 8 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado de células de cada Falcon se resuspendió suavemente en 10 mL de búffer CCMB80. Se unieron todas las células en un solo Falcon y se midió la D.O.₆₀₀ de una mezcla de 200 uL de estas células y 800 uL de medio SOB, agregando búffer CCMB80 hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de entre 1 a 1,5. Finalmente se almacenaron las células competentes en alícuotas de 100 uL a -80°C.

2.2.2 Preparación de *A. tumefaciens* quimiocompetente

Para la obtención de células de *A. tumefaciens* quimiocompetentes se utilizó una alícuota de células de *A. tumefaciens* GV3101, la cual se inoculó en medio LB líquido suplementado con rifampicina 10 mg/L y gentamicina 100 mg/L, y se incubó a 28°C en agitación hasta una D.O.₆₀₀ de 0,3 a 0,5. El cultivo se incubó 10 min en hielo,

para posteriormente centrifugarlo a 4°C durante 20 min a 3000 g. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado de células se resuspendió suavemente en 1 mL de una solución estéril de CaCl₂ 20 mM. Las células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* fueron almacenadas en alícuotas de 100 uL cada una a -80°C.

2.3 Transformación de células bacterianas quimiocompetentes

2.3.1 Transformación de *E. coli* quimiocompetentes

Para la transformación de células de *E. coli*, se descongeló en hielo una alícuota de células *E. coli* quimiocompetente y se mezcló con la cantidad adecuada de ADN (6 uL de una reacción de ligación en pCR8 o 10 uL de una reacción de recombinación en pMDC107). Se incubó la alícuota en hielo durante 30 min, luego durante 30 s a 42°C e inmediatamente se depositó en hielo. Luego de 2 min se mezcló la alícuota con 250 uL de medio LB líquido y se incubó a 37°C durante 1 h en agitación. Se sembraron entre 50 y 250 uL del cultivo en placas Petri con LB sólido suplementado con el antibiótico de selección adecuado al vector incorporado y las placas se incubaron 16 h a 37°C.

2.3.2 Transformación de *A. tumefaciens* quimiocompetentes

Para la transformación de células de *A. tumefaciens*, se descongeló en hielo una alícuota de *A. tumefaciens* GV3101 quimiocompetente y se mezcló con 250-500 ng del vector de interés. La alícuota se sometió a un golpe de frío sumergiéndola en nitrógeno líquido durante 5 min y luego se descongeló a temperatura ambiente por 15 min. Se adicionó 1 mL de LB líquido y las células se incubaron a 28°C por al menos 6 h. Se sembraron 50 uL del cultivo en placas Petri con medio LB sólido suplementado con rifampicina 10 mg/L, gentamicina 100 mg/L y el antibiótico de selección del vector incorporado y las placas se incubaron a 28°C durante 48 h.

2.4 Extracción de ADN plasmidial a partir de células de *E. coli*

La extracción de ADN plasmidial a partir de células de *E. coli* transformadas con los vectores de interés se realizó utilizando el kit de miniprep plasmidial AxyPrep (Axygen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.5 Digestiones enzimáticas

Se realizaron diversas digestiones enzimáticas con distintas enzimas de restricción con el fin de liberar fragmentos de ADN a partir de una construcción, linearizar vectores o determinar la presencia y correcta orientación de los fragmentos clonados en los distintos vectores utilizados. Las digestiones enzimáticas se realizaron siguiendo las instrucciones de cada enzima de restricción utilizada, y todas las digestiones se llevaron a cabo en un baño temperado.

2.6 Diseño de partidores

Todos los partidores utilizados en este trabajo fueron diseñados manualmente o utilizando el programa Vector NTI®. El análisis de los partidores diseñados se realizó mediante el programa OligoAnalyzer 3.1, el cual permitió calcular la temperatura de disociación y descartar la presencia de homodímeros y heterodímeros. Los partidores fueron sintetizados por IDT® y se detallan en la Tabla I.

2.7 Electroforesis en geles de agarosa

Dependiendo del tamaño esperado de las bandas, la electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1 a 1,5% preparada en TAE 1x (tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM a pH 8). Las muestras de ADN y ARN se cargaron en los bolsillos de los geles en 1 uL de búffer de carga (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilen cyanol, 15% glicerol). La electroforesis se realizó a 90 volts durante 1 h para el ADN y a 70 volts durante 45 min

para el ARN. Para determinar el tamaño y semi-cuantificar el ADN cargado en los pocillos de los geles, se comparó con 5 uL (250 ng) de Ladder GeneRuler (Fermentas) que se cargó junto a las muestras. Posteriormente, los geles fueron incubados durante 20 min en una solución de bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta en un transiluminador (SYNGENE).

Tabla I. Partidores utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)	Tamaño (pb)	Descripción
AtDXR F	AGTAGCGGATGCGT TGAAGC	58	674 (AtDXR) y 1569 (AtDXS)	Utilizados para chequear colonias transformadas con los vectores 35S-DXR y 35S-DXS.
AtDXS F	AGAGCTGGACTCGT TGGAGC	58		
eGFP R	CGACCAGGATGGGC ACCAC	61.1		
ppPSY2	CAGAAAAAACCCAA AAAGAAATGTG	52.2	769	Utilizados para amplificar el promotor de <i>PSY2</i> de <i>D. carota</i> y agregar un sitio de restricción para <i>Bam</i> HI
B-pPSY2 R	CAGGATCCGCTGGA GTTAGTGCTACC	62		
B-DXR F	ACGGATCCATGATG ACATTAATACTCACT	58	1494	Utilizados para amplificar el gen <i>DXR</i> de <i>A. thaliana</i> y agregar sitios de restricción para <i>Bam</i> HI
B-DXR R	CAGGATCCTGCATG AACTGGCCTAG	61.1		
B-DXS F	ACGGATCCATGGCT TCTTCTGCATTTG	61.3	2154	Utilizados para amplificar el gen <i>DXS</i> de <i>A. thaliana</i> y agregar sitios de restricción para <i>Bam</i> HI
B-DXS R	CAGGATCCAAACAG AGCTTCCCTTGG	61.3		
qDXR F	CGAGTTGGTAACAT CACCGTCTCTTG	59.1	164 (qDXR) y 232 (qDXS)	Utilizados junto con qeGFP R para amplificar los genes <i>DXR</i> y <i>DXS</i> de <i>A. thaliana</i> mediante qRT-PCR
qDXS F	CGCAGCAACCGCAC TTAACTTAA	58.3		
qeGFP F	GAACTTCAAGATCC GCCACAACAT	57.8	121	Utilizados para amplificar el gen eGFP mediante qRT-PCR
qeGFP R	CAGGTAGTGGTTGT CGGG	55.2		
qDXR F 2	TAGGTTGTGCGGGA CTAAAGCC	59.3	65	Utilizados para amplificar el gen <i>DXR</i> de <i>A. thaliana</i> mediante qRT-PCR
qDXR R	TGCAAGAGCAATGT CCTTTCCTGC	60.1		
qDXS F 2	GGCTCGCACGTTGT TCAGTTTC	59.2	77	Utilizados para amplificar el gen <i>DXS</i> de <i>A. thaliana</i> mediante qRT-PCR
qDXS R	GGCAGTACCATTGG TCTCCACTTG	59.7		
18S F	TTGATTACGTCCCTG CCCTTT	62	196	Gen housekeeping. Utilizado para verificar la calidad del ADN y ADNc.
18S R	ACAATGATCCTTCC GCAGGT	60		

2.8 Purificación de bandas desde geles de agarosa

Para extraer y purificar las bandas de ADN a partir de geles de agarosa, se cortaron las bandas de interés presentes en el gel utilizando un bisturí y se purificaron mediante el kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.9 Reacción en cadena de la polimerasa PCR

2.9.1 PCR convencional

Para amplificar los fragmentos de ADN a partir de diferentes muestras se utilizó la enzima *Taq* ADN polimerasa (Sigma). Todas las reacciones de PCR realizadas se llevaron a cabo en un volumen final de 25 uL de reacción, el cual contenía 1 uL de la muestra de ADN, 1 U de enzima *Taq* ADN polimerasa (0,2 uL), 2,5 uL de PCR búffer 10x, 0,5 uL de dNTPs 10 mM, 0,5 uL de partidor directo 10 mM, 0,5 uL de partidor reverso 10 mM y 19,8 uL de agua libre de nucleasas. Para cada reacción de PCR se realizó una reacción de control negativo, a la cual no se le agregó muestra de ADN y cuando fue posible una reacción de control positivo, a la cual se le agregó 1 uL de una muestra de ADN previamente verificada. El programa general de las reacciones de PCR convencional se detalla en el Anexo (Tabla A1). La temperatura de hibridación depende de cada par de partidores, y generalmente se utilizó una temperatura de hibridación igual a la temperatura de disociación más baja de los partidores menos cinco grados; y el tiempo de extensión depende del tamaño del fragmento de ADN amplificado y de la procesividad de la enzima utilizada, es decir el número de nucleótidos que adiciona por unidad de tiempo, y que para la enzima *Taq* ADN polimerasa es de 1 kb/min. Finalmente, los productos de las reacciones de PCR fueron verificados mediante electroforesis en geles de agarosa (sección 2.7).

2.9.2 PCR convencional con enzima *Pfu* ADN polimerasa

La amplificación de *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* se realizó mediante un PCR convencional utilizando la enzima *Pfu* ADN polimerasa (Fermentas). Esta enzima posee una tasa de error muy baja ($2,6 \times 10^{-6}$ errores por nucleótido por ciclo) (Lundberg y col., 1991), lo que permite clonar fragmentos de ADN sin introducir mutaciones. Todas las reacciones de PCR llevadas a cabo utilizando la enzima *Pfu* ADN polimerasa se realizaron en un volumen de reacción total de 25 uL, el cual contenía 1 uL de la muestra de ADN, 1,25 U de enzima *Pfu* ADN polimerasa (0,5 uL), 2,5 uL de *Pfu* búffer 10x, 0,5 uL de dNTPs 10 mM, 0,5 uL de partidor directo 10 mM, 0,5 uL de partidor reverso 10 mM y 19,5 uL de agua libre de nucleasas. Del mismo modo que para un PCR convencional, se realizó una reacción control negativo y una reacción control positivo. El programa de las reacciones de PCR con la enzima *Pfu* ADN polimerasa se detalla en el Anexo (Tabla A2), considerando que la posesividad de la enzima es 0,5 kb/min. Finalmente, los productos del PCR se visualizaron en un gel de agarosa.

2.9.3 PCR de colonias

Para determinar de forma preliminar si las colonias de *E. coli* o de *A. tumefaciens* transformadas con los vectores de interés portaban realmente el inserto, se realizaron reacciones de PCR directamente a las colonias crecidas en placas de Petri luego de la transformación. Para esto, se picó la colonia con un mondadientes estéril y se resuspendió en un Eppendorf de 0,2 mL que contenía 25 uL de la misma reacción utilizada para realizar un PCR convencional. Además, se picó nuevamente la misma colonia y se rayó en una placa Petri con medio LB suplementado con el antibiótico adecuado para propagar la colonia. Finalmente, los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa mediante electroforesis

2.9.4 RT-PCR

La reacción de transcripción reversa (RT) se realizó utilizando la enzima RT-ImPromII (Promega). En primera instancia se eliminó todo el posible DNA genómico que pudiese haber sido extraído junto al ARN utilizando la enzima DNasa I. Se utilizaron 7 ug de ARN de alta pureza (índices 260/280 y 260/230 muy cercanos a 2,0), los cuales se incubaron con 50 U (1 uL) de DNasa I (Fementas), 40 U (1 uL) del inhibidor de RNasa Ribolock™ (Fermentas) y 2 uL de búffer de DNasa I 10x (Fermentas), y se completó la reacción con agua libre de nucleasas hasta un volumen de 20 uL. La reacción se incubó durante 35 min a 37°C en un baño temrorregulado. La reacción se puso inmediatamente en hielo y se detuvo agregando 1 uL de EDTA 50 mM e incubando a 65°C durante 10 min.

Para la síntesis del ADNc se utilizaron 9,5 uL de la reacción anterior y se incubaron con 3 uL de oligo AP 10 mM a 70°C durante 5 min en el termociclador (Tabla A3). Una vez transcurridos los 5 min el programa fue pausado y a cada reacción se le agregaron 37,5 uL de una mezcla que contenía 10 uL de búffer 5x ImProm-II™ (Promega), 3 uL de la enzima Transcriptasa Reversa ImProm-II™ (Promega), 1 uL del inhibidor de RNasa Ribolock (Fermentas), 10 uL de MgCl₂ 25 mM, 2,5 uL de dNTPs 10 mM y 11 uL de agua libre de nucleasas. Finalmente, se continuó con el programa de RT-PCR para obtener 50 uL de ADNc.

Para verificar la correcta síntesis de ADNc, se realizó un PCR convencional a cada muestra utilizando partidores específicos y se incluyó un control sin RT para cada una, el cual consistió en una reacción de PCR convencional utilizando como muestra 1 uL de ARN proveniente del tratamiento con DNasa I. Con esto se aseguró que no existía ADN genómico en las muestras a las cuales se les realizó el RT-PCR.

2.9.5 PCR cuantitativo en Tiempo Real (qRT)

Para cuantificar los niveles de expresión de los genes de interés se realizó un PCR cuantitativo en tiempo real (qRT) utilizando la sonda fluorescente SYBR green. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mx3000P (Stratagene) y se utilizó el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene). Cada reacción de qRT-PCR contenía 10 uL de Master Mix, la cual contiene *Taq* ADN polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y la sonda SYBR green, 0,6 uL del partidor reverso, 0,6 uL del partidor directo, 0,3 uL de una dilución 1:500 de la sonda ROX, 1 uL de ADNc y 7,5 uL para completar 20 uL de reacción. El programa utilizado para la realización del qRT-PCR se detalla en el Anexo (Tabla A4), el cual fue el mismo para cada par de partidor utilizado. Cada reacción se realizó por triplicado técnico, y posteriormente se analizaron las dos réplicas de mayor similitud.

Luego de cada programa de amplificación se realizó una curva de disociación, la cual permite determinar la especificidad de la reacción. La curva de disociación (Tabla A4) consiste en la medición de la fluorescencia durante toda la denaturación y la renaturación del producto de PCR, en donde la presencia de una sola señal da cuenta de una reacción específica.

Todas las cuantificaciones de los niveles de expresión realizadas en este trabajo fueron relativizadas a un control (calibrador), correspondiente a los niveles de expresión de una planta silvestre. Además, para descartar posibles diferencias debido a la cantidad o calidad de ADNc presente en las muestras, los datos fueron normalizados con los niveles de expresión del gen 18S, el cual posee expresión constante en las plantas (*housekeeping*). Para determinar la expresión relativa de cada gen se utilizó la siguiente fórmula (Pfaffl, 2001):

$$\text{Expresión Relativa} = \frac{(E_{\text{gen objetivo}}) * e^{-(Ct_{\text{gen objetivo}} - Ct_{\text{calibrador gen objetivo}})}}{(E_{\text{gen normalizador}}) * e^{-(Ct_{\text{normalizador}} - Ct_{\text{calibrador}})}}$$

2.9.6 RT-PCR semicuantitativo

Para determinar la expresión relativa de *DXS* y *DXR* de *A. thaliana* en las líneas transgénicas de *D. carota*, se realizó un análisis mediante RT-PCR semicuantitativo ya que no fue posible diseñar partidores específicos para realizar un qRT para estos genes. Por lo tanto, utilizando como muestra el mismo ADNc utilizado para realizar los qRT-PCR, se realizó un PCR convencional (sección 2.9.1) con los partidores para *DXS* y *DXR*, pero con 30 ciclos de denaturación-hibridación-extensión para evitar la saturación del PCR. Luego de correr las muestras en geles de agarosa (sección 2.7), la acumulación del producto de PCR se cuantificó mediante el escaneo de la imagen de los geles usando el programa ImageJ (National Institutes of Health)(Schneider y col., 2012). La abundancia relativa de los genes fue normalizada con respecto al gen 18S de *D. carota*, y se expresó como la razón de la intensidad de pixeles en unidades arbitrarias.

2.10 Cultivo *in vitro* de *Daucus carota*

Para el cultivo *in vitro* de zanahorias, se utilizaron semillas comerciales de *Daucus carota* variedad Nantes, las cuales fueron esterilizadas superficialmente en una solución de etanol 95% durante 1 min y lavadas una vez con agua estéril por 3 min. Luego, las semillas fueron incubadas en agitación en una solución de hipoclorito de sodio 2,62% por 45 min, lavadas tres veces con agua estéril y finalmente secadas en papel absorbente estéril. Las semillas estériles fueron depositadas en frascos estériles con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sólido (medio MS con vitaminas 0,44%, sacarosa 2%, myo-inositol 0,01%, Agar-agar 0,7%, pH 5,8). Las semillas se

mantuvieron en una cámara de cultivo a 22°C y expuestas a 16 h luz hasta las tres semanas, momento en que fueron utilizadas para la transformación.

2.11 Transformación estable de explantes de *Daucus carota*

La transformación de explantes de *D. carota* se llevó a cabo utilizando el protocolo modificado descrito por Chen y Punja (2002). Se preparó un cultivo de 15 mL *A. tumefaciens* inoculando una alícuota de las células portadoras del vector de interés y se dejó crecer durante la noche. El cultivo fue centrifugado por 10 min a 8000 g, se resuspendió en 30 mL de MS líquido (medio MS con vitaminas 0,44 %, sacarosa 2%, myo-inositol 0,01%, pH 5,8) suplementado con acetosiringona 0,8 mM y se incubó a 28°C en agitación hasta obtener una D.O.₆₀₀ de entre 0,6 y 0,8.

El tejido utilizado para la transformación fueron plántulas de *D. carota* provenientes de cultivos *in vitro* de semillas de *Daucus carota* de aproximadamente 3 semanas. Se cortaron en esterilidad explantes de aproximadamente 1 cm de largo tanto del hipocotilo como del epicotilo de las zanahorias *in vitro*. Estos explantes se incubaron durante 10 min en el cultivo de *A. tumefaciens* mientras se les realizaban heridas con un bisturí para favorecer la infección de la bacteria. Los explantes fueron secados en papel estéril y depositados en placas Petri con medio MS sólido, las que fueron incubadas a 22°C en oscuridad durante 48 h. Los explantes fueron retirados de las placas y lavados con agua estéril, secados en papeles absorbente estéril y depositados en placas Petri con medio MSI. La composición del medio MSI y la de los siguientes medios se detallan en la Tabla II. Estas placas se mantuvieron en oscuridad durante 4-6 semanas a 22°C. Posteriormente, los explantes fueron transferidos a placas Petri con medio MSII, en donde se mantuvieron por 4-6 semanas bajo fotoperiodo 16 h luz, hasta la aparición de embriones inmaduros. Luego, los embriones fueron transferidos a placas Petri con medio MSIII, en donde se mantuvieron hasta la

aparición de los primeros brotes de plántulas de *D. carota*, renovando el medio MSIII cada aproximadamente 4 semanas. Luego de la aparición de los primeros brotes, estos se mantuvieron una a dos semanas más en medio MSIII para luego traspasarlos a frascos Magenta con medio MSIV, en donde se mantuvieron hasta que las plántulas alcanzaran un tamaño de 5cm de alto y con una raíz bien formada. Estas plántulas fueron transferidas a maceteros que contenían una mezcla de tierra de hojas, vermiculita y turba (1:1:1) y cultivadas en un invernadero a 22°C bajo fotoperiodo de 16 h luz. Debido a que las plántulas en los frascos Magenta se encontraban en un ambiente con alta humedad, al ser transferidas a tierra se cubrieron con frascos transparentes durante un mes para mantener las condiciones de humedad. Los frascos se retiraron lentamente para aclimatar a las plántulas a la humedad del invernadero. Las plantas fueron regadas 2 veces por semana con medio Hidropónico (KNO_3 0,125 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,15 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,075 mM, KH_2PO_4 0,05 mM, KCl 5 uM, H_3BO_3 5 uM, MnSO_4 1 uM, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 nM, CuSO_4 150 nM, $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si}$ 10 uM, Fe/DTPA 10 uM, pH 6).

Tabla II. Medios de cultivo de plantas de *D. carota*

1. 35S-DXR y 35S-DXS

Medio	Basta (mg/L)	2,4-D (mg/L)	Cefotaxime (mg/L)
MSI	0	1	300
MSII	0.5	0,5	300
MSIII	1	-	150
MSIV	1	-	-

2. pPSY2-DXR y pPSY2-DXS

Medio	Higromicina (mg/L)	2,4-D (mg/L)	Cefotaxime (mg/L)
MSI	0	1	300
MSII	2	0,5	300
MSIII	4	-	150
MSIV	8	-	-

2.12 Transformación transitoria de hojas de *Nicotiana tabacum*

Para comprobar que GFP se encontraba en marco de lectura con las proteínas DXS y DXR y que el promotor de PSY2 dirigía correctamente la expresión de estos genes, se transformaron transitoriamente hojas adultas de *Nicotiana tabacum*. Se prepararon cultivos de *A. tumefaciens* en medio MS líquido suplementado con acetosiringona y con una D.O.₆₀₀ de 0,3 con las construcciones generadas. Se procedió a infiltrar las células de *A. tumefaciens* en hojas de *N. tabacum* previamente asperjadas con agua para facilitar la apertura de los estomas. La infiltración se realizó utilizando una jeringa de 5 mL sin aguja cargada con el cultivo de *A. tumefaciens* y presionándola suave pero firmemente contra la cara abaxial de las hojas hasta observar la infiltración de una amplia zona de la hoja. Las plantas infiltradas de esta forma se mantuvieron durante 3-4 días a 22°C en fotoperiodo de 16 h hasta la recolección del tejido.

2.13 Vectores para la expresión constitutiva en *D. carota* de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana*

Para expresar de forma constitutiva los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* en *D. carota* se transformaron establemente explantes de acuerdo a lo señalado en la sección 2.11 con los vectores At.DXRns-pB7FWG2 (35S-DXR) y At.DXSfl-pB7FWG2 (35S-DXS) (Figura 5). Estas construcciones, que contienen los genes de *A. thaliana* *DXR* y *DXS* fusionadas a *GFP* y que se encuentran bajo el promotor 35SCaMV, fueron generadas en el laboratorio del doctor Manuel Rodríguez-Concepción (CRAG, Barcelona, España).

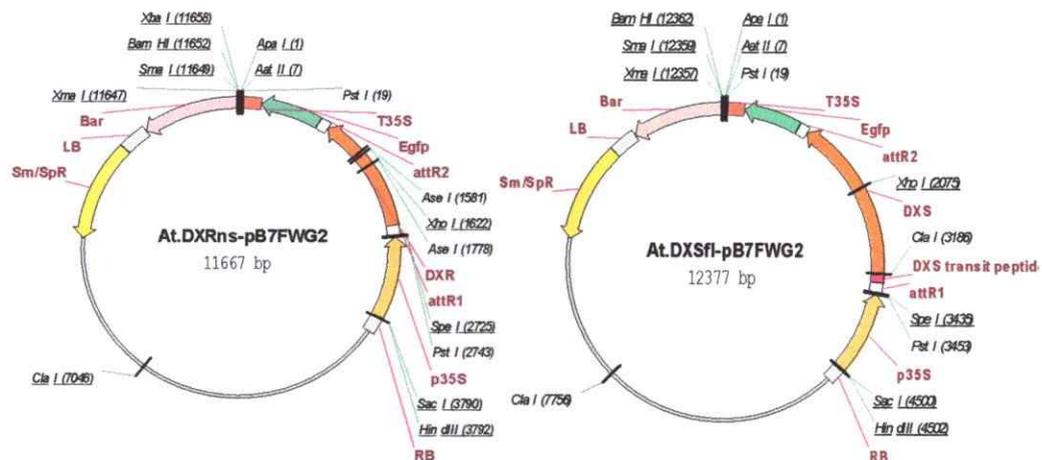


Figura 5. Construcciones At.DXRns-pB7FWG2 (35S-DXR) y At.DXSfl-pB7FWG2 (35S-DXS). Vectores utilizados para la transformación estable de explantes de *D. carota*.

2.14 Generación de las construcciones pPSY2-DXR y pPSY2-DXS

2.14.1 Obtención de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* y del promotor de

PSY2 de *D. carota*

Para crear las construcciones en donde los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* se encuentran dirigidos por el promotor de la enzima fitoeno sintasa II (pPSY2) de *D. carota*, se diseñaron cuatro partidores (B-DXR F y B-DXR R para *DXR*, B-DXS F y B-DXS R para *DXS*), que permiten agregar sitios de restricción para la enzima *Bam*HI en los extremos 3' y 5' de las secuencias de cada gen. Del mismo modo, se diseñó un par de partidores (ppPSY2 y B-pPSY2 R) que permiten añadir un sitio de restricción para la enzima *Bam*HI solo en el extremo 3' del promotor de *PSY2* de *D. carota*. Cabe señalar que la enzima *Bam*HI no posee ningún sitio de restricción en el vector de entrada seleccionado (pCR8), lo que permite liberar los genes *DXS* y *DXR* del vector de entrada y linearizar el vector de entrada que contiene al promotor de *PSY2*. En la Tabla I se encuentra el nombre y la secuencia de cada uno de los partidores utilizados.

Utilizando estos partidores, los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* fueron amplificados a partir de los vectores At.DXRns-pB7FWG2 y At.DXSfl-pB7FWG2,

respectivamente. Para esto, se purificaron los vectores mediante un kit de purificación plasmidial (sección 2.4) a partir de clones de *E. coli* transformados con las respectivas construcciones y se amplificaron los genes utilizando los partidores señalados mediante PCR convencional utilizando la enzima *Pfu* ADN polimerasa (sección 2.9.2). Del mismo modo, el promotor del gen *PSY2* de *D. carota* se amplificó a partir del vector pCR8-PP₁psy2 purificado utilizando los partidores diseñados (Tabla I) mediante PCR con la enzima *Pfu* ADN polimerasa. Debido a que la enzima *Pfu* ADN polimerasa no deja adeninas libres en los extremos 3' de los fragmentos que amplifica, los cuales son necesarios para la ligación al vector de entrada, fue necesario agregarlas a los extremos 3' de cada fragmento usando la enzima *Taq* ADN polimerasa, la cual deja adeninas libres en los extremos 3' de los fragmentos amplificados. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 uL, el cual contenía 250-300 ng de ADN, 2 uL PCR búffer 10x, 1 U de enzima *Taq* ADN polimerasa (0,2 uL), 0,4 uL de dATP, y se incubó a 70°C durante 15 min.

2.14.2 Clonación de los fragmentos *DXR*, *DXS* y p*PSY2* en el vector pCR8

Para amplificar y permitir la posterior ligación de los genes *DXR*, *DXS* y el promotor de *PSY2*, se utilizó el vector de entrada pCR8/GW/TOPO. Este vector cuenta con la enzima Topoisomerasa I covalentemente unida a su secuencia, lo que favorece la clonación de los productos de PCR que posean una adenina libre en cada extremo 3'. Además, este vector posee las regiones *attL1* y *attL2*, que flanquean la zona de clonación de los fragmentos de interés. Estas regiones permiten el traspaso de los fragmentos clonados a vectores de destinación mediante recombinación homóloga, tecnología conocida como Gateway.

De esta forma, para clonar los fragmentos de interés en el vector de entrada pCR8, se utilizaron 0,5-4 uL del producto de PCR al que se le agregó las adeninas y se

mezclaron con 50 ng del vector de entrada pCR8 y 1 uL de una solución salina (NaCl 1,2 M, MgCl₂ 0,06 M) en un volumen final de reacción de 6uL. La reacción de ligación se incubó durante 12 h a 4°C y se utilizaron 2-4 uL de la reacción para transformar células de *E. coli* quimiocompetentes.

Para determinar las colonias que poseían los vectores generados, es decir pCR8-DXS, pCR8-DXR y pCR8-pPSY2, se realizó un PCR de colonias (sección 2.9.3) a las colonias que crecieron luego de la transformación. Finalmente, a dos clones que resultaron positivos para el PCR de colonia por cada construcción generada, se les extrajo ADN plasmidial y se enviaron a secuenciar (Macrogen Corp. USA)

2.14.3 Ligación de los genes *DXS* y *DXR* al vector pCR8-pPSY2

Luego de comprobar que no existían mutaciones en los clones secuenciados, se liberaron los genes *DXR* y *DXS* mediante digestión de los vectores pCR8-DXS, pCR8-DXR (sección 2.4) con la enzima *Bam*HI (Fermentas), durante 3 h a 37°C en una reacción que contenía 0,5-1 ug de ADN plasmidial, 5 uL de búffer *Bam*HI 10x, 20 U de enzima *Bam*HI (2 uL) y de agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 50 uL de reacción. En paralelo se linearizó el vector pCR8-pPSY2 con la misma enzima de restricción y usando el mismo protocolo descrito. Luego de la digestión, la totalidad de la reacción se cargó en geles de agarosa y se realizó una electroforesis (sección 2.7), para posteriormente purificar las bandas de interés a partir de los geles de agarosa (sección 2.8), es decir las bandas que corresponden a los genes *DXR* y *DXS* que fueron liberadas de sus vectores, y al vector linearizado pCR8-pPSY2. Una vez se purificaron las bandas de interés, se procedió a ligar los genes *DXR* y *DXS* en el vector pCR8-pPSY2 linearizado en una reacción que contenía 2 uL de búffer T4 ADN Ligasa (Fermentas) 10x, 1 U T4 ADN Ligasa (1 uL), 20-100 ng del vector linearizado, una relación molar inserto:vector (6:1) y agua libre de nucleasas hasta completar 20 uL de

reacción, y la reacción se incubó durante toda la noche a 4°C. La relación molar inserto:vector se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{Xng\ Vector * kilobase\ Inserto}{kilobase\ Vector} * \frac{6}{1} = Xng\ Inserto$$

Posteriormente, se transformaron células de *E. coli* quimiocompetentes con el producto de la ligación, y las colonias obtenidas de esta forma fueron analizadas mediante PCR y digestiones enzimática.

Para aumentar la eficiencia de la ligación, luego de la purificación del vector pCR8-pPSY2 linearizado a partir de geles de agarosa, se realizó un paso de desfosforilación para evitar la recircularización de este vector. Para esto, se preparó una solución que contenía 40 uL del vector pCR8-pPSY2 linealizado purificado, 5 uL de búffer Fosfatasa 10x, 1 U de la enzima Calf Intestine Alkaline Phosphatase (Fermentas) (1 uL) y agua libre de nucleasas hasta completar 50 uL de reacción. La reacción se incubó a 37°C por 30 min, se detuvo incubándola a 85°C durante 15 min y se procedió con la ligación.

2.14.4 Clonación de las construcciones pPSY2-DXR y pPSY2-DXS al vector de destinación pMDC107: Recombinación mediante tecnología Gateway

Para crear las construcciones en donde el promotor de *PSY2* de *D. carota* dirige la expresión de los genes *DXS* y *DXR* de *A. thaliana*, se escogió el vector de destinación pMDC107 (Curtis y Grossniklaus, 2003), el que se ilustra en la Figura 6. El vector de destinación pMDC107 posee bordes LB y RB que flanquean la zona que se insertará en el genoma de la planta a transformar. Dentro de esta zona se encuentran los sitios de recombinación attR1 y attR2 flanqueando al gen de selección *ccdb*, y río abajo se encuentra el gen reportero GFP fusionado a una cola de histidina, además del

gen *hptII* que otorga resistencia a higromicina en plantas. La recombinación de los sitios *attL1* y *attL2* presentes en el vector de entrada con los sitios *attR1* y *attR2* permiten reemplazar el gen letal de selección *ccdB* por los fragmentos previamente clonados en pCR8, generándose construcciones del tipo promotor-gen-*gfp*.

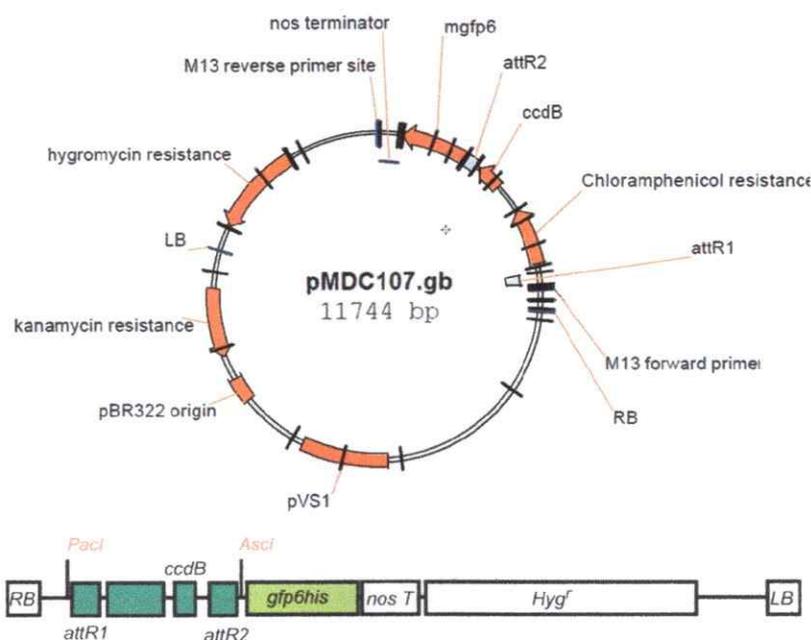


Figura 6. Vector de destino pMDC107. Vector utilizado para la recombinación de los fragmentos pPSY2-DXR y pPSY2-DXS.

La recombinación se realizó en un volumen de reacción de 16 μ L, y cada reacción contenía 100 ng de uno de los vectores de entrada (pCR8-pPSY2-DXR y pCR8-pPSY2-DXS), 250 ng del vector de destino (pMDC107), 4 μ L de búffer LR Clonasa 5x, 4 μ L del Mix de la enzima LR Clonasa (Invitrogen) y búffer TE hasta completar 16 μ L. La reacción se incubó a 4°C durante toda la noche y luego se detuvo agregando 1 μ L de Proteinasa K e incubando la reacción durante 10 min a 37°C. Finalmente se transformaron células de *E. coli* quimiocompetentes utilizando 2 μ L de la reacción. Una vez analizados los clones positivos mediante PCR de colonias y digestión enzimática, los vectores generados fueron introducidos en células de *A. tumefaciens* para transformar tejido vegetal.

2.15 Extracción de ARN a partir de tejido vegetal

La extracción del ARN total a partir de tejido vegetal se llevó a cabo utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen). Se utilizaron aproximadamente 100 mg de hojas de *D. carota* para cada extracción, los cuales fueron molidos en presencia de nitrógeno líquido en morteros previamente esterilizados y enfriados. Se adicionó 1 mL del reactivo TRIzol, se homogenizó con el tejido vegetal y se traspasó a un tubo Eppendorf de 1,6 mL. El homogenizado se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se agregó 200 uL de cloroformo, agitándose vigorosamente. La mezcla fue incubada durante 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4°C. Se rescataron aproximadamente 500 uL del sobrenadante y se traspasaron a un tubo limpio, en donde el ARN se precipitó con 500 uL de isopropanol durante 10 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4°C y el precipitado se lavó con 1 mL de etanol 75% (en agua libre de nucleasas). Se centrifugó nuevamente durante a 8000 g durante 5 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 20 uL de agua libre de nucleasas. Debido a que el ARN extraído de esta forma aún queda muy contaminado, se realizó un proceso adicional de limpieza repitiendo el protocolo a partir del paso en donde se adicionan 200 uL de cloroformo. Finalmente se determinó la integridad del ARN mediante una electroforesis en un gel de agarosa, además de su concentración y las razones 260/280 y 260/230, que indican la pureza del ARN en un espectrofotómetro NanoDrop. El índice 260/230 indica cuan puro se encuentra el ARN con respecto a proteínas que pudieran estar contaminando la muestra, y para ARN el índice 260/230 debería estar entre 1,8 y 2. Por otro lado el índice 260/280 indica la pureza del ARN con respecto a contaminantes que absorben a 230 nm, como compuestos fenólicos y algunas sales, y para un ARN puro el índice 260/230 debería encontrarse entre 2 y 2,2.

2.16 Extracción de ADN a partir de tejido vegetal

La extracción de ADN genómico a partir de tejido vegetal se realizó utilizando un protocolo descrito por Doyle y Doyle (Doyle, 1990). Se utilizaron aproximadamente 100 mg de hojas de *D. carota*, las cuales fueron molidas en presencia de nitrógeno líquido en morteros previamente esterilizados y enfriados. Se adicionaron 2 mL del búffer CTAB (Bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM y Tris 100 mM pH 8) previamente calentado a 60°C, se homogenizó con el tejido vegetal y se traspasó a un tubo Eppendorf de 2 mL. Se adicionaron 5 uL de β -mercaptoetanol y el homogenizado se incubó durante 15 min a 60°C con agitación cada 5 min. Se agregó un volumen de una solución fría de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló en vortex brevemente y se centrifugó a 10000 g durante 10 min. La fase acuosa superior se traspasó a un tubo limpio y se precipitó con un volumen de isopropanol frío durante 30 min a -20°C. Se centrifugó a 10000 g durante 10 min, y el precipitado se lavó con etanol 75%. Luego de centrifugar a 10000 g durante 5 min, el ADN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 uL de agua libre de nucleasas. Si el ADN extraído no tenía la calidad requerida, se trató con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló en vortex por 15 s y se centrifugó a 10000 g durante 5 min. El sobrenadante se rescató en otro tubo y se agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se mezcló en vortex por 15 s y se centrifugó a 10000 g durante 5 min. Nuevamente, se rescató la fase superior en otro tubo y se agregó un volumen de isopropanol frío. Se homogenizó durante 10 s y se incubó a -20°C durante 20 min para precipitar el ADN. Se centrifugó a 10000 g por 10 min, se lavó con 200 uL de etanol 70% frío y se centrifugó nuevamente durante 3 min. Finalmente el precipitado se dejó secar y se resuspendió en 50 uL de agua libre de nucleasas.

2.17 Microscopía

Para observar la fluorescencia de GFP se recolectó tejido a partir de las hojas de tabaco transformadas transitoriamente y se les realizó el proceso de "peeling", el cual consiste en remover solamente la epidermis de las hojas. Las muestras fueron montadas en un porta objetos y visualizadas en un microscopio de epifluorescencia invertido Olympus IX70 con un aumento de 200 veces (objetivo 20x) y utilizando los filtros de fluorescencia FITC para GFP, que excita en el azul (478-495 nm) y emite en el verde (510-555 nm) y Cy3 para clorofila, que excita en verde (530-560 nm) y emite en rojo (573-648 nm).

2.18 Extracción de pigmentos

Para extraer los pigmentos a partir de las hojas y la raíz de *D. carota* se recolectaron 100 mg del tejido vegetal y se maceró en presencia de nitrógeno líquido en un mortero previamente esterilizado y enfriado. Se agregaron 4 mL de una solución de hexano:acetona:etanol (2:1:1) y se homogenizó con el tejido. El homogenizado se traspasó a un tubo falcon de 15 mL, se agitó en vortex por 2 min y luego se mantuvo en hielo durante otros 2 min. Se centrifugó a 10000 g durante 10 min a 4°C, y los carotenoides se recuperaron de la fase superior y se traspasaron a un Eppendorf de 2 mL. Durante todo el proceso de extracción de carotenoides el homogenizado y el extracto se mantuvieron en hielo y en oscuridad para evitar la degradación de los carotenoides. Finalmente, la solución que contenía los pigmentos fue secada en un *Speedvac* a temperatura media hasta eliminar todo el solvente.

2.19 Cuantificación de clorofilas y carotenoides totales

Para cuantificar la concentración de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales presentes en los extractos de pigmentos de hojas y raíces de *D. carota*, los pigmentos

extraídos (sección 2.18) fueron resuspendidos en 2 mL de acetona y utilizando un espectrofotómetro se midió la absorbancia de las muestras a 750, 662, 645 y 470 nm en cubetas de cuarzo. La medición de absorbancia a 662, 645 y 470 nm permite determinar la concentración de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales, respectivamente, como se observa en la figura 7. Además, debido a que la medición de muestras turbias puede provocar la subestimación de la concentración de los pigmentos presentes, la medición de absorbancia a 750 nm permite determinar la turbidez de la muestra, la que es cero cuando un extracto es totalmente transparente ya que la clorofila a, clorofila b y los carotenoides no absorben en esta región.

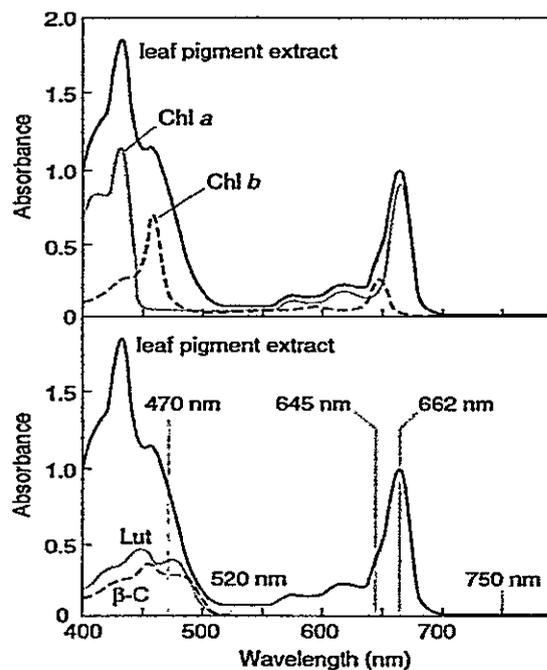


Figura 7. Espectro de absorción de pigmentos extraídos a partir de hojas de tabaco. La mezcla de pigmentos resuspendidos en acetona contenía clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), beta caroteno (β -C) y luteína (Lut). Extraído de Lichtenthaler y Buschmann, 2001

Con las mediciones de absorbancia, la concentración de clorofila a (Ca), clorofila b (Cb) y carotenoides totales (Ct) se determinó mediante las ecuaciones descritas por Lichtenthaler y Buschmann (Lichtenthaler y Buschmann, 2001), en donde la concentración de los pigmentos queda expresada como $\mu\text{g/mL}$ de extracto.

$$Ca \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = 11,24 * A_{662} - 2,04 * A_{645} \quad (1)$$

$$Cb \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = 20,13 * A_{645} - 4,19 * A_{662} \quad (2)$$

$$Ct(\mu\text{g}/\text{mL}) = (1000 * A_{470} - 1,9 * Ca - 63,14 * Cb)/214 \quad (3)$$

2.20 Cromatografía líquida de alta eficiencia (High-performance liquid chromatography HPLC)

Para determinar la composición de carotenoides presentes en las muestras de pigmentos obtenidos a partir de hojas y raíces de *D. carota*, se utilizaron 20 uL de cada muestra en acetona para el análisis mediante HPLC en fase reversa. El análisis se realizó en una columna MultoHigh 100 RP 18-5 μ (150 x 4,6 mm), utilizando como fase móvil una solución de acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5). Las muestras se corrieron a un flujo de 1,5 mL/min durante 50 min.

2.21 Determinación de la concentración del perfil de carotenoides

Para cuantificar la concentración de los carotenoides presentes en las muestras de pigmentos extraídos a partir de hojas y raíces de *D. carota* determinados mediante HPLC (sección 2.20), se consideró que la suma de las áreas bajo los *peaks* correspondientes a luteína, α -caroteno, β -caroteno y otros carotenoides observados en los cromatogramas corresponde a la concentración de carotenoides totales calculada en base a los datos de absorbancia (sección 2.19). De esta forma, la concentración de cada carotenoide se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Cx = \frac{Ct * Ax}{At}$$

En donde Cx: Concentración del pigmento; Ct: concentración de carotenoides totales determinada mediante espectrofotometría; Ax: área bajo el *peak* del pigmento; At: suma de las áreas de todos los carotenoides (Fuentes y col., 2012).

RESULTADOS

3.1 Generación de las construcciones pPSY2-DXR y pPSY2-DXS

3.1.1 Clonación de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* y del promotor de *PSY2* de *D. carota*.

Para generar las construcciones en donde los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* se encuentran dirigidos por el promotor de *PSY2* de *D. carota*, se amplificaron los genes a partir de ADNp de los vectores 35S-DXR y 35S-DXS y se les añadió sitios de restricción para la enzima *Bam*HI en los extremos 3' y 5' de las secuencias de cada gen, de acuerdo a lo señalado en materiales y métodos (sección 2.14.1). En la Figura 8 se puede observar la obtención de la banda de 1494 pb para el gen *DXR* y de 2154 pb para el gen *DXS*, para la cual se utilizó la enzima *Pfu* ADN polimerasa (sección 2.9.2), para evitar la adición de mutaciones a las secuencias, y los partidores descritos en la Tabla I.

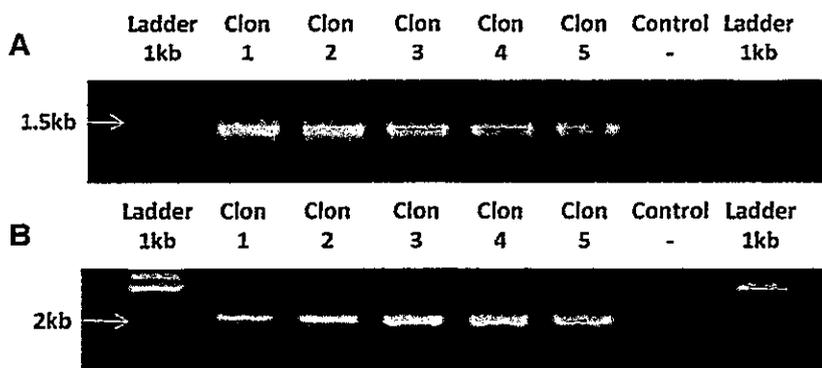


Figura 8. Amplificación de los genes *DXR* y *DXS* a partir de ADN plasmidial. PCR realizado con la enzima *Pfu* ADN polimerasa a partir de ADN plasmidial de colonias portadoras de las construcciones 35S-DXR (A) y 35S-DXS (B).

Del mismo modo, se amplificó el promotor de 769 pb de *PSY2* (pPSY2) a partir del vector pCR8-PPIpsy2 y se le añadió un sitio de restricción para la enzima *Bam*HI solo en el extremo 3' del promotor (Figura 9).



Figura 9. Amplificación del promotor de PSY2 a partir de ADN plasmidial. PCR realizado con la enzima *Pfu* ADN polimerasa a partir de ADN plasmidial de colonias portadoras de la construcción pCR8-PPIpsy2.

3.1.2 Clonación de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* y el promotor de *PSY2* en el vector de entrada pCR8

A los productos de PCR de *pPSY2*, *DXR* y *DXS* se les añadió adeninas en cada extremo 3' con la enzima *Taq* ADN polimerasa para permitir su ligación en el vector de entrada pCR8 (sección 2.14.2). Con el producto de ligación, se transformaron células de *E. coli* quimiocompetentes, las cuales se sembraron en placas Petri suplementadas con espectinomicina 100 mg/L. Las colonias obtenidas fueron analizadas mediante PCR de colonias para determinar los clones que portaban los vectores generados, pCR8-pPSY2, pCR8-DXR y pCR8-DXS. En la figura 10 se observan algunas de las colonias analizadas mediante PCR. En 10A se observa que todas las colonias analizadas para la construcción pCR8-DXR poseen el gen *DXR*, ya que aparece la banda del tamaño esperado (1494 pb). Sin embargo, en la figura 10B solo se aprecian dos clones, 4 y 6 que poseen el gen *DXS*, con una banda de 2154 pb. Análisis realizados a estos dos clones mediante enzimas de restricción indicaron que solo el clon 6 contenía los sitios de restricción adecuados (imagen no mostrada), por lo que fue seleccionado para experimentos posteriores. Finalmente, todos los clones analizados para la construcción pCR8-pPSY2 resultaron poseer el vector, como se aprecia en la figura 10C al aparecer una banda de 769 pb.

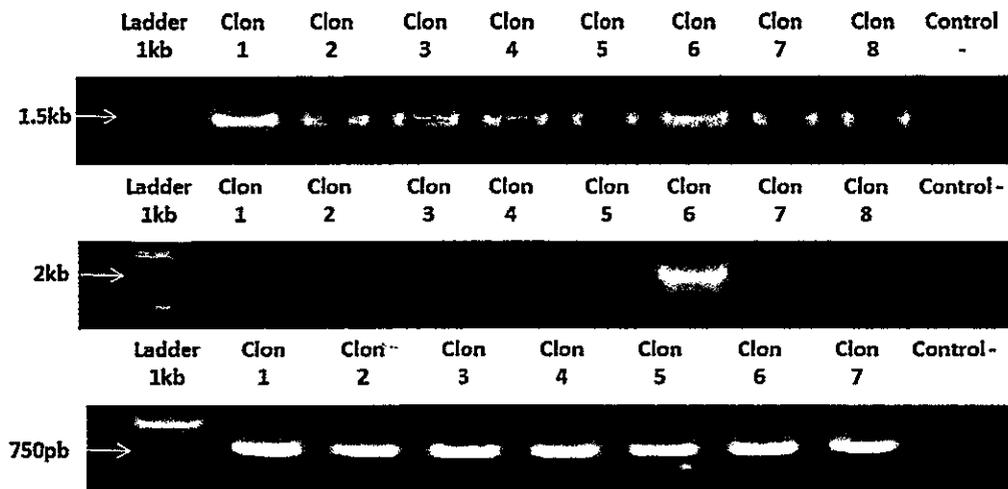


Figura 10. PCR de colonias pCR8-DXR, pCR8-DXS y pCR8-pPSY2. Análisis mediante PCR realizado a colonias de *E. coli* transformadas con las construcciones (A) pCR8-DXR, (B) pCR8-DXS y (C) pCR8-pPSY2.

En el diseño de estos vectores solo es importante que en el vector pCR8-pPSY2 el promotor de *PSY2* se encuentre en sentido con respecto los sitios de recombinación, ya que es en este vector en donde se ligarán los genes *DXR* y *DXS*. Para determinar la orientación en la que se clonó el promotor de *PSY2* en el vector pCR8, se purificó ADNp del vector pCR8-pPSY2 a partir de los clones de *E. coli* transformados con esta construcción y se realizó una digestión enzimática con la enzima *BsfYI* (*Xho*II). Esta enzima posee 4 sitios de restricción en el vector pCR8, pero no corta al promotor de *PSY2*. Sin embargo dos de los sitios de restricción se encuentran separados por 11 pb, por lo que se podrían apreciar sólo 3 fragmentos en un gel de agarosa producto de la digestión. Por lo tanto, si el pPSY2 se encuentra en sentido respecto al sitio de recombinación attL1, se observarán bandas de 2102, 1080 y 397 pb. En la figura 11 se aprecia que de las 8 colonias analizadas, solo una de ellas, el clon 7, contenía los sitios de restricción correctos para la enzima *BsfYI*, de tal forma que se generaban los tres fragmentos esperados, indicando que en este clon el promotor de *PSY2* se clonó en sentido.

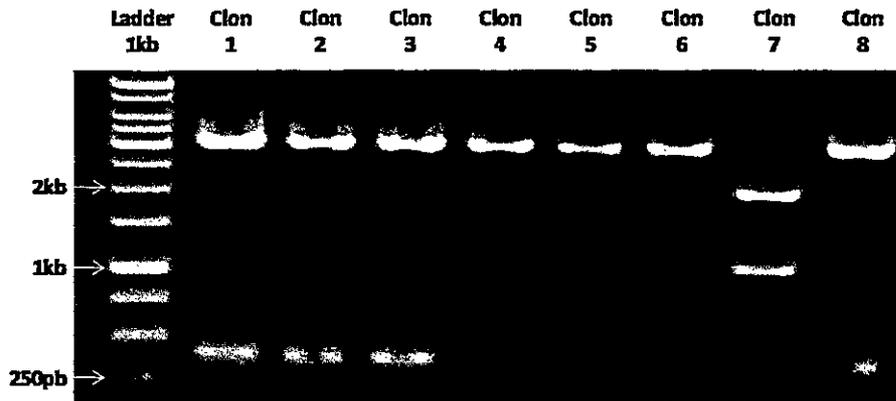


Figura 11. Digestión enzimática de clones pCR8-pPSY2 con la enzima XhoI. Digestión enzimática realizada con la enzima XhoI (BstYI) a clones portadores del vector pCR8-pPSY2.

3.1.3 Ligación de los genes *DXR* y *DXS* en el vector pCR8-pPSY2

Una vez generados los vectores pCR8-DXR, pCR8-DXS y pCR8-pPSY2, estos fueron purificados a partir de *E. coli* y mediante digestión enzimática se liberaron los genes *DXR* y *DXS* desde sus vectores y se linearizó el vector pCR8-pPSY2. En la figura 12 se muestra la purificación de las bandas obtenidas luego de la digestión de los vectores con la enzima *Bam*HI. Se observa una banda correspondiente al gen *DXS* (2154 pb), otra que corresponde al vector pCR8-pPSY2 linearizado (3592 pb) y una última banda que corresponde al gen *DXR* (1494 pb).

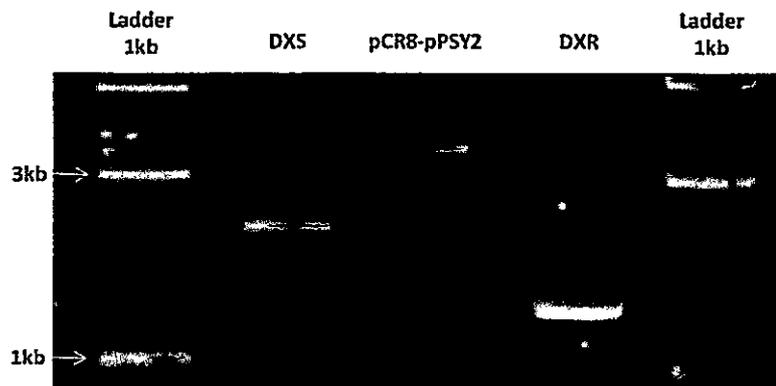


Figura 12. Purificación de las bandas correspondientes a los genes *DXR* y *DXS* y al promotor de *PSY2*. Purificación de las bandas liberadas luego de la digestión de los vectores pCR8-DXS, pCR8-pPSY2 y pCR8-DXR con la enzima *Bam*HI.

Posteriormente, se procedió a ligar los genes *DXR* y *DXS* en el vector linearizado pCR8-pPSY2 de acuerdo a lo señalado en materiales y métodos (sección 2.14.3) y a transformar células de *E. coli* quimiocompetentes con el producto de estas ligaciones. Las colonias de *E. coli* obtenidas luego de la ligación fueron analizadas mediante PCR de colonias. Para la realización de este PCR se utilizó el partidador directo del promotor de *PSY2* (ppPSY2) y los partidores reversos de *DXR* y *DXS* (B-DXR R y B-DXS R), para realizar de esta forma un PCR direccional y determinar inmediatamente las colonias en las que los genes *DXR* y *DXS* habían sido clonados en sentido con respecto al promotor de *PSY2*. En la figura 13 se muestran algunas de las colonias analizadas. Para la construcción pPSY2-DXR se esperaba obtener una banda de 2263 pb, observándose en la figura 13A 3 colonias que poseen una banda de ese tamaño (Clon 3, Clon 8 y Clon 14), mientras que para la construcción pPSY2-DXS se esperaba una banda de 2923 pb, observándose en la figura 13B 2 colonias que poseen una banda del tamaño esperado (Clon 1 y Clon 3).

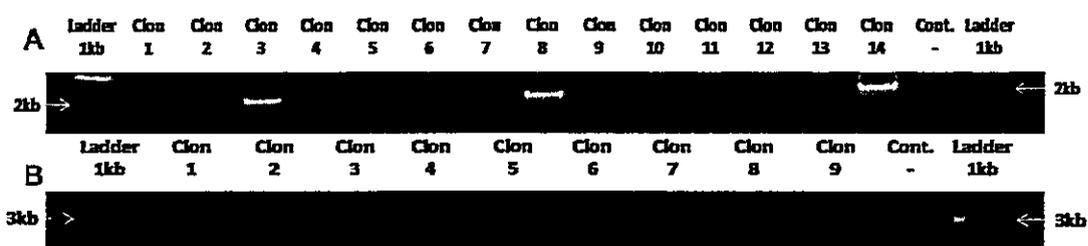


Figura 13. PCR direccional realizado a las colonias pCR8-pPSY2::DXR y pCR8-pPSY2::DXS. PCR direccional realizado a las colonias de *E. coli* transformadas con el producto de la ligación entre (A) pCR8-pPSY2 y *DXR* y (B) pCR8-pPSY2 y *DXS*.

A los clones obtenidos de esta forma se les extrajo ADN plasmidial y se seleccionaron enzimas de restricción que permitieran asegurar el sentido en el que se ligaron los genes *DXR* y *DXS*. En la Tabla III se indica el nombre, la combinación de enzimas utilizadas y el tamaño de las bandas esperadas al realizar la digestión enzimática para cada construcción.

Tabla III. Tamaño de las bandas esperadas al digerir los vectores pCR8-pPSY2::DXR y pCR8-pPSY2::DXS con diferentes enzimas de restricción.

Vector	Enzimas	Bandas (pb) en sentido	Bandas (pb) en antisentido
pCR8-pPSY2::DXR	<i>Bam</i> HI	1500, 3592	1500, 3592
pCR8-pPSY2::DXR	<i>Xho</i> I+ <i>Ssp</i> I	1140, 2372, 1568	1568, 1576, 2400
pCR8-pPSY2::DXS	<i>Ssp</i> I	816, 4924	2560, 3180
pCR8-pPSY2::DXS	<i>Bam</i> HI	2160, 3580	2160, 3580

En la Figura 14 se observa el resultado de las digestiones enzimáticas realizadas a los clones transformados con las construcciones pPSY2-DXR y pPSY2-DXS. De acuerdo a lo indicado en la Tabla III, en 14A se observa que los clones 8 y 14 poseen los tamaños de banda esperados para el vector pPSY2-DXR en sentido, mientras que en 14B se observa que ambos clones poseen los tamaños de banda esperados para pPSY2-DXS.

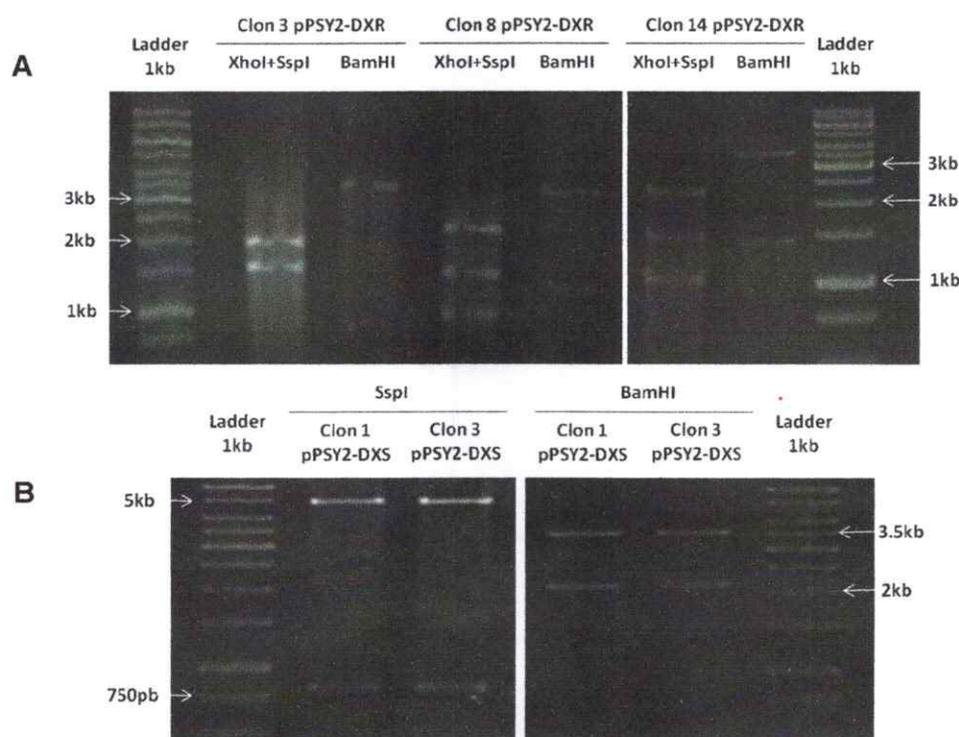


Figura 14. Digestión enzimática realizada a las colonias pCR8-pPSY2::DXR y pCR8-pPSY2::DXS. Digestión enzimática de colonias transformadas con los vectores (A) pCR8-pPSY2::DXR y (B) pCR8-pPSY2::DXS para determinar la direccionalidad del gen respecto al promotor de PSY2.

En la figura 15 se muestra el esquema de los dos vectores generados, pCR8-pPSY2::DXR y pCR8-pPSY2::DXS.

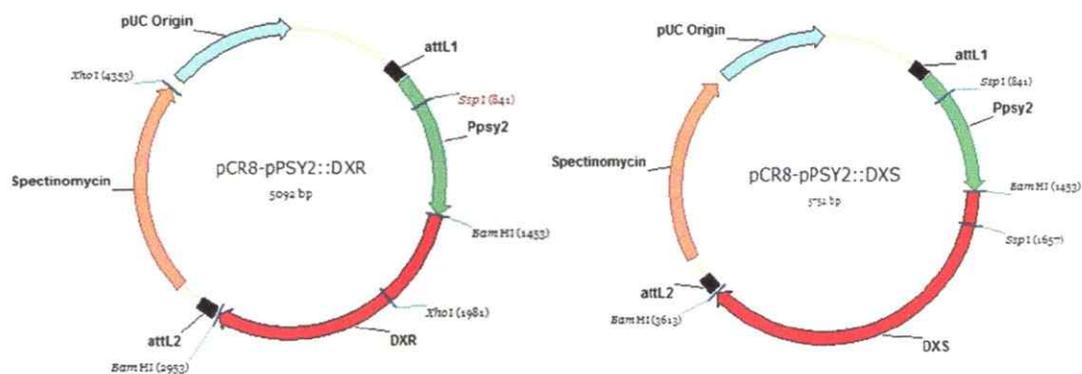


Figura 15. Construcciones pCR8-pPSY2::DXR y pCR8-pPSY2::DXS. Vectores generados luego de la ligación de los genes *DXR* y *DXS* en el vector pCR8-pPSY2.

Posteriormente, se eligieron 2 clones de cada construcción y se enviaron a secuenciar. Los resultados de la secuenciación fueron analizados y no se encontraron mutaciones respecto a los genes *DXR* y *DXS* de la base de datos para ninguno de los clones secuenciados, por lo que se seleccionó un clon de cada construcción para posteriores experimentos.

3.1.4 Generación de los vectores de destinación pMDC107-pPSY2::DXR y pMDC107-pPSY2::DXS mediante recombinación Gateway

Una vez obtenidos los clones de entrada pCR8-pPSY2::DXR y pCR8-pPSY2::DXS, se realizó la recombinación de estos vectores con el vector de destinación pMDC107 (Curtis y Grossniklaus, 2003), tal como se indica en materiales y métodos (sección 2.14.4). En la figura 16 se observan algunos de los clones obtenidos al transformar células de *E. coli* con el producto de la recombinación, los cuales se crecieron en placas Petri suplementadas con kanamicina 100 mg/L. Para analizar estos clones se realizó un PCR de colonias con los partidores ppPSY2, B-DXR R y B-DXS R. En esta figura es posible observar que todos los clones analizados poseen las

construcciones pMDC107-pPSY2::DXR y pMDC107-pPSY2::DXS. Por lo tanto, se realizó una extracción de ADN plasmidial a partir de uno de estos clones y se transformaron células de *A. tumefaciens* con estas construcciones (sección 2.3.2).

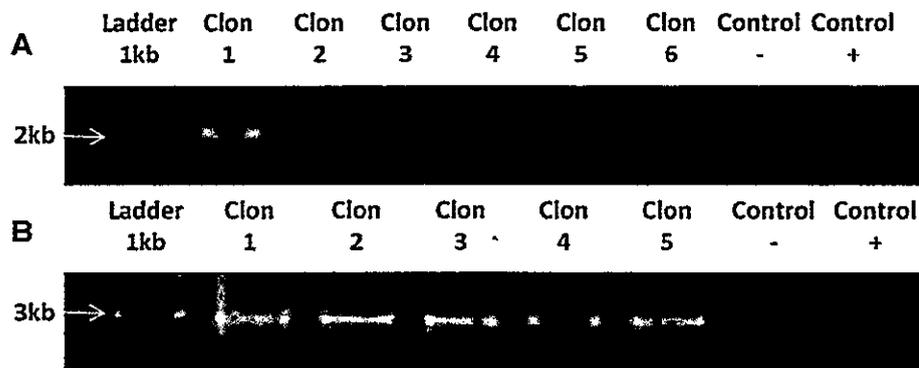


Figura 16. PCR realizado a las colonias pMDC107-pPSY2::DXR y pMDC107-pPSY2::DXS. PCR realizado a colonias de *E. coli* transformadas con los vectores (A) pMDC107-pPSY2::DXR y (B) pMDC107-pPSY2::DXS.

3.1.5 Transformación transitoria de *N. tabacum*.

Para comprobar la funcionalidad de las construcciones pMDC107-pPSY2::DXR y pMDC107-pPSY2::DXS, es decir que el promotor de *PSY2* sea capaz de dirigir correctamente la expresión de los genes *DXR* y *DXS* y que *GFP* se encuentre en marco de lectura con la secuencia de estos genes, se transformó transitoriamente hojas de *N. tabacum* con estos vectores (sección 2.12) y las muestras recolectadas fueron observadas bajo el microscopio de epifluorescencia (sección 2.17). En la Figura 17 se observan fotografías tomadas a partir de las hojas infiltradas. Al observar las fotografías tomadas con el filtro Cy3 (17A y 17G), es posible apreciar un patrón puntuado de color rojo que corresponde a la autofluorescencia de la clorofila en los cloroplastos. Este patrón puntuado también se aprecia en la fotografía tomadas con el filtro FITC (17B y 17H), el cual permite observar la fluorescencia de color verde de *GFP* en las hojas infiltradas con las construcciones generadas, sin embargo, este patrón no se aprecia en las hojas infiltradas con el vector vacío pMDC107 (17F). Al realizar la

sobreposición de las imágenes 17A y 17G con las imágenes 17B y 17H se aprecia que la autofluorescencia de la clorofila colocaliza con la fluorescencia de GFP, observándose el patrón puntuado de color amarillo-naranja (17C y 17I). Esto indica que existe expresión de GFP en los cloroplastos de las hojas transformadas con estas construcciones, lo cual es corroborado cuando se hace la sobreposición de imágenes tomadas en campo claro (17D y 17J) con las imágenes 17C y 17I, en donde se puede ver que el patrón puntuado colocaliza con los cloroplastos observados en campo claro (17E y 17K). Además, fotografías tomadas a hojas de tabaco infiltradas con una construcción control, en donde el promotor constitutivo 35SCaMV dirige la expresión de GFP, indican que GFP localiza en núcleo y citoplasma (17L), y no se observa un patrón puntuado. En conjunto, estos resultados indican que: 1) DXR y DXS se están expresando, 2) que ambos genes se encuentran en marco de lectura con GFP y 3) las proteínas están localizadas en los cloroplastos, tal como se espera para estas enzimas pertenecientes a la ruta del MEP. De esta manera se comprobó que ambas construcciones son funcionales y fueron utilizadas para futuros experimentos.

3.2 Expresión en *D. carota* de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* bajo el promotor de la enzima *PSY2* de *D. carota*.

3.2.1 Transformación estable de *D. carota* con las construcciones pMDC107-pPSY2-DXR y pMDC107-pPSY2-DXS.

Luego de comprobar la funcionalidad de los vectores pMDC107-pPSY2::DXR y pMDC107-pPSY2::DXS, se transformaron explantes de *D. carota* con estas construcciones. La transformación estable y embriogénesis somática de explantes de *D. carota* se realizó de acuerdo a lo señalado en materiales y métodos (sección 2.11). Una vez que los explantes se encontraban en su cuarta semana en Medio III, luego de aproximadamente 24 semanas post-transformación, fueron traspasados a placas con

Medio III fresco. Lamentablemente, debido a una falla en el sistema de esterilización de los medios, los explantes se contaminaron y no fue posible rescatarlos.

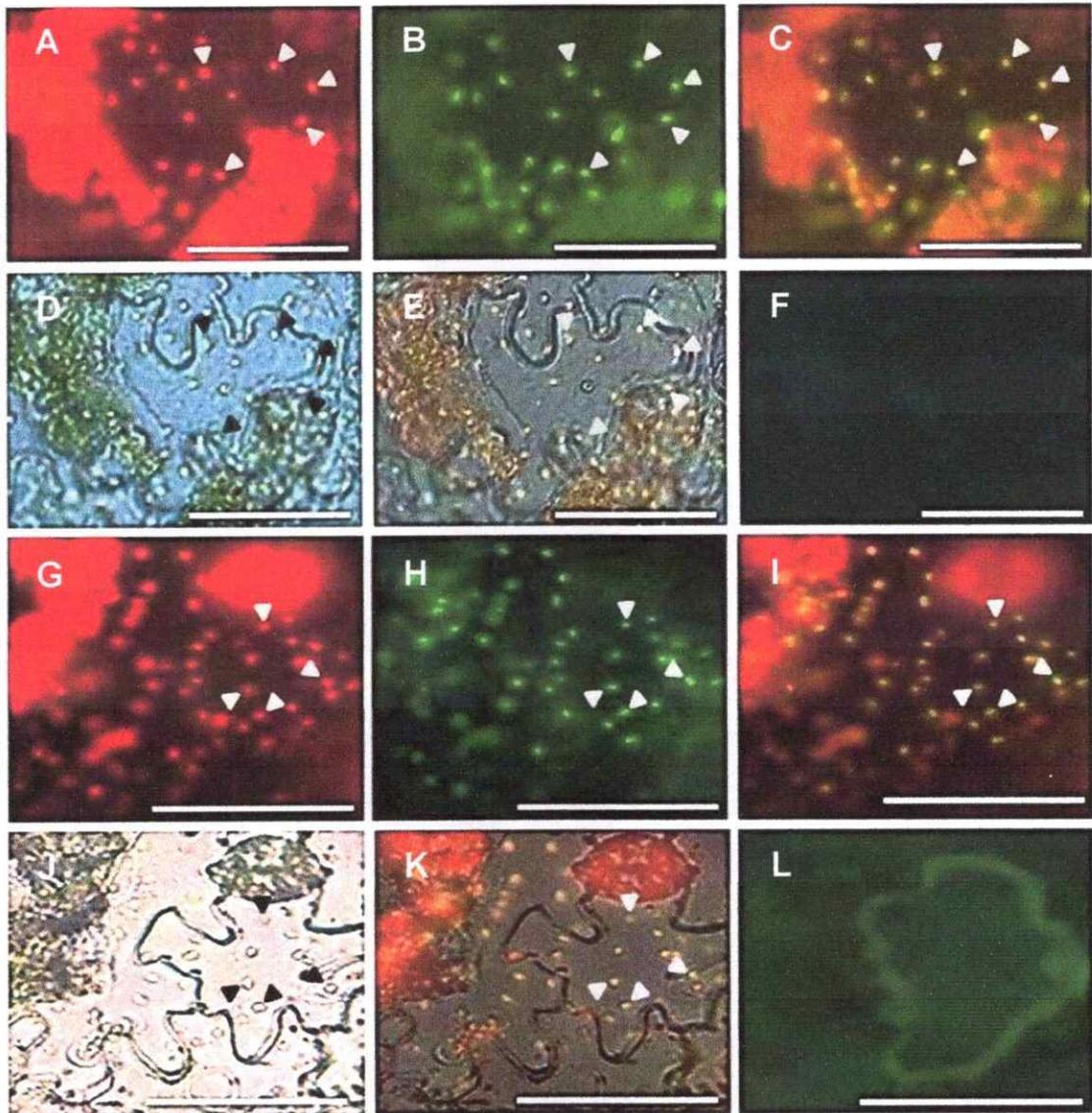


Figura 17. Expresión transitoria de GFP fusionado a DXR y a DXS en células epidermales de hojas de tabaco. Microscopía de epifluorescencia de hojas de tabaco transformadas transitoriamente con las construcciones pPSY2::DXR (A-E) y pPSY2::DXS (G-K), observándose el patrón punteado característico de cloroplastos. **A y G)** Autofluorescencia roja de la clorofila en cloroplastos, **B y H)** fluorescencia verde de GFP, **C)** sobreposición de A y B, **D)** campo claro de A-C, **E)** sobreposición de C y D, **F)** autofluorescencia verde basal de la clorofila en cloroplastos, **I)** sobreposición de G y H, **J)** campo claro de G-I, **K)** sobreposición de I y J, **L)** hojas de tabaco transformadas transitoriamente con la construcción 35S-GFP. Aumento: 200x. Barra: 100µm. Las flechas indican la localización de algunos cloroplastos.

3.3 Expresión en *D. carota* de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* bajo el promotor constitutivo 35SCaMV.

3.3.1 Transformación de células de *A. tumefaciens* con los vectores 35S-DXR y 35S-DXS.

En vista de la pérdida de los embriones pPSY2-DXR y pPSY2-DXS, se continuó con la transformación de *D. carota* con los genes *DXR* y *DXS* bajo el promotor 35S. Para ello, se transformaron células de *A. tumefaciens* con los vectores 35S-DXR y 35S-DXS (Figura 5) de acuerdo a lo indicado en materiales y métodos (sección 2.3.2), utilizando 100 mg/L de espectinomycin como antibiótico de selección de los vectores. Para determinar si las colonias que se formaron en las placas Petri contenían los vectores, 5 colonias de cada construcción fueron analizadas mediante PCR de colonias (sección 2.9.3). Para el análisis de las colonias 35S-DXR se utilizaron los partidores AtDXR F y eGFP R (Tabla I), los que generan una banda de 674 pb, mientras que para las colonias 35S-DXS se utilizaron los partidores AtDXS F y eGFP R (Tabla I), que generan una banda de 1569 pb. En la Figura 18 se observa que las 5 colonias 35S-DXR analizadas poseen el vector, y solo 3 de las 5 colonias 35S-DXS poseen el vector.

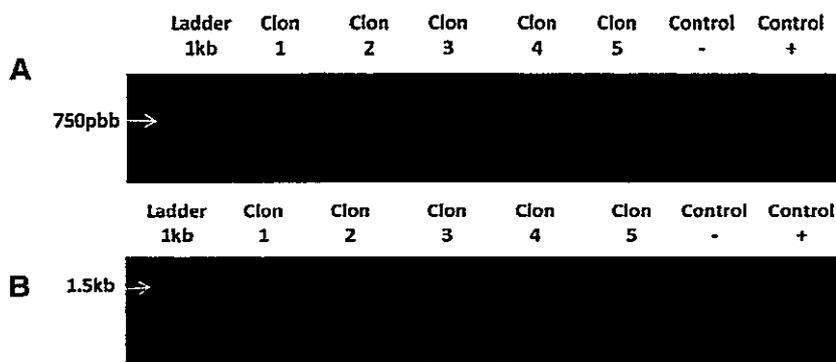


Figura 18. PCR de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con las construcciones 35S-DXR y 35S-DXS. Para la amplificación se utilizó como partidor directo aquel que hibrida en la región interna de la región codificante del gen y como partidor reverso, aquel que hibrida en la región 5' del gen eGFP. A) 35S-DXR B) 35S-DXS.

3.3.2 Embriogénesis somática de explantes de *D. carota* transformados con las construcciones 35S-DXR y 35S-DXS.

La transformación y posterior embriogénesis somática de explantes de *D. carota* se realizó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos (sección 2.11). Tanto la transformación de los explantes como la regeneración de plantas de *D. carota* a partir los embriones se realizó durante la unidad de investigación que realicé en el semestre anterior a la iniciación de este seminario de título. Por lo tanto, al comenzar mi seminario de título contaba con alrededor de 50 plantas de *D. carota* regeneradas a partir de explantes transformados con las construcciones 35S-DXR y 35S-DXS. En la Figura 19 se ilustra el proceso de embriogénesis somática que se realizó para regenerar plantas de *D. carota* a partir explantes transformados con estas construcciones. En 19A se observa el inicio del engrosamiento de los explantes luego de una semana en medio MS I. Posteriormente, luego de 5 semanas de la transformación se observa la aparición de tejido pre-embriogénico en los explantes en medio MS II (Figura 19B). En 19C es posible observar la aparición de embriones en medio MS III luego de 10 semanas post-transformación. Estos embriones fueron segregados luego de 14 semanas post-trasformación, como se observa en la figura 19D. La segregación de los embriones permite promover la regeneración de plántulas a partir de ellos (Figura 19E), y su posterior desarrollo (Figura 19F). Una vez que las plántulas alcanzaron un tamaño adecuado, estas fueron traspasadas a frascos con medio MS IV para permitir su enraizamiento y elongación (Figura 19G). Estas plántulas se mantuvieron en frascos hasta que alcanzaron un tamaño de aproximadamente 5cm de altura, momento en que fueron traspasadas a tierra (Figura 19H). En la Tabla II es posible apreciar la composición de cada medio MS.

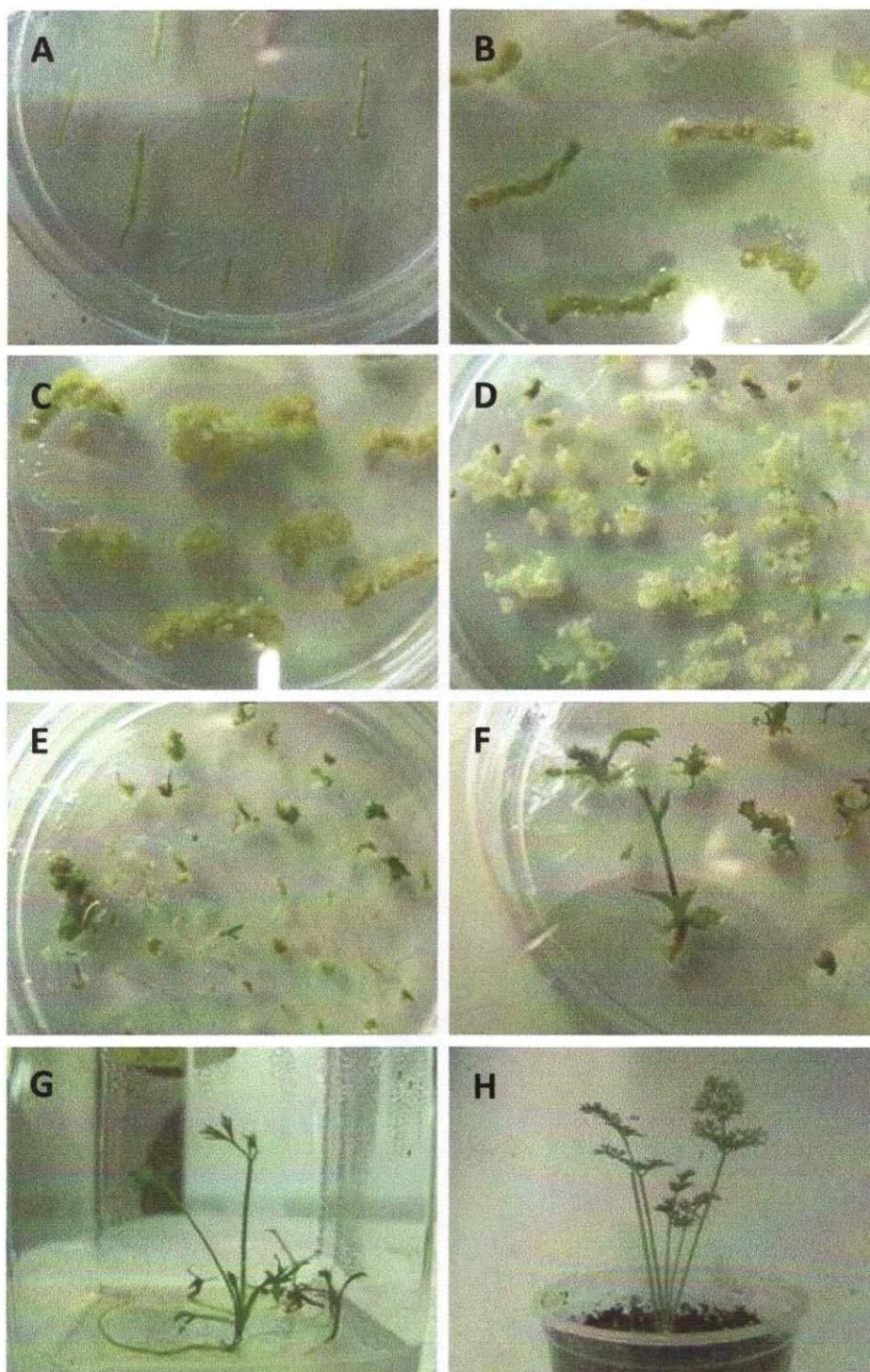


Figura 19. Embriogénesis somática en *D. carota* . A) MSI, 1 semana post-transformación; B) MSII, 5 semanas post-transformación; C) MSIII, 10 semanas post-transformación; D) MSIII, segregación de embriones a las 14 semanas post-transformación; E) Aparición de los primeros brotes, 18 semanas post-transformación; F) Desarrollo de las plántulas en MSIV, 20 semanas post-transformación; G) Enraizamiento y elongación de las plántulas en frascos con MSIV, 24 semanas post-transformación; H) Plantas transformantes mantenidas en el invernadero.

Las plantas transformantes fueron seleccionadas en base a la capacidad de sobrevivir en medio MS suplementado con 1 mg/L del herbicida Glufosinato de amonio (Basta®) (PhytoTechnology Laboratories). En el primer medio en cual fueron depositados los explantes luego de la transformación, vale decir el medio MSi, no se incluyó el agente de selección debido a que el proceso de transformación debilita fuertemente a los explantes y la adición temprana del agente de selección resultó en una mortalidad del 100% de los explantes. De esta forma, solo en medio MSii se comenzó agregando la mitad de la concentración final del agente selector, vale decir 0,5 mg/L de Basta®, y en el medio MSiii se agregó 1 mg/L de Basta, la cual se mantuvo hasta el medio MSiv.

3.4 Análisis molecular y bioquímico de la zanahorias regeneradas a partir de la transformación de explantes con las construcciones 35S-DXR y 35S-DXS

3.4.1 Identificación de las líneas de *D. carota* portadoras de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana*

Para determinar si las plantas regeneradas a partir de explantes de *D. carota* transformadas con las construcciones 35S-DXR y 35S-DXS portaban los genes *DXR* y *DXS* respectivamente, se extrajo ADN genómico (sección 2.16) a partir de las hojas de las plantas de zanahorias regeneradas de cada construcción y se realizó un PCR convencional (sección 2.9.1) para amplificar un fragmento de 232 pb para el caso de líneas *DXR* y de 588 pb para líneas *DXS* que abarca la región final de los genes *DXR* y *DXS* hasta el inicio de la región codificante de eGFP. En la figura 20 se observan las líneas que amplificaron un tamaño de banda esperado al realizar un PCR convencional con los partidores qDXS F y eGFP R (232 pb) y qDXR F y eGFP R (588 pb). Como control positivo del PCR se utilizó 1 uL de una alícuota que contenía células de *A. tumefaciens* transformadas con las construcciones 35S-DXR y 35S-DXS, y como

control negativo se utilizó ADN genómico extraído a partir de hojas de zanahorias silvestres. Además, como control de la calidad del ADN genómico se muestra un PCR realizado a partir del mismo ADN genómico utilizando los partidores 18S F y 18S R (196 pb) que amplifican el gen ribosomal 18S.

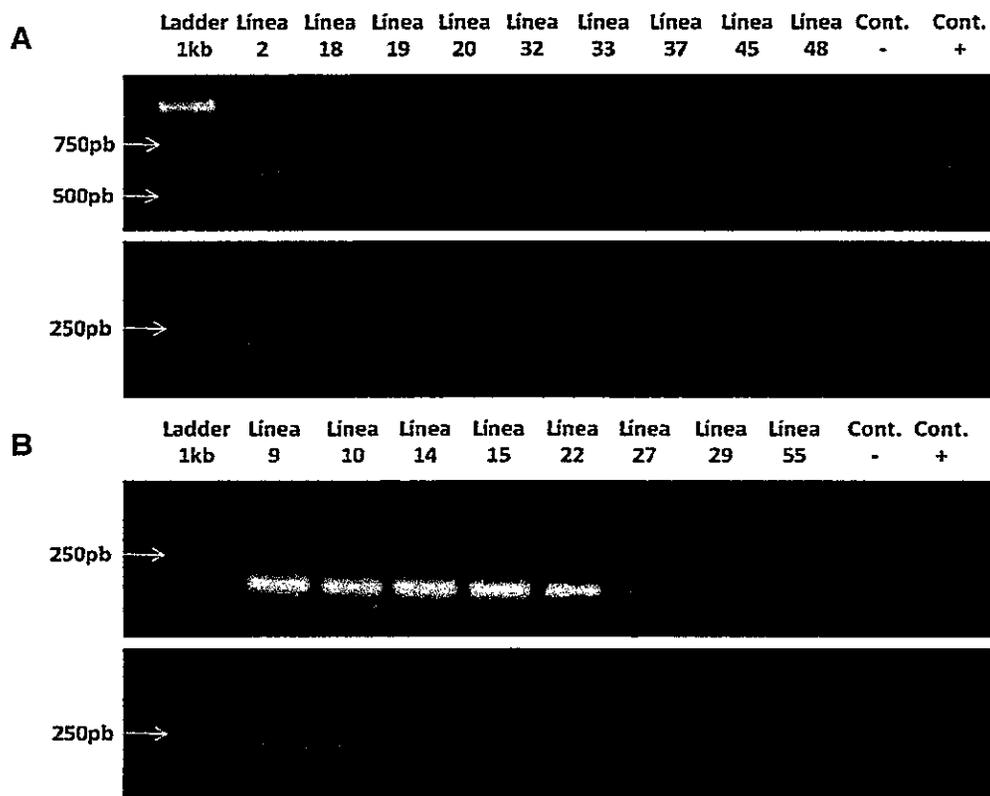


Figura 20. Identificación de líneas transgénicas de *D. carota* para los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana*. PCR realizado a partir de ADN genómico extraído de hojas de zanahorias 35S-DXR y 35S-DXS. A) Arriba, amplificación de DXR-eGFP a partir de 9 líneas 35S-DXR. Abajo, amplificación del gen 18S de las mismas líneas; B) Arriba, amplificación de DXS-eGFP a partir de 8 líneas 35S-DXR. Abajo, amplificación del gen 18S de las mismas líneas.

3.4.2 Análisis de la expresión de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* en las líneas transgénicas de *D. carota*.

Para analizar la expresión de los genes *DXR* y *DXS* en las diferentes líneas transgénicas de *D. carota*, se extrajo ARN (sección 2.15) a partir de las hojas de 6 líneas de cada construcción y se realizó un RT-PCR a cada muestra de ARN (sección

2.9.4). En la figura 21 se observa el resultado de un PCR utilizando el ADNc que fue sintetizado a partir del ARN de las líneas transgénicas. Para determinar la expresión del gen *DXR* se utilizaron los partidores qDXR F y qeGFP R, con un tamaño de banda esperado de 164 pb, mientras que para la expresión del gen *DXS* se utilizaron los partidores qDXS F y qeGFP R, con un fragmento esperado de 232 pb.

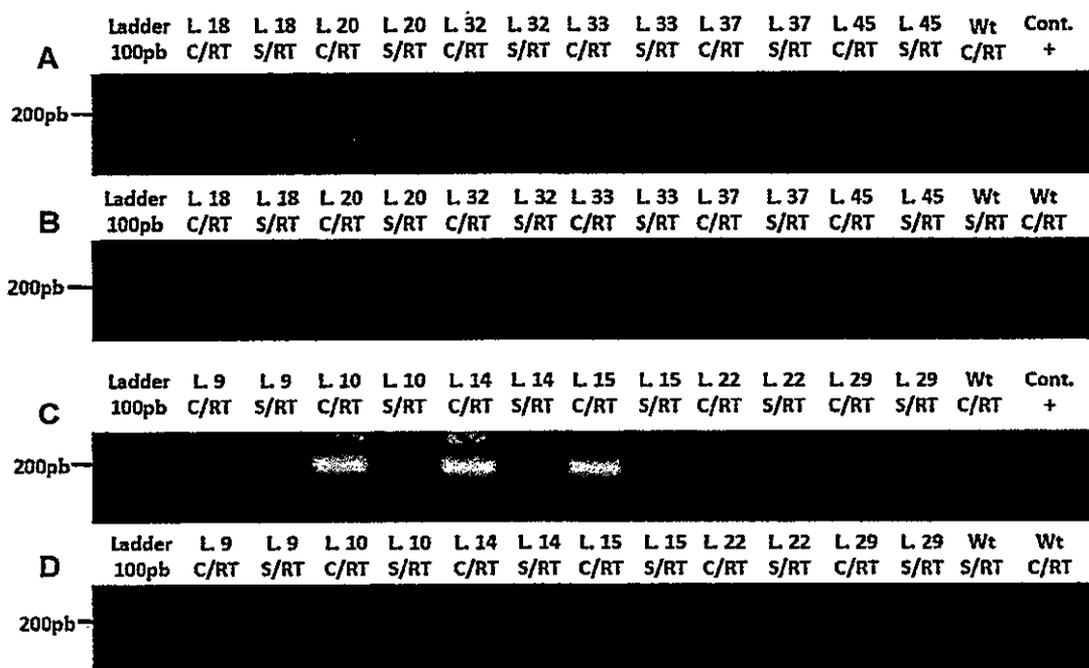


Figura 21. Expresión de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* en hojas de zanahorias 35S-*DXR* y 35S-*DXS*. PCR realizado utilizando ADNc sintetizado a partir hojas de las líneas transgénicas. A) Expresión de *DXR*-eGFP en 6 líneas 35S-*DXR*, B) expresión del gen 18S en las mismas líneas, C) expresión de *DXS*-eGFP en 6 líneas 35S-*DXS*, D) expresión del gen 18S en las mismas líneas. C/RT: muestras de ADNc, S/RT: control de la síntesis de ADNc en el cual se utilizó RNA como templado para verificar la ausencia de ADNg contaminante

3.4.3 Cuantificación de clorofila y carotenoides totales

Luego de determinar que las líneas transgénicas de *D. carota* expresaban los genes *DXR* y *DXS*, se realizó la extracción de pigmentos a partir de hojas y raíces de las 6 líneas de cada construcción (sección 2.18). Los pigmentos extraídos de esta forma fueron resuspendidos en acetona, se midió la absorbancia de cada muestra a 750, 662, 645 y 470 nm y se determinó la concentración de clorofila a, clorofila b y

carotenoides totales utilizando las fórmulas descritas en materiales y métodos (sección 2.19). En la figura 22 se grafican los niveles de clorofila a y clorofila b obtenidos para los extractos de pigmentos a partir de las hojas de 6 líneas transgénicas de *D. carota* para cada construcción, y en la figura 23 se observan los niveles de carotenoides totales obtenidos para los extractos a partir de las hojas y raíces de las mismas líneas.

Para determinar a un nivel más general el efecto que produce la expresión de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* en *D. carota*, en la figura 24 se observan los niveles promedio de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales de las 6 líneas transgénicas de *D. carota* para cada construcción. En esta figura es posible apreciar que en las hojas de *D. carota*, la expresión de los genes *DXR* y *DXS* produce un aumento significativo en los niveles de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales. Este aumento se ve reflejado en la tabla IV, en donde se aprecia que para las plantas que expresan el gen *DXR*, los niveles de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales aumentan en promedio 1,29, 1,41 y 1,26 veces, respectivamente, con respecto a las plantas silvestres, mientras que las plantas de *D. carota* que expresan el gen *DXS* ven aumentados sus niveles de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales en promedio 1,76, 1,56 y 1,71 veces, respectivamente. Sin embargo, solo la expresión de *DXS* logró aumentar significativamente los niveles de carotenoides totales en las raíces de las zanahoria, mientras que la expresión de *DXR* no provocó cambios significativos, tal como se observa en la Figura 24. El aumento en los niveles de carotenoides totales en las raíces de zanahorias que expresan el gen *DXS* de *A. thaliana* fue en promedio de 1,66 veces con respecto a las plantas silvestres, tal como se aprecia en la Tabla IV.

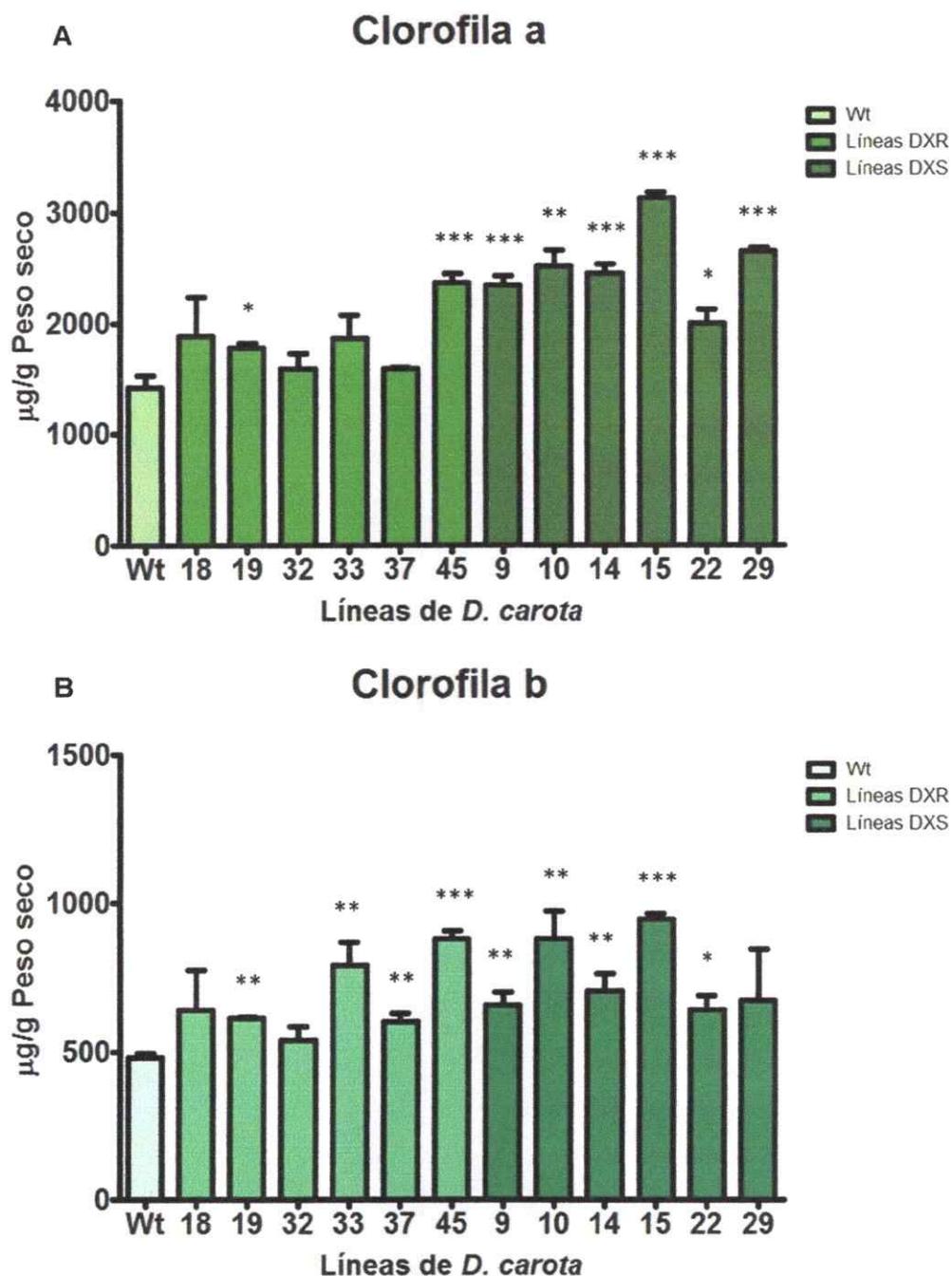


Figura 22. Cuantificación de los niveles de clorofila a y clorofila b en hojas de las líneas transgénicas 35S-DXR y 35S-DXS mediante espectrofotometría. A) Niveles de clorofila a en las hojas de 6 líneas de zanahorias 35S-DXR y 35S-DXS, B) niveles de clorofila b en las hojas de las mismas líneas 35S-DXR y 35S-DXS. Wt: medición de tres plantas silvestres. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de tres mediciones independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas silvestres, y fueron determinadas mediante Test de T no pareado de dos colas. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

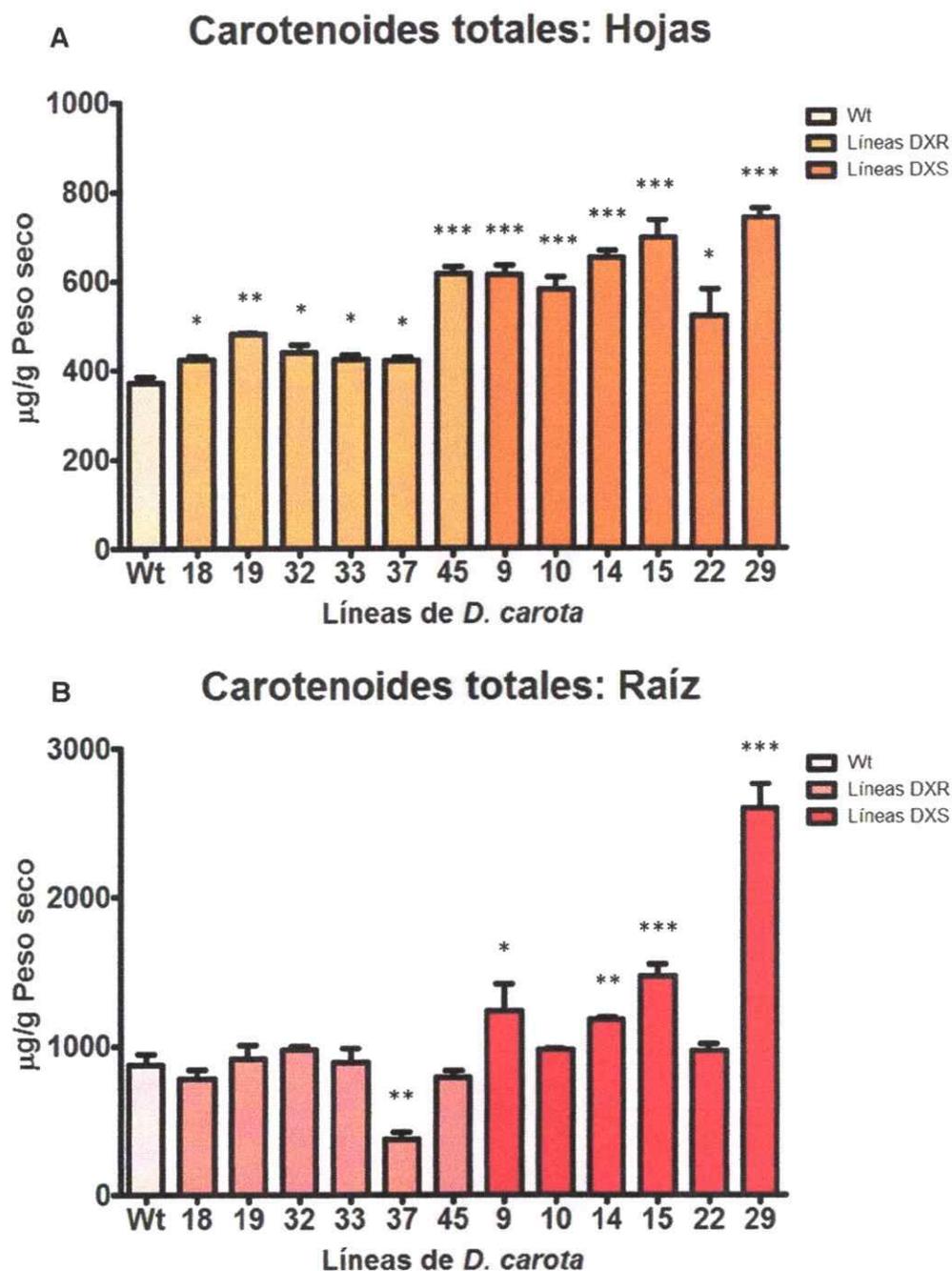


Figura 23. Cuantificación de los niveles de carotenoides totales en hojas y raíces de las líneas transgénicas 35S-DXR y 35S-DXS mediante espectrofotometría. A) Niveles de carotenoides totales en las hojas de 6 líneas de zanahorias 35S-DXR y 35S-DXS, B) niveles de carotenoides totales en las raíces de las mismas líneas 35S-DXR y 35S-DXS. Wt: plantas silvestres... Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de tres mediciones independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas silvestres, y fueron determinadas mediante Test de T no pareado de dos colas. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

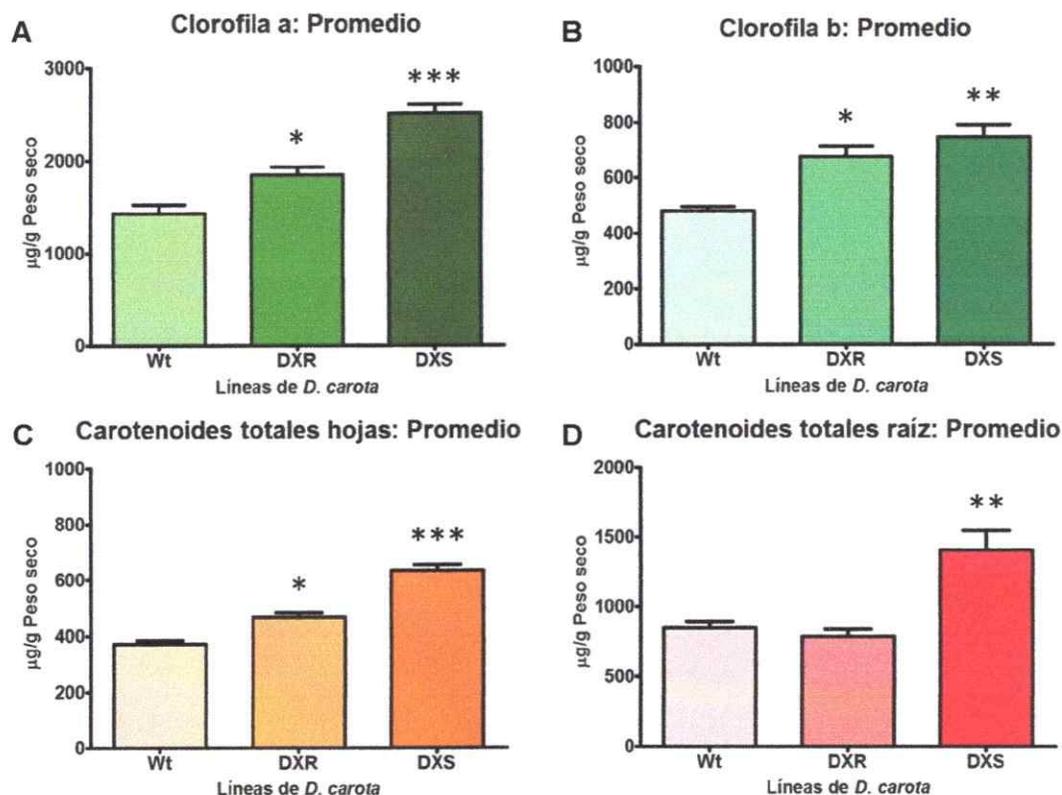


Figura 24. Promedio de los niveles de pigmentos en hojas y raíces de las líneas transgénicas de *D. carota* 35S-DXR y 35S-DXS. Cuantificación de los niveles promedio de clorofila a (A) y clorofila b (B) en las hojas de 6 líneas transgénicas 35S-DXR y 35S-DXS de *D. carota* y de los niveles promedio de carotenoides totales presentes en las hojas (C) y en la raíz (D) de las mismas líneas. Wt: muestra de tres plantas silvestres. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de las mediciones independientes realizadas a 6 líneas por cada construcción. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas silvestres, y fueron determinadas mediante Test de T no pareado de dos colas. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabla IV. Niveles promedio de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales en las líneas transgénicas de *D. carota* DXR y DXS con respecto a las plantas silvestres

	Hojas			Raíz
	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides totales	Carotenoides totales
Wt	1,00	1,00	1,00	1,00
Líneas DXR	1,29	1,41	1,26	0,93
Líneas DXS	1,76	1,56	1,71	1,66

3.4.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia (High-performance liquid chromatography HPLC)

Para evaluar el perfil de carotenoides de las muestras de pigmentos extraídos a partir de hojas y raíces de las líneas transgénicas (sección 3.4.3), se utilizaron 20 uL de cada extracto y se analizaron mediante HPLC (sección 2.20). En la figura 25 se observa el perfil de carotenoides presentes en las hojas de 6 líneas transgénicas para cada construcción, mientras que en la figura 26 se observa el perfil de carotenoides presentes en las raíces de las mismas líneas transgénicas.

Del mismo modo que se hizo con los niveles de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales, para determinar de forma general el efecto que produce la expresión de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* en el perfil de carotenoides de *D. carota*, en la figura 27 se observan los niveles promedio de la composición de carotenoides presentes en las hojas y raíces de las 6 líneas transgénicas 35S-*DXR* y 35S-*DXS*. En esta figura es posible apreciar que en las hojas, las líneas que expresan los genes *DXR* y *DXS* no presentan un cambio significativo en los niveles de luteína, que los niveles de α -caroteno presentan un aumento significativo en ambas líneas y que solo las líneas que expresan el gen *DXS* aumentan significativamente los niveles de β -caroteno. Por otro lado, es posible apreciar que en las raíces solo las líneas que expresan el gen *DXS* presentan un aumento significativo en los niveles de α -caroteno y β -caroteno. En la Tabla V se puede observar cuantitativamente el aumento promedio que presentan los carotenoides presentes en las hojas y raíces de las líneas transgénicas de *D. carota*.

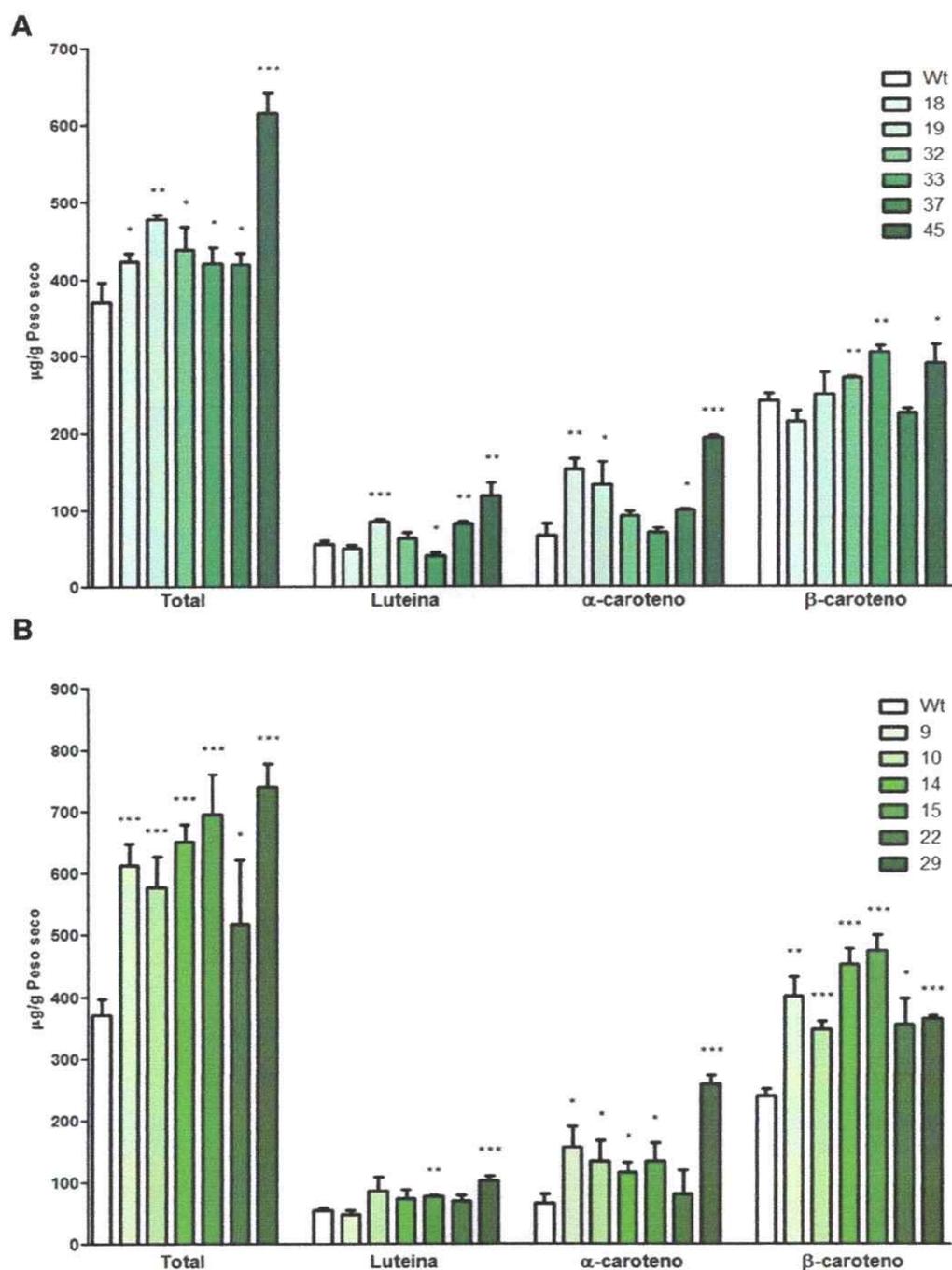


Figura 25. Composición de carotenoides en las hojas de líneas transgénicas de *D. carota* 35S-DXR y 35S-DXS. Los carotenoides fueron extraídos a partir de las hojas de 6 líneas transgénicas de cada construcción, y el perfil de carotenoides se determinó mediante espectrofotometría y HPLC. A) Perfil de carotenoides de las hojas de líneas 35S-DXR, B) Perfil de carotenoides de las hojas de líneas 35S-DXS. Para determinar la concentración de cada carotenoide, se consideró que la suma de las áreas bajo los peaks correspondientes a luteína, α-caroteno, β-caroteno y otros carotenoides determinadas mediante HPLC corresponde a la concentración de carotenoides totales determinada mediante espectrofotometría. De esta forma, se determinó la concentración de cada carotenoide mediante la regla de proporciones.

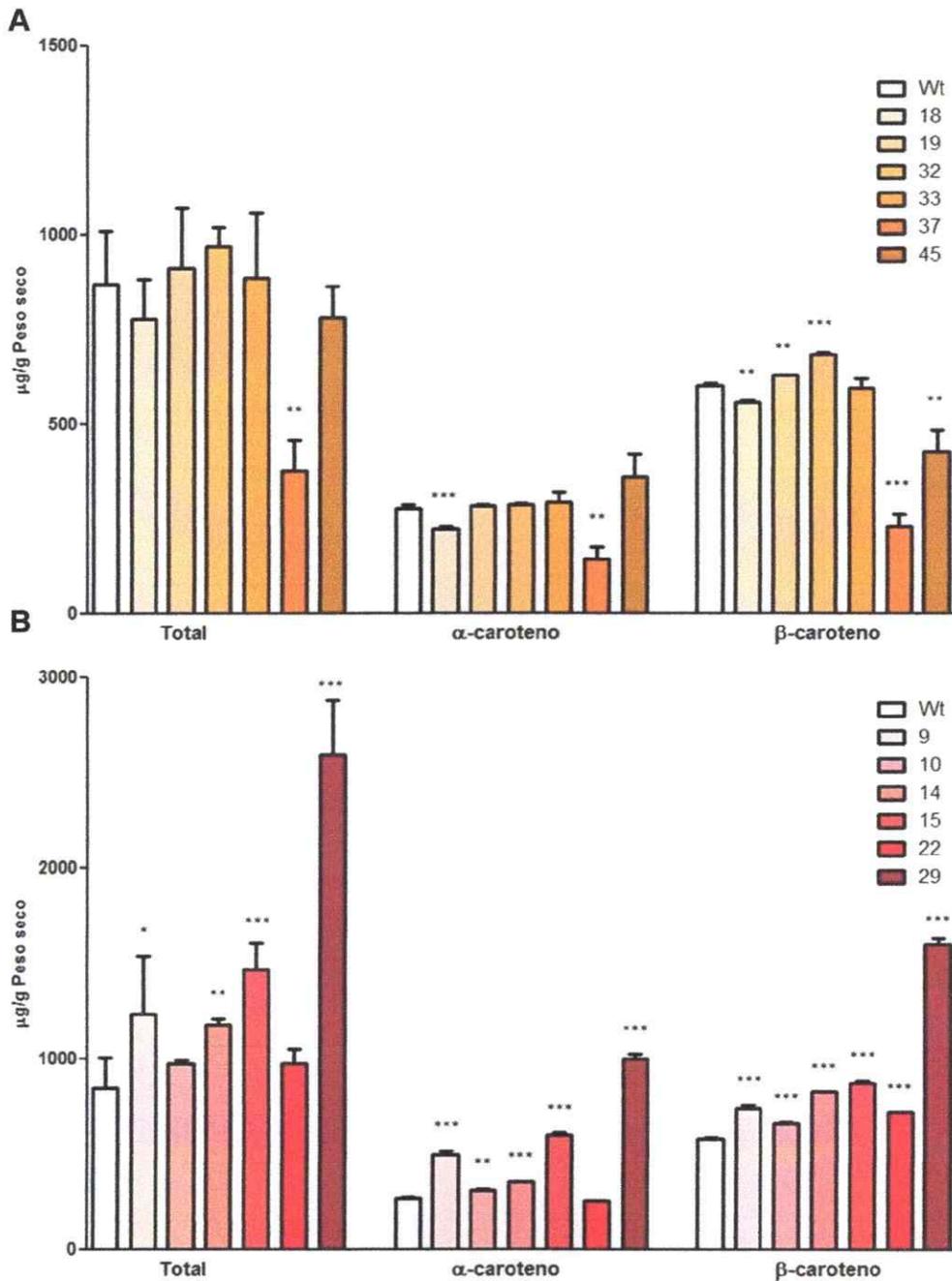


Figura 26. Composición de carotenoides en las raíces de líneas transgénicas de *D. carota* 35S-DXR y 35S-DXS. Los carotenoides fueron extraídos a partir de las raíces de 6 líneas transgénicas de cada construcción, y el perfil de carotenoides se determinó mediante espectrofotometría y HPLC. A) Perfil de carotenoides de las raíces de líneas 35S-DXR, B) Perfil de carotenoides de las raíces de líneas 35S-DXS. Para determinar la concentración de cada carotenoide, se consideró que la suma de las áreas bajo los peaks correspondientes a luteína, α-caroteno, β-caroteno y otros carotenoides determinadas mediante HPLC corresponde a la concentración de carotenoides totales determinada mediante espectrofotometría. De esta forma, se determinó la concentración de cada carotenoide mediante una regla de 3.

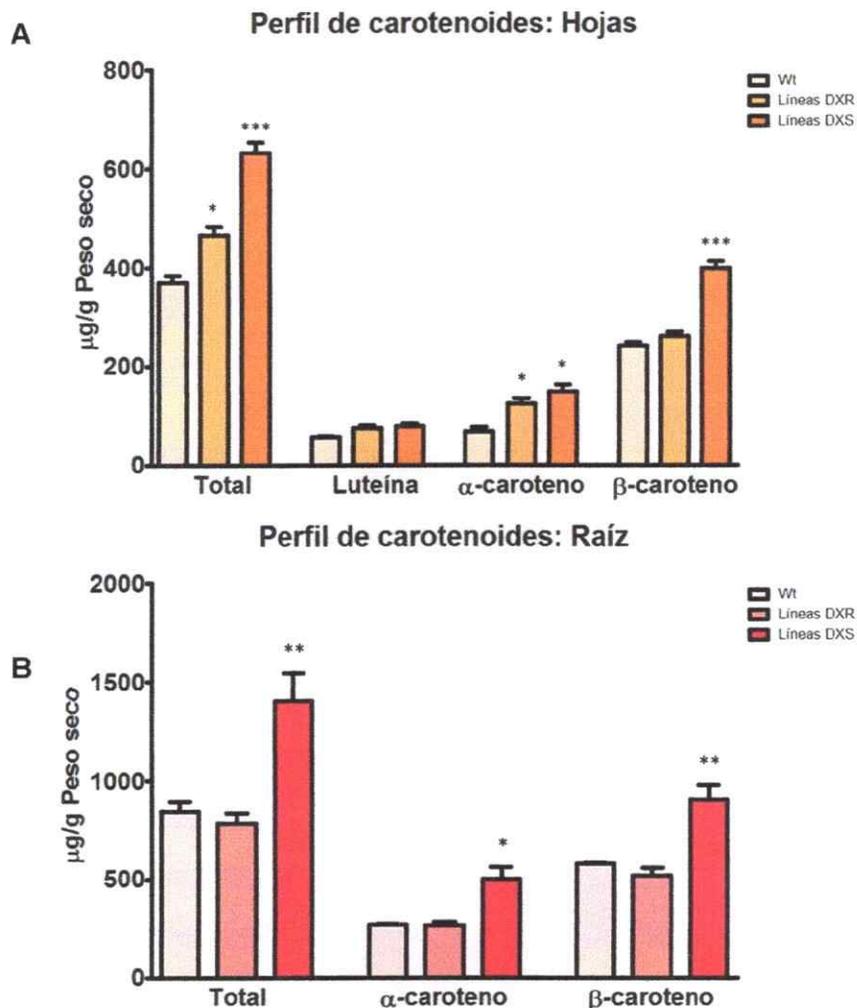


Figura 27. Composición promedio de carotenoides presentes en hojas y raíces de líneas transgénicas de *D. carota* 35S-DXR y 35S-DXS. Cuantificación promedio del perfil de carotenoides presentes en hojas (A) y raíz (B) de 6 líneas transgénicas 35S-DXR y 35S-DXS de *D. carota*. Wt: muestra de tres plantas silvestres. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de las mediciones independientes realizadas a 6 líneas por cada construcción. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas silvestres, y fueron determinadas mediante Test de T no pareado de dos colas. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabla V. Perfil de carotenoides presentes en hojas y raíces de las líneas transgénicas de *D. carota* DXR y DXS con respecto a las plantas silvestres

	Hojas			Raíz	
	Luteína	α-caroteno	β-caroteno	α-caroteno	β-caroteno
Wt	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Líneas DXR	1,30	1,85	1,08	0,99	0,90
Líneas DXS	1,38	2,21	1,65	1,87	1,56

3.4.5 Efecto en la expresión de los genes endógenos *PSY1* y *PSY2* en plantas de *D. carota* transgénicas que expresan *DXR* y *DXS* de *A. thaliana*.

Recientemente se ha demostrado que el PSY es capaz de controlar el flujo de precursores metabólicos hacia la ruta de los carotenoides, ya que un incremento en la actividad de PSY es suficiente para gatillar un aumento en la actividad de enzimas pertenecientes a la ruta del MEP, como *DXS* (Rodríguez-Villalón, 2009). De esta forma, para evaluar el efecto que produce en la expresión de los genes carotenogénicos *PSY1* y *PSY2* de *D. carota* un incremento en la expresión de los transgenes *DXR* y *DXS*, se seleccionaron 4 líneas de cada construcción para la cuantificación de los niveles de expresión de estos genes endógenos mediante PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) de acuerdo a lo señalado en materiales y métodos (sección 2.9.5). En la Figura 28 se observan los niveles de expresión de los genes *PSY1* y *PSY2* de *D. carota* en las hojas de líneas seleccionadas. Los niveles de expresión de estos genes se encuentran relativizados a los niveles de expresión del gen 18S. En esta figura es posible apreciar que la expresión del gen *PSY1* endógeno en las hojas de las 4 líneas transgénicas *DXR* disminuye significativamente con respecto a las plantas silvestres, mientras que la expresión de *PSY2* disminuye en las hojas de las líneas 32 y 37, en la línea 33 se mantienen similar a las plantas silvestres y en las líneas 45 aumentan significativamente. Por otro lado, en las hojas de las zanahorias *DXS* la expresión de *PSY1* aumenta significativamente en las líneas 9, 14 y 29, mientras que se mantiene constante en la línea 22. Con respecto a la expresión de *PSY2* en las hojas de zanahorias *DXS* se aprecia que existe un aumento significativo en las líneas 9 y 29, mientras que se mantiene constante en las líneas 14 y 22.

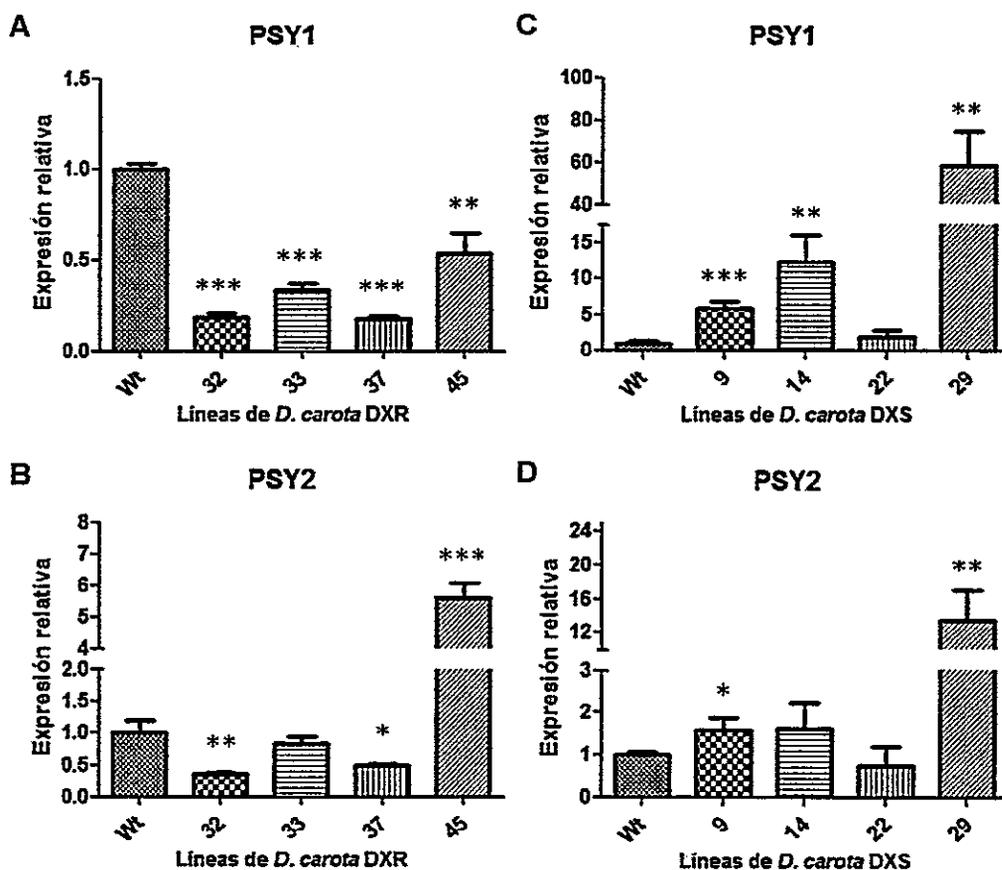


Figura 28. Efecto de la sobreexpresión de genes de la ruta del MEP en la expresión de genes carotenogénicos en hojas de líneas transgénicas de *D. carota*. A) Niveles de expresión de *PSY1* en las hojas de 4 líneas 35S-DXR, B) niveles de expresión de *PSY2* en las hojas de las mismas 4 líneas 35S-DXR, C) Niveles de expresión de *PSY1* en las hojas de 4 líneas 35S-DXS, D) niveles de expresión de *PSY2* en las hojas de las mismas 4 líneas 35S-DXS. Para cada medición se utilizó 18S como normalizador, mientras que como calibrador se utilizaron los datos de las plantas silvestres. Wt: Niveles de expresión de *PSY1* o *PSY2* en las plantas silvestres. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de tres réplicas técnicas. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas silvestres, y fueron determinadas mediante Test de T no pareado de dos colas. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A pesar de varios intentos utilizando diferentes partidores, no se logró realizar la cuantificación de los niveles de expresión de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* en las 4 líneas transgénicas seleccionadas mediante qRT-PCR. Esto se debió principalmente a la dificultad para diseñar partidores específicos para estos genes ya que no se cuenta con el genoma secuenciado de *D. carota* y estos genes no han sido anotados en la base de datos NCBI. Por lo tanto, se decidió realizar un RT-PCR

semicuantitativo, de acuerdo a lo señalado en materiales y métodos (sección 2.9.6). Para esto, se utilizaron partidores directos que hibridan en la región 3' de los genes *DXR* y *DXS* y partidores reversos que hibrida en el extremo 5' de *eGFP*, lo que asegura que las bandas cuantificadas correspondían a la expresión de los transgenes. En la Figura 29 se observa el resultados de este RT-PCR semicuantitativo, en donde es posible apreciar que de las zanahorias *DXR*, la línea 32 es la que presenta la mayor expresión del gen *DXR* de *A. thaliana*. Por otro lado, de las zanahorias *DXS*, la línea 29 presenta la mayor expresión del gen *DXS* de *A. thaliana*, seguida por la línea 14, que es la segunda líneas con la mayor expresión.

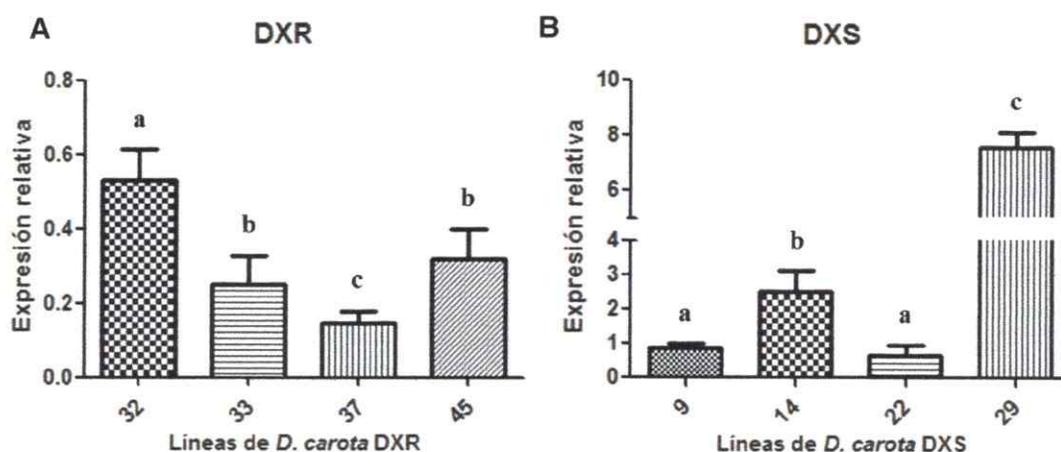


Figura 29. Niveles de expresión de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* en las hojas líneas transgénicas de *D. carota*. Análisis mediante RT-PCR semicuantitativo en las hojas de las líneas transgénicas de zanahoria que expresan los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana*. A) Niveles de expresión de *DXR* en las hojas de 4 líneas 35S-*DXR*, B) niveles de expresión de *DXS* en las hojas de 4 líneas 35S-*DXS*. Para cada medición se utilizó 18S como control interno de la concentración de ADNc. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de tres réplicas técnicas. Diferentes letras (a, b, c, d, e, f) indican diferencias significativas entre las líneas, determinadas por ANOVA de una vía y post-test de Tukey, $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

4.1 Generación de las construcciones pPSY2-DXR y pPSY2-DXS.

El primer objetivo de este seminario de título consistió en el diseño y la construcción de vectores que permitieran expresar en planta dos genes claves de la ruta del MEP, *DXR* y *DXS*, bajo la dirección del promotor de *PSY2* de *D. carota*. Se ha descrito en diferentes modelos vegetales que la sobreexpresión de estos genes, especialmente de *DXS*, incrementan el flujo metabólico de los precursores sintetizados en la ruta del MEP, aumentando los niveles de compuestos isoprenoides que utilizan estos precursores para su síntesis, como clorofilas y carotenoides (Estevez y col., 2001; Enfissi y col., 2005; Carretero-Paulet y col., 2006; Morris y col., 2006). Por otro lado, la producción de fitoeno a partir de GGPP y por lo tanto la fitoeno sintasa (*PSY*), enzima que cataliza esta reacción, es un punto clave en la regulación de esta ruta (Bouvier y col., 2005; Sandmann y col., 2006; Giuliano y col., 2008; Cazzonelli y Pogson, 2010). Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo permitieron determinar que de los dos genes *PSY* encontrados en zanahoria, el gen *PSY2* sería el principal responsable de la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva en este modelo, ya que este gen presenta un mayor aumento en su expresión durante el desarrollo de la raíz en comparación al gen *PSY1* (Figura 4) (Fuentes y col., 2012). Además, anteriormente se había identificado y caracterizado la estructura y la función de los promotores de los genes *PSY2* y *LCBY1* de *D. carota* (Fuentes, 2011), por lo que se contaba con ambos promotores al inicio de este seminario de título. Si bien tanto *PSY2* como *LCYB1* aumentan su expresión en la raíz modificada de zanahorias de 12 semanas, la expresión de *PSY2* es casi 3 veces mayor que la de *LCYB1* (Fuentes, 2009; Fuentes y col., 2012). Además, la expresión de *LCYB1* en hojas de zanahoria es muy similar a la expresión de este gen en la raíz durante el desarrollo,

mientras que *PSY2* aumenta su expresión de preferencia en la raíz de reserva. Estos antecedentes permitieron seleccionar al promotor de *PSY2* para la generación de vectores para expresar los genes *DXR* y *DXS* de la ruta del MEP preferentemente en la raíz adulta de zanahorias.

4.2 Transformación estable de *D. carota* con las construcciones pMDC107-pPSY2::DXR y pMDC107-pPSY2::DXS.

La comprobación de la correcta funcionalidad de las construcciones pMDC107-pPSY2::DXR y pMDC107-pPSY2::DXS permitió que fueran utilizadas para la transformación estable de zanahoria mediante embriogénesis somática, técnica estandarizada por nuestro grupo de trabajo (Moreno y col., 2013). Lamentablemente, cuando los explantes se encontraban elongando y desarrollando brotes, todo el material se contaminó y los explantes transformados se perdieron. Por lo tanto, la expresión en *D. carota* de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* bajo la dirección del promotor de la enzima *PSY2* de *D. carota* se sugiere como una continuación de este trabajo.

4.3 Niveles de clorofila y carotenoides totales de las líneas 35S-DXR y 35S-DXS.

Durante mi unidad de investigación se realizó la transformación estable de explantes de *D. carota* con las construcciones At.DXRns-pB7FWG2 (35S-DXR) y At.DXSfl-pB7FWG2 (35S-DXS). De esta forma, al inicio del presente seminario de título se contaba con distintas líneas regeneradas a partir de explantes transformados con estas construcciones, las que se procedió a evaluar tanto molecular como bioquímicamente. Debido a que cada línea transgénica analizada es completamente independiente a otra ya que existen varios factores que pueden afectar la expresión de los transgenes, como la región de inserción del T-DNA en el genoma de *D. carota*, una

forma de obtener una perspectiva más general del efecto que produce la expresión de los genes *DXR* y *DXS* en *D. carota* es promediar todos los valores de concentración obtenidos en las estas líneas. Al realizar el promedio de los valores de concentración de clorofila *a* se observa que las líneas *DXS* presentan un aumento del 76%, mientras que las líneas *DXR* presentan un aumento del 29%, con respecto las plantas silvestres (Tabla 2). En cuanto a la concentración de clorofila *b*, se observa que en promedio la expresión de ambos genes produce un incremento en la concentración de un 41% para las líneas *DXR* y un 56% para las líneas *DXS*, con respecto a las plantas silvestres. En la Figura 2 se observa que la ruta del MEP sintetiza los precursores de una gran cantidad de compuestos isoprenoides, entre los que se encuentran las clorofilas. Si consideramos que *DXS*, y en menor medida *DXR*, son enzimas limitantes de la ruta del MEP (Lois y col., 2000; Estevez y col., 2001; Mahmoud y Croteau, 2001; Carretero-Paulet y col., 2006; Morris y col., 2006), un cambio en sus niveles de expresión producirá una alteración de los niveles disponibles de IPP plastidial, lo que finalmente se traduciría en un cambio en los niveles de todos los isoprenoides sintetizados en plastidios. En *A. thaliana*, mutantes nulas de *DXR* poseen una importante disminución en el contenido de clorofilas, lo que genera plantas con un fenotipo albino, sin embargo un incremento de aproximadamente 2,1 veces en los niveles de *DXR* no provoca cambios significativos en el contenido de pigmentos fotosintéticos (Xing y col., 2010), lo que sugiere que el flujo metabólico es más sensible a la reducción de los niveles de *DXR* que a un incremento. Esto se ve reflejado en los resultados obtenidos en zanahoria, ya que de las 6 líneas *DXR*, solo 2 aumentaron significativamente su contenido de clorofila *a*. Por otro lado, también se ha reportado en *A. thaliana* que en plantas que sobreexpresan *DXS* el contenido total de clorofila aumenta hasta en un 142% con respecto a las plantas silvestres, mientras que una disminución en la expresión de este gen produce una disminución de hasta un 84%

(Estevez y col., 2001). En este sentido, los resultados obtenidos en este seminario de título respaldan la idea de que DXS posee un papel más crítico que DXR dentro de la ruta del MEP en zanahoria, ya que las plantas DXS presentan un aumento de aproximadamente 2,6 veces más en los niveles de clorofila a que las plantas de DXR.

En cuanto a la concentración de carotenoides totales presentes las hojas de las líneas DXR y DXS (figura 23A), es posible apreciar que todas las líneas presentan un incremento significativo con respecto a las plantas silvestres. En promedio, las líneas DXR presentan un aumento del 26%, mientras que las líneas DXS aumentan el contenido de carotenoides totales en un 71% con respecto a las plantas silvestres. Al igual que se observó en *A. thaliana* al sobreexpresar *DXR* (Carretero-Paulet y col., 2006), los resultados obtenidos en *D. carota* sugieren que los niveles de carotenoides totales no pueden incrementarse más allá de cierto punto mediante el solo aumento en la expresión de *DXR*, que en este modelo correspondería a un incremento del 26% con respecto a las plantas silvestres. El hecho de que zanahorias que expresan el gen *DXS* de *A. thaliana* acumulen un mayor nivel de isoprenoides plastidiales, como clorofilas y carotenoides, con respecto a plantas que expresan el gen *DXR*, sugiere fuertemente que en las plantas DXR la producción del sustrato de esta enzima, DXP, se vuelve limitante cuando la actividad de DXR aumenta (Carretero-Paulet y col., 2006). Por otro lado, DXS cataliza la primera reacción enzimática de la ruta del MEP (Rohmer, 1998; Estevez y col., 2000), y se ha descrito como la principal enzima limitante en la biosíntesis de isoprenoides plastidiales en plantas (Estevez y col., 2001; Carretero-Paulet y col., 2006; Rodríguez-Villalón y col., 2009). Los resultados obtenidos en zanahoria sugieren que en este modelo DXS también cataliza un paso limitante dentro de la ruta del MEP, y su acción contribuye en gran medida al flujo de precursores metabólicos de isoprenoides.

Con respecto a la concentración de carotenoides totales presentes en la raíz de las plantas transgénicas, en promedio se observa que la expresión del gen *DXR* de *A. thaliana* no produce cambios significativos, mientras que la expresión del gen *DXS* produce un aumento de un 66% con respecto a las plantas silvestres. Consistentemente con lo observado en hojas, la línea 22, que posee el menor incremento en el nivel de carotenoides totales en las hojas, es una de las líneas que no aumenta el nivel de carotenoides en la raíz, mientras que la línea 29, que en hojas presentaba los niveles más altos de carotenoides, posee el mayor aumento en el contenido de carotenoides en la raíz. Estos resultados sugieren que *DXS*, y no *DXR*, poseería un papel importante en derivar el flujo de precursores para la síntesis de carotenoides también en la raíz modificada de zanahoria.

4.4 Perfil de carotenoides de las líneas 35S-DXR y 35S-DXS

Al analizar la composición de luteína, α - y β -caroteno presentes en las hojas de las zanahorias transgénicas mediante HPLC, es posible apreciar que en promedio la expresión de *DXR* solo produce cambios significativos en la concentración de α -caroteno, produciendo un aumento del 85% con respecto a las plantas silvestres. En cuanto a las líneas *DXS*, la expresión de *DXS* en zanahoria no produce cambios significativos en el contenido de luteína, pero si aumenta la concentración de α - y β -caroteno en un 121% y 65%, respectivamente.

Mediante el análisis del perfil de carotenoides presentes en las líneas transgénicas es posible apreciar que el aumento observado en el nivel de carotenoides totales en las hojas de las líneas *DXR* se debe principalmente a un incremento en los niveles de α -caroteno, mientras que el aumento de los carotenoides totales observado en las hojas de las líneas *DXS* se debe a un aumento en α - y β -caroteno. Estos resultados sugieren que, en comparación a *DXS*, la expresión de *DXR* favorecería en

menor medida el flujo de los precursores metabólicos hacia la síntesis de carotenoides como α - y β -caroteno.

Por otro lado, en las plantas *DXR* se observa la expresión de *DXR* no altera significativamente el perfil de carotenoides presentes en la raíz de zanahoria. Sin embargo, la expresión de *DXS* en *D. carota* produce un incremento del 87% y 56% en la concentración de α -caroteno y β -caroteno, respectivamente, en la raíz en comparación a las plantas silvestres. Estos resultados sugieren que en la raíz de zanahoria *DXR* no es un punto limitante en flujo de precursores metabólicos hacia la ruta de síntesis de carotenoides, mientras que *DXS* ejerce un control importante en el flujo metabólico de isoprenoides.

La expresión de *DXR* y *DXS* en zanahoria puede derivar también en un aumento de otros isoprenoides plastidiales, como giberelinas, monoterpenos, tocoferoles, etc., o de apocarotenoides, como ABA (Figura 2). En otros modelos vegetales se ha reportado que un aumento en la expresión de *DXR* incrementa los niveles de isoprenos y monoterpenos (Mahmoud y Croteau, 2001; Lange y col., 2011; Yang y col., 2012), y que un aumento en la expresión de *DXS* produce un incremento en los niveles de α -tocoferol y ABA (Estevez y col., 2001; Morris y col., 2006). Este aspecto queda aún por ser determinado en nuestras líneas transgénicas.

4.5 Efecto en la expresión de los genes endógenos *PSY1* y *PSY2*

En plantas se ha descrito que para que exista una eficiente producción de carotenoides es necesaria una interacción cruzada entre la ruta de síntesis de los carotenoides y la ruta del MEP (Lois y col., 2000; Rodríguez-Concepción y col., 2001; Fraser y col., 2007). En *A. thaliana* un aumento en la actividad de *PSY*, que se ha descrito como un punto clave de regulación en la producción de carotenoides (Welsch

y col., 2007; Lu y Li, 2008; Maass y col., 2009; Rodríguez-Villalon y col., 2009), gatilla un incremento de los precursores sintetizados en la ruta del MEP mediante la acumulación de la enzima DXS (Rodríguez-Villalon y col., 2009). En frutos de tomate y tubérculos de papa se ha demostrado que un aumento en la actividad de DXS produce un incremento en la expresión del *PSY*, produciendo un aumento en la concentración de carotenoides (Lois y col., 2000; Morris y col., 2006). En nuestro estudio, observamos que la expresión del gen *PSY1* disminuye significativamente en las hojas de las 4 líneas DXR seleccionadas para este estudio, sin embargo, los resultados obtenidos para el gen *PSY2* muestran que existe una correlación entre la expresión de este gen con el contenido de carotenoides en la mayoría de estas líneas, sobre todo la 45 que posee el mayor aumento en carotenoides. En las líneas DXS, la expresión del gen *PSY1* se encuentra aumentada en las hojas de las líneas con mayor contenido de carotenoides (9, 14 y 29), al igual que *PSY2*, cuya expresión es más evidente en las líneas 9 y 29, mientras que en las líneas 14 y 22 la expresión de este gen se mantiene similar a las plantas silvestres. En conjunto, estos resultados sugieren que la expresión de los genes *DXR* y *DXS*, o al menos los productos que genera su reacción (MEP y DXP), son capaces de regular la expresión de *PSY1* y *PSY2* en las hojas *D. carota*, confirmando la existencia de una inducción coordinada entre genes perteneciente a la ruta del MEP y genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides. Estos datos se correlacionan con aquellos obtenidos en otros modelos de estudio, en donde la expresión de *PSY* aumenta cuando se incrementan los niveles de DXP, el producto de la actividad de DXS (Lois y col., 2000; Rodríguez-Concepcion y col., 2001; Enfissi y col., 2005). Sin embargo, aún queda por determinar los niveles de expresión de los genes *PSY1* y *PSY2* en la raíz de zanahoria, y apreciar si su expresión es modulada por los genes *DXR* y *DXS*.

4.6 Relación entre la expresión de *DXR* y *DXS*, la expresión de *PSY1* y *PSY2* y el contenido de carotenoides

Al observar los datos obtenidos a partir de la cuantificación de carotenoides totales presentes en las hojas de las líneas *DXR* y *DXS* con los datos de la expresión relativa de los genes *PSY1* y *PSY2* endógenos de *D. carota*, es posible observar una fuerte correlación. En las hojas de las líneas *DXR* analizadas el gen *PSY1* se encuentra reprimido. Como se aprecia en la Figura 4, el gen *PSY1* sería el principal responsable de la síntesis de carotenoides en las hojas de zanahoria debido al aumento que se observa en su expresión a las 12 semanas. Por lo tanto, suponiendo que los niveles de expresión de *PSY* se correlacionan con los niveles de proteína, una represión en los niveles de *PSY1* explicaría en parte la obtención de solo un leve aumento en la concentración de carotenoides totales presentes en las hojas de 3 de las líneas que expresan el gen *DXR* de *A. thaliana* comparado con la zanahorias *DXS*. Sin embargo la línea 45, a pesar de tener reducidos los niveles de expresión de *PSY1*, presenta un incremento mucho mayor en el contenido de carotenoides que el resto de las líneas *DXR*. Este aumento podría explicarse debido al fuerte incremento que posee esta línea en la expresión del gen *PSY2*, que si bien sería el principal responsable de la síntesis de carotenoides en la raíz de zanahoria, también cumpliría un papel en hojas debido a que un incremento en su expresión gatilla un aumento en la concentración de carotenoides similar al aumento observado en las zanahorias *DXS*.

Por otro lado, el gen *PSY1* aumenta su expresión en 3 líneas que expresan el gen *DXS*, mientras que se mantiene constante en la línea 22, con respecto a las líneas silvestres. Consistentemente, las 3 líneas que poseen un incremento en la expresión de *PSY1* son las líneas que poseen el mayor aumento en la concentración de carotenoides, mientras que la línea 22 posee el menor incremento de las líneas *DXS*.

4.7 Niveles de expresión de los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* en zanahorias 35S-*DXR* y 35S-*DXS*

Para determinar si el cambio en la concentración de pigmentos y en los niveles de expresión de *PSY1* y *PSY2* en las hojas de zanahoria se correlaciona con la expresión de los transgenes *DXR* y *DXS*, se realizó un qPCR. Sin embargo, los resultados no fueron satisfactorios ya que en la curva de disociación no se observaba una única señal. La imposibilidad de diseñar partidores que permitieran asegurar la amplificación específica de estos genes a partir de ADNc procedente de las zanahorias 35S-*DXR* y 35S-*DXS* se debió principalmente a que los partidores fueron diseñados "a ciegas", ya que el genoma de *D. carota* no se encuentra secuenciado y hasta la fecha los genes *DXR* y *DXS* de este modelo no habían sido anotados en la base de datos. A pesar de diseñar 3 pares de partidores para intentar cuantificar los niveles de expresión de estos genes mediante qRT, ninguno de ellos permitió la amplificación de una sola banda en este sistema tan sensible. Por lo tanto, como estrategia alternativa se realizó un RT-PCR semicuantitativo. Los resultados de este RT-PCR semicuantitativo indican que de las zanahorias *DXR*, la línea 32 es la que presenta una mayor expresión del gen *DXR* de *A. thaliana*. Por otro lado, en las plantas *DXS*, la línea 29 es la que presenta un mayor aumento en la expresión del gen *DXS* de *A. thaliana*, mientras que la línea 14 es la segunda con el mayor aumento.

Si consideramos que existe una relación directa entre los niveles de expresión de los transgenes y los niveles de proteína y su actividad, los resultados entregados por el PCR semicuantitativo sugieren que no existe una correlación entre la expresión de *DXR* y los niveles de carotenoides totales presentes en hojas de zanahoria. La línea 32 posee los niveles más altos de expresión de *DXR* en comparación a las otras 3 líneas analizadas, sin embargo, los niveles de carotenoides de esta línea son muy

similares a los de las líneas 33 y 37, mientras que son inferiores a los de la línea 45. Estos resultados concuerdan con lo encontrado anteriormente en *A. thaliana*, en donde a pesar de que diferentes líneas que sobreexpresan *DXR* poseen diferentes niveles de transcrito, proteína y actividad de *DXR*, el incremento en la producción de carotenoides fue muy similar en todas las líneas (Carretero-Paulet y col., 2006). Sin embargo, se observa que sí existe una correlación entre la expresión de *DXS* y los niveles de carotenoides totales presentes en las hojas de zanahoria. La línea 29 corresponde a la línea que posee los niveles más altos de *DXS* en las hojas en comparación a las otras líneas *DXS* analizadas. Este aumento en la expresión de *DXS*, o el aumento en la concentración de *DXP*, produce un incremento no solo en la expresión de *PSY1*, sino que también en la expresión de *PSY2*, produciendo en conjunto un aumento mayor en la concentración de carotenoides totales que el resto de las líneas, y confirmando así lo observado en otros modelos (Lois y col., 2000; Rodríguez-Concepción y col., 2001; Enfissi y col., 2005). En base a estos resultados podemos decir que se dio cumplimiento a la hipótesis y que el aumento en los niveles de los precursores metabólicos promueven el aumento de la síntesis de carotenoides en *D. carota*. Una expresión conjunta de los genes *DXS* y *PSY* en plantas de zanahoria o de otras plantas de interés comercial, podría ser una buena estrategia de ingeniería metabólica para producir alimentos funcionales con elevados niveles de carotenoides.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo son:

- La biosíntesis de carotenoides en *D. carota* se encuentra limitada por el flujo de los precursores metabólicos sintetizados en la ruta del MEP. De los dos genes expresados en *D. carota*, *DXS*, que codifica para la primera enzima de la ruta del MEP, demostró poseer un papel más crítico en el aumento de carotenoides y clorofila en hojas y raíz de las líneas transgénicas que *DXR*, que codifica para la segunda enzima de esta ruta.
- La expresión de los genes *DXR* y *DXS* condujo a la modificación en la expresión de genes endógenos claves de la ruta de biosíntesis de carotenoides en *D. carota*, como lo son *PSY1* y *PSY2*. Estos resultados sugieren la existencia de una regulación cruzada entre genes pertenecientes a la ruta del MEP y genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides.
- Se generaron vectores que permiten expresar en planta los genes *DXR* y *DXS* de *A. thaliana* bajo el control del promotor del gen *PSY2* de *D. carota*. La funcionalidad de estos vectores se determinó mediante su expresión transitoria en hojas de tabaco.

REFERENCIAS

- Auldridge ME, McCarty DR, Klee HJ (2006) Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 315-321
- Barrero JM, Rodriguez PL, Quesada V, Alabadi D, Blazquez MA, Boutin JP, Marion-Poll A, Ponce MR, Micol JL (2008) The ABA1 gene and carotenoid biosynthesis are required for late skotomorphogenic growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **31**: 227-234
- Bollag W (1996) The retinoid revolution. Overview. *FASEB J* **10**: 938-939
- Botella-Pavia P, Besumbes O, Phillips MA, Carretero-Paulet L, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M (2004) Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J* **40**: 188-199
- Bouvier F, Rahier A, Camara B (2005) Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res* **44**: 357-429
- Carretero-Paulet L, Cairo A, Botella-Pavia P, Besumbes O, Campos N, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M (2006) Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Mol Biol* **62**: 683-695
- Cazzonelli CI, Pogson BJ (2010) Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* **15**: 266-274
- Cunningham FX, Gantt E (1998) Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 557-583
- Curtis MD, Grossniklaus U (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* **133**: 462-469
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 651-679
- Davison PA, Hunter CN, Horton P (2002) Overexpression of beta-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature* **418**: 203-206
- Doyle JJ (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15
- Enfissi EM, Fraser PD, Lois LM, Boronat A, Schuch W, Bramley PM (2005) Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnol J* **3**: 17-27
- Estevez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, Leon P (2001) 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J Biol Chem* **276**: 22901-22909
- Estevez JM, Cantero A, Romero C, Kawaide H, Jimenez LF, Kuzuyama T, Seto H, Kamiya Y, Leon P (2000) Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **124**: 95-104
- Fanciullino AL, Cercos M, Dhique M, Froelicher Y, Talon M, Ollitrault P, Morillon R (2008) Changes in carotenoid content and biosynthetic gene expression in juice sacs of four orange varieties (*Citrus sinensis*) differing in flesh fruit color. *J Agric Food Chem* **56**: 3628-3638
- Flores-Perez U, Perez-Gil J, Rodriguez-Villalon A, Gil MJ, Vera P, Rodriguez-Concepcion M (2008) Contribution of hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase to carotenoid biosynthesis in bacteria and plants. *Biochem Biophys Res Commun* **371**: 510-514
- Fraser PD, Bramley PM (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* **43**: 228-265
- Fraser PD, Enfissi EM, Halket JM, Truesdale MR, Yu D, Gerrish C, Bramley PM (2007) Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell* **19**: 3194-3211

- Fuentes P (2009)** Efecto del desarrollo y de la luz en los niveles de RNA mensajero de seis genes de la ruta carotenogénica en *Daucus carota* L. (zanahoria). Tesis de Pregrado. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Fuentes P (2011)** Identificación y análisis estructural y funcional de los promotores de los genes carotenogénicos *psy2* y *lcyb1* de *Daucus carota*. Tesis de Magister. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Fuentes P, Pizarro L, Moreno JC, Handford M, Rodriguez-Concepcion M, Stange C (2012)** Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Mol Biol* **79**: 47-59
- Glorio G, Stigliani AL, D'Ambrosio C (2007)** Agronomic performance and transcriptional analysis of carotenoid biosynthesis in fruits of transgenic HighCaro and control tomato lines under field conditions. *Transgenic Res* **16**: 15-28
- Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, Beyer P, Taylor MA (2008)** Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol* **26**: 139-145
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Becard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF (2008)** Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**: 189-194
- Grotewold E (2006)** The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 761-780
- Isaacson T, Ronen G, Zamir D, Hirschberg J (2002)** Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell* **14**: 333-342
- Just BJ, Santos CA, Fonseca ME, Boiteux LS, Oloizia BB, Simon PW (2007)** Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theor Appl Genet* **114**: 693-704
- Krinsky NI, Johnson EJ (2005)** Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* **26**: 459-516
- Lange BM, Mahmoud SS, Wildung MR, Turner GW, Davis EM, Lange I, Baker RC, Boydston RA, Croteau RB (2011)** Improving peppermint essential oil yield and composition by metabolic engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 16944-16949
- Lange BM, Rujan T, Martin W, Croteau R (2000)** Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13172-13177
- Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001)** Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *In Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc.
- Lois LM, Rodriguez-Concepcion M, Gallego F, Campos N, Boronat A (2000)** Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J* **22**: 503-513
- Lu S, Li L (2008)** Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *J Integr Plant Biol* **50**: 778-785
- Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ (1991)** High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**: 1-6
- Maass D, Arango J, Wust F, Beyer P, Welsch R (2009)** Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS One* **4**: e6373
- Mahmoud SS, Croteau RB (2001)** Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8915-8920
- Moreno JC, Pizarro L, Fuentes P, Handford M, Cifuentes V, Stange C (2013)** Levels of lycopene beta-cyclase 1 modulate carotenoid gene expression and accumulation in *Daucus carota*. *PLoS One* **8**: e58144

- Morris WL, Ducreux LJ, Hedden P, Millam S, Taylor MA (2006)** Overexpression of a bacterial 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene in potato tubers perturbs the isoprenoid metabolic network: implications for the control of the tuber life cycle. *J Exp Bot* **57**: 3007-3018
- Pizarro L, Stange C (2009)** Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia e investigación agraria* **36**: 143-162
- Rodríguez-Concepcion M (2010)** Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Arch Biochem Biophys* **504**: 118-122
- Rodríguez-Concepción M (2006)** Early Steps in Isoprenoid Biosynthesis: Multilevel Regulation of the Supply of Common Precursors in Plant Cells. *Phytochemistry Reviews* **5**: 1-15
- Rodríguez-Concepcion M, Ahumada I, Diez-Juez E, Sauret-Gueto S, Lois LM, Gallego F, Carretero-Paulet L, Campos N, Boronat A (2001)** 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant J* **27**: 213-222
- Rodríguez-Concepcion M, Boronat A (2002)** Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* **130**: 1079-1089
- Rodríguez-Villalón A, Gas E, Rodríguez-Concepcion M (2009)** Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* **60**: 424-435
- Rohmer M (1998)** Isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent route, a novel target for antibacterial drugs? *Prog Drug Res* **50**: 135-154
- Ruiz-Sola MA, Rodríguez-Concepcion M (2012)** Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. *Arabidopsis Book* **10**: e0158
- Ruyter-Spira C, Al-Babili S, van der Krol S, Bouwmeester H (2013)** The biology of strigolactones. *Trends Plant Sci* **18**: 72-83
- Sandmann G, Romer S, Fraser PD (2006)** Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metab Eng* **8**: 291-302
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012)** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**: 671-675
- Stange C, Fuentes P, Handford M, Pizarro L (2008)** *Daucus carota* as a novel model to evaluate the effect of light on carotenogenic gene expression. *Biol Res* **41**: 289-301
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyojuka J, Yamaguchi S (2008)** Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195-200
- Welsch R, Maass D, Voegel T, Dellapenna D, Beyer P (2007)** Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: stable elements in the carotenogenesis of *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* **145**: 1073-1085
- Xing S, Miao J, Li S, Qin G, Tang S, Li H, Gu H, Qu LJ (2010)** Disruption of the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene results in albino, dwarf and defects in trichome initiation and stomata closure in *Arabidopsis*. *Cell Res* **20**: 688-700
- Yang J, Adhikari MN, Liu H, Xu H, He G, Zhan R, Wei J, Chen W (2012)** Characterization and functional analysis of the genes encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, the two enzymes in the MEP pathway, from *Amomum villosum* Lour. *Mol Biol Rep* **39**: 8287-8296

ANEXO

Tabla A. Programas PCR

1. PCR convencional

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
Denaturación Inicial	94	4min.	1
Denaturación	94	45seg.	33-36
Hibridación	Tm-5	30seg.	
Extensión	72	1min/kb	
Extensión Final	72	10min.	1

2. PCR convencional utilizando la enzima *Pfu* ADN polimerasa

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
Denaturación Inicial	95	4min.	1
Denaturación	95	30seg.	30-35
Hibridación	Tm-5	30seg.	
Extensión	72	2min/kb	
Extensión Final	72	10min.	1

3. RT-PCR

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
Incubación inicial	70	5min	1
Hibridación	25	5min	1
Extensión	42	60min	1
Inactivación	70	15min	1

4. qRT-PCR

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
Denaturación	95	3min.	1
Amplificación	95	10seg.	40
	60	20seg.	
Disociación	95	1min.	1
	60	30seg.	
	95	30seg.	