



Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA LUZ SOBRE LA
ACUMULACIÓN DE CAROTENOIDES EN LA RAÍZ
DE RESERVA DE *Daucus carota***

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

Doctor en Biotecnología Molecular

Facultad De Ciencias

Por

DANIELA LORETO ARIAS GONZÁLEZ

Junio, 2019

**Directora de Tesis:
Dra. CLAUDIA STANGE KLEIN**

**Co-Director de Tesis:
Dr. HERMAN SILVA ASCENCIO**

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

DANIELA LORETO ARIAS GONZÁLEZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día

Directora de Tesis:

Dra. Claudia Stange K.

.....

Co-Director de Tesis:

Dr. Herman Silva A.

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Víctor Cifuentes G.

.....

Dr. Nicolás Guiliani

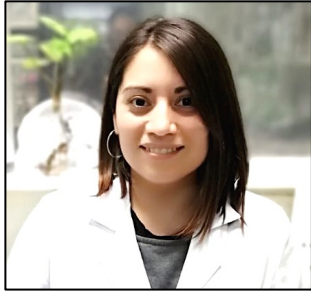
.....

Dra. Lorena Norambuena M.

.....

Para mi madre, hermana, Trini, Seba y Andrés

Biografía



Nací un 24 de agosto en la ciudad de Santiago. Hace un par de años atrás, y a pesar de mis ganas y ansias por hacer lo que he plasmado en esta tesis, jamás hubiese pensado que podría estar haciendo lo que hago en estos momentos. Por eso, y a pesar de todo, de las circunstancias, de las opciones y de la vida, estoy orgullosa de este trabajo.

La ciencia, específicamente la Biología, vino a mi vida (de verdad) quizás en el colegio, no lo recuerdo muy bien. Solo recuerdo las inmensas ganas que tenía de saber todo lo relacionado a ella. Esto finalmente me llevó a estudiar pedagogía en Biología. En esos años no estaba muy segura de si me gustaría tanto solo enseñar esta ciencia, pero si estaba muy segura de que quería ser parte de aquellos que 'hacían Biología', de los que aportaban ese conocimiento que tendría que transmitir en algún momento a mis estudiantes.

Luego de algunos años haciendo clases, tomé la decisión de prepararme para comenzar a hacer ciencias. Comencé por el magíster en Cs. Biológicas de la Universidad, experiencia base que me permitió aprender todo lo que no sabía, me abrió la mente a una nueva forma de comprender los fenómenos biológicos y me terminó convenciendo de que lo mejor para mi sería hacer un doctorado. Algunas veces me arrepentí de la decisión, otras me convencí de que fue lo mejor que pude haber hecho. Ahora estoy segura de que lo hice porque quise, porque pude y porque me gusta mucho lo que hago. No ha sido un camino fácil, ha sido un proceso largo, lleno de equivocaciones, de fracasos y frustraciones, pero también ha sido una de las mejores experiencias de mi vida. Una experiencia con infinitos aprendizajes, mucho crecimiento personal y solo algunos triunfos que superan todo lo negativo que se pueda experimentar en este camino.

Estoy muy feliz de culminar este trabajo y que ahora pueda ser parte de mi biografía.

Agradecimientos

Primero que todo, mis mayores agradecimientos siempre serán a mi familia: mi madre, hermana, sobrinos y Andrés, por su apoyo incondicional, amoroso y paciente. Gracias a mi madre soy quien soy y he podido hacer lo que he querido hacer. Infinitas gracias por su esfuerzo sobrehumano, amor y entrega infinita hacia mi y mi hermana. Nada de esto sería posible sin ti mamá. Gracias a mi hermana por ser mi amiga, por quererme y aceptarme como soy y a pesar de mis exigencias. Gracias a mi Trini y mi Seba por ser soles inmensos que me iluminan cada día, que sacan lo mejor de mi. Los amo inmensamente e infinitamente. Gracias Andrés por tu amor y por tu apoyo; esto también es tu logro, nada de esto se hubiera materializado sin tu ayuda, paciencia, comprensión y fuerza.

Esta tesis no habría sido posible sin el apoyo y ayuda constante de mis compañeros del laboratorio. Les agradezco mucho a todos por su compañía, por sus opiniones y retroalimentación sobre mi trabajo, por hacer del laboratorio un lugar grato para trabajar y estudiar, y por todas las actividades extra-curriculares en las que hemos participado todos al menos un par de veces. Obviamente, incluyo en estos agradecimientos a la Ange, ya que es parte esencial del funcionamiento del laboratorio y de la formación de todos los estudiantes que hemos pasado por el. Yo en particular he aprendido mucho de su experiencia y de sus conocimientos, por lo que estoy profundamente agradecida de ella. Muchas gracias Carmen Gloria, sin tu labor que es esencial, no tendríamos un lugar óptimo para desempeñarnos.

Le agradezco al team CSK actual y a los anteriores, por su constante aporte a mi trabajo en todo sentido (discusión, retroalimentación, sugerencias, comprensión, ideas, ayuda en experimentos, enseñanzas, entre otras cientos de cosas). Es un excelente grupo humano con el que es muy fácil y grato trabajar. Al team CSK de mis inicios en el laboratorio, también le agradezco su amistad, su buen humor, su apoyo y las infinitas risas (sobre todo las provenientes de Hita Barraza). ¡¡Muchas gracias team!! Mención honrosa para Luisfe que además fue mi compañero del doctorado desde el día 1. De verdad sin tu ayuda me habría costado mucho más. Eres un excelente científico y persona, me impresionan mucho tus conocimientos y tus millones de ideas. ¡Tendrás mucho éxito!

Muchas gracias a los profesores del laboratorio por compartir sus conocimientos y experiencias con todos los estudiantes. Su labor es importante para todos nosotros, y en particular para mi ha sido esencial para ir mejorando y poder llegar a este punto.

Le agradezco a los profesores de mi comisión evaluadora, porque cada vez que les presenté mi trabajo aprendí muchas cosas del mismo. A pesar de lo difícil que fue enfrentarlos todas las veces, sus guías y puntos de vista me hicieron mejorar.

Agradecimientos especiales para el profe Herman y para Jonathan Maldonado, por su ayuda y enseñanzas respecto a la parte más difícil de mi trabajo. Ambos han tenido una paciencia inmensa conmigo, y lo agradezco mucho. Me han sacado absolutamente de mi zona de confort, y he aprendido cosas que de lo contrario no habría aprendido. ¡Gracias!

Finalmente, estoy infinitamente agradecida de la profe Claudia. Ella sin saber mucho de mi ni de mi formación inicial, se arriesgó y me aceptó como su estudiante. Apostó a que podía hacerlo bien y creo, sinceramente, que esto no lo habrían hecho muchos profesores. Le agradezco la oportunidad que me dio para iniciarme en este camino, le agradezco sus exigencias (y retos) y enseñanzas, así como también la confianza que tiene en mi trabajo. ¡Muchas gracias por la oportunidad y por el apoyo en este camino!

Índice de Materias

Lista de Tablas.....	vii
Lista de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	xi
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiv
1. Introducción	1
1.1. Carotenoides: características generales	1
1.2. Síntesis de carotenoides en plantas	2
1.3. Regulación de la síntesis de carotenoides en plantas	5
1.3.1. Percepción de la luz y síntesis de carotenoides	5
1.4. <i>Daucus carota</i> como modelo de estudio de la síntesis de carotenoides.....	8
1.4.1. Regulación de los genes carotenogénicos mediada por la luz en zanahoria	10
1.5. Secuenciación del genoma y de los transcritos en <i>Daucus carota</i>	11
1.5.1. Transcriptoma <i>de novo</i> de la raíz de zanahoria de 8 semanas crecida en luz (R/L) versus la crecida en oscuridad (R/O).....	13
1.6. Propuesta de investigación para esta tesis de doctorado.....	14
1.7. Hipótesis de trabajo.....	16
1.8. Objetivos del trabajo.....	16
1.8.1. Objetivo general	16
1.8.2. Objetivos específicos	16
2. Materiales y Métodos	17
2.1. Medios de cultivo y materiales de biología molecular	17
2.2. Materiales Biológicos	17
2.3. Métodos de cultivo y transformación	17
2.3.1. Cultivos bacterianos de <i>E. coli</i> TOP10 y <i>A. tumefaciens</i> GV3101	17
2.3.2. Generación de células de <i>A. tumefaciens</i> GV3101 competentes.....	18
2.3.3. Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 quimiocompetentes con los vectores de interés	19
2.3.4. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> GV3101 competentes con los vectores de interés	19
2.3.5. Cultivo de <i>A. tumefaciens</i> para la transformación de <i>Daucus carota</i>	20
2.3.6. Cultivo y transformación de <i>Daucus carota</i>	21
2.3.6.1. Cultivo de <i>Daucus carota</i>	21
2.3.6.2. Transformación y embriogénesis somática de <i>Daucus carota</i>	21
2.4. Métodos de Biología Molecular	23
2.4.1. Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos	23

2.4.1.1. Extracción de RNA a partir de raíz y hojas de zanahoria	23
2.4.1.2. Extracción de DNA genómico de zanahoria.....	24
2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	24
2.4.2.1. PCR convencional con DNA genómico o DNA complementario (cDNA) de zanahoria	24
2.4.2.2. PCR de colonias de <i>E. coli</i> TOP10 y <i>A. tumefaciens</i> GV3101 transformadas con vectores de interés	26
2.4.2.3. Tratamiento de DNAsa I y Síntesis de cDNA.....	26
2.4.2.4. Determinación de la expresión relativa de genes mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR).....	27
2.4.3. Amplificación mediante PCR del gen de <i>Daucus carota</i> <i>DcPar1</i>	29
2.4.4. Clonación del gen <i>DcPar1</i> en vector de entrada	29
2.4.5. Obtención de vectores de destinación para la expresión en plantas.....	30
2.4.6. Obtención de vector para silenciamiento de genes en plantas.....	31
2.4.7. Obtención de vectores para ensayos de BifC (<i>Bimolecular fluorescence complementation</i>).....	32
2.4.8. Interacción proteína-proteína mediante ensayo BifC.....	33
2.5. Determinación de la concentración y composición de carotenoides.....	34
2.5.1. Extracción de carotenoides a partir de raíz y hojas de zanahoria	34
2.5.2. Cuantificación de carotenoides totales mediante espectrofotometría.....	35
2.5.3. Determinación de la composición de carotenoides mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (HPLC)	36
2.6. Análisis bioinformático del transcriptoma <i>de novo</i> de raíz de zanahoria de semanas luz/oscuridad.....	37
2.6.1. Obtención de genes diferencialmente expresados (DEGs) entre la raíz de zanahoria de 8 semanas crecida en luz (R/L) y crecida en oscuridad (R/O).....	39
2.6.2. Elección de genes para la validación del transcriptoma <i>de novo</i> mediante qRT-PCR.....	39
3. Resultados	41
3.1. Análisis <i>in silico</i> del transcriptoma <i>de novo</i> de <i>Daucus carota</i>: Identificación de genes diferencialmente expresados (DEGs) en la raíz de zanahoria crecida en oscuridad (R/O) versus la crecida en luz (R/L).....	41
3.2. Validación del ensamble bioinformático del transcriptoma <i>de novo</i> de <i>Daucus carota</i> y de los niveles relativos de transcritos (expresión relativa) de los genes diferencialmente expresados entre R/O y R/L	43
3.3. Clasificación de DEGs y selección de un gen candidato para su caracterización funcional	47
3.4. Transformación estable de <i>Daucus carota</i> variedad Nantesa con el gen <i>Par1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	52
3.4.1. Expresión del gen de <i>Arabidopsis AtPar1</i> en <i>Daucus carota</i>	53
3.4.2. Perfil de expresión génica relativa de plantas transgénicas de <i>Daucus carota</i> transformadas con el gen <i>AtPar1</i>	55
3.4.3. Cuantificación de carotenoides en raíces de plantas transgénicas OEAtPar1	57
3.5. Caracterización funcional del gen de <i>Daucus carota</i> <i>DcPar1</i>	59
3.5.1. Análisis nucleotídico de la secuencia del contig correspondiente al gen <i>DcPar1</i>	59
3.5.2. Análisis de identidad entre <i>DcPar1</i> y <i>AtPar1</i>	61

3.5.3. Amplificación y clonamiento del gen <i>DcPar1</i>	63
3.5.4. Análisis de la unión directa entre el cofactor transcripcional DcPAR1 y un factor de transcripción del tipo PIF	67
3.5.5. Transformación estable de <i>Daucus carota</i> variedad Nantesa con el gen <i>DcPar1</i>	69
3.5.5.1. Sobreexpresión del gen <i>DcPar1</i>	69
3.5.5.2. Silenciamiento del gen <i>DcPar1</i>	71
3.5.5.2.1. Cuantificación de los niveles de carotenoides en raíces de zanahorias SiRNA <i>DcPar1</i>	74
3.5.5.2.2. Perfil de expresión génica relativa de plantas SiRNA <i>DcPar1</i>	76
4. Discusión	78
4.1. Transcriptoma de novo de <i>Daucus carota</i>	78
4.2. Genes diferencialmente expresados entre la raíz crecida en oscuridad (R/O) respecto de las la raíz crecida en luz R/L)	82
4.3. Elección de <i>DcPar1</i>: gen candidato que participaría en la regulación de la síntesis de carotenoides en la raíz de zanahoria que crece en oscuridad	87
4.3.1. Las plantas OEAtPar1 poseen mayor expresión relativa del gen <i>DcPsy1</i> en su raíz que crece en oscuridad en correlación a un aumento en los niveles de carotenoides.....	88
4.3.2. Caracterización funcional del gen <i>DcPar1</i>	93
4.3.2.1. La proteína DcPAR1 se une <i>in vivo</i> al factor de transcripción de Arabidopsis AtPIF7	94
4.3.2.2. Sobreexpresión del gen <i>DcPar1</i> en <i>Daucus carota</i>	95
4.3.2.3. Las plantas SiRNA <i>DcPar1</i> tuvieron una raíz modificada delgada y con una reducción en los niveles de carotenoides	97
5. Conclusiones	103
6. Proyecciones	105
6.1. Caracterización funcional del gen <i>DcPar1</i> y su rol en la síntesis de carotenoides	105
6.2. Relación funcional de <i>DcPar1</i> y otros genes más expresados en R/O que en R/L	106
7. Bibliografía	108
8. Anexo	115

Lista de Tablas

Tabla 1. Filtros (FDR y veces de cambio) utilizados para el análisis RNA-Seq del transcriptoma de zanahoria crecida en condiciones R/O y R/L y cantidad de genes más expresados y menos expresados en ambas condiciones.....	42
Tabla 2. Lista de genes escogidos para la validación de los resultados predichos por el RNA-Seq.....	43
Tabla 3. Genes más expresados en la condición de crecimiento R/O respecto de R/L, categoría “síntesis de carotenoides”.....	48
Tabla 4. Genes más expresados en la condición de crecimiento R/O respecto de R/L,, categoría “señalización por fitohormonas”.....	49
Tabla 5. Genes más expresados en la condición de crecimiento R/O respecto de R/L, categoría “procesos biológicos generales”.....	50
Tabla 6. Genes más expresados en la condición de crecimiento R/O respecto de R/L, categoría “captación de luz y señalización por luz”	51

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas (panel derecho) y Ruta MEP (panel izquierdo).	4
Figura 2. Señal de transducción dependiente de luz involucrada en el proceso de fotomorfogénesis (de-etiolación) en plantas.	8
Figura 3. Fenotipo de una raíz de zanahoria de 8 semanas.	11
Figura 4. Esquema que resume la estrategia de trabajo de esta tesis.	15
Figura 5. Espectro de absorción de los pigmentos clorofila <i>a</i> , <i>b</i> y carotenoides.....	36
Figura 6. Niveles relativos de transcrito de genes escogidos para la validación de los DEGs obtenidos mediante el análisis de RNA-Seq.	46
Figura 7. Obtención de plantas de zanahoria transgénicas para el gen <i>AtPar1</i>	54
Figura 8. Niveles relativos de transcritos (en veces de cambio) de plantas transgénicas OEAtPar1.....	56
Figura 9. Contenido de carotenoides en raíces de plantas transgénicas OEAtPar1....	58
Figura 10. Alineamiento de secuencias nucleotídicas correspondiente al contig 42760 y la secuencia de <i>DcPar1</i> depositada en NCBI (XM_017390696.1).	60
Figura 11. Alineamiento de secuencias AtPAR1 y DcPAR1.....	62
Figura 12. Alineamiento proteico de los dominios bHLH de AtPAR1 y DcPAR1.....	64

Figura 13. Clonación del gen <i>DcPar1</i>	66
Figura 14. Ensayo de interacción proteína-proteína BifC.....	67
Figura 15. Cultivo <i>in vitro</i> y transformación de <i>Daucus carota</i> variedad Nantesa.....	70
Figura 16. Obtención de plantas de zanahoria SiRNA <i>DcPar1</i>	72
Figura 17. Fenotipo representativo de raíces adultas de plantas transgénicas SiRNA <i>DcPar1</i>	73
Figura 18. Cuantificación del contenido de carotenoides en raíces de plantas transgénicas SiRNA <i>DcPar1</i>	75
Figura 19. Niveles relativos de transcritos (en veces de cambio) de genes carotenogénicos en plantas transgénicas SiRNA <i>DcPar1</i>	77
Figura 20. Modelos que explican el posible rol del gen <i>DcPar1</i> en la síntesis de carotenoides en <i>Daucus carota</i>	102

Lista de Abreviaturas

- R/O : raíz de zanahoria crecida en oscuridad.
- R/L : raíz de zanahoria crecida en luz.
- DNA : ácido desoxirribonucleico.
- cDNA : ácido desoxirribonucleico complementario.
- RNA : ácido ribonucleico.
- pb : pares de bases.
- PCR : reacción en cadena de la polimerasa.
- RT-PCR : transcripción reversa- reacción en cadena de la polimerasa.
- qRTPCR : PCR en tiempo real con transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa.
- SGPT : silenciamiento génico post-transcripcional.
- HPLC : cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*).
- FDR : corrección de falsos positivos (*False Discovery Rate*).
- MS : medio de cultivo de plantas *Murashige-Skoog*.
- LB : medio de cultivo de bacterias *Luria-Bertani*.

Resumen

Los carotenoides son pigmentos que en plantas participan en la fotosíntesis, protección del daño foto-oxidativo y síntesis de fitohormonas. En mamíferos, su consumo es esencial, ya que son precursores de la vitamina A. La síntesis de carotenoides en plantas ha sido bien caracterizada a nivel molecular, centrándose principalmente en los genes que codifican para las enzimas que son parte de la ruta de síntesis de estos pigmentos (llamados 'genes carotenogénicos'). Por otro lado, se ha reportado que la síntesis de carotenoides en plantas está regulada por diversos factores entre los que se destaca la luz, la cual induce la expresión de genes y la síntesis y acumulación de estos pigmentos en hojas, frutos y flores en plantas modelos, como por ejemplo, tomate, tabaco y *Arabidopsis*. En el caso de *Daucus carota* (zanahoria), ésta sintetiza y acumula una gran cantidad de carotenoides en su raíz de reserva que crece en oscuridad, contrario a lo reportado en otros modelos, otorgándole su característico color anaranjado. En este contexto, nuestro grupo de investigación ha determinado que la luz inhibe reversiblemente la síntesis y acumulación de carotenoides en la raíz de reserva de zanahoria al privilegiar el desarrollo de cloroplastos (acumuladores de clorofila) en vez de cromoplastos (acumuladores de carotenoides). Además, a nivel molecular, se genera una regulación negativa sobre los genes carotenogénicos. Para comprender el mecanismo regulatorio en *Daucus carota*, realizamos un RNA-seq para identificar genes no carotenogénicos reprimidos por la luz en la raíz de *Daucus carota*, al comparar raíces de 8 semanas crecidas en luz (R/L) versus raíces crecidas en oscuridad (R/O). Entre los genes identificados se encuentran aquellos involucrados en procesos de señalización mediados por hormonas y genes que participan en la

biogénesis de plastidios y cromoplastos. Sin embargo, un grupo importante de genes que nos llamo la atención fueron aquellos que participan en cascadas de señalización mediadas por luz, entre los que están *PhyA*, *PhyB*, *Par1*, *Pif4*, entre otros. De ellos, se seleccionó el gen *Par1* que corresponde a un cofactor transcripcional involucrado en el síndrome de huida de la sombra (SAS) y la fotomorfogénesis. La caracterización funcional de *DcPar1* mediante su silenciamiento post-transcripcional en zanahoria, provocó una disminución de entre 4 a 60 veces en los niveles de α y β -caroteno en la raíz, mientras que la expresión constitutiva del gen ortólogo *AtPar1* de *Arabidopsis* provocó un aumento de 2,4 veces más de β -caroteno en la raíz de zanahoria. Lo anterior se correlacionó con los niveles de transcritos de genes carotenogénicos claves como *DcPsy1* y *DcPsy2*, los que disminuyeron sus niveles de expresión relativa en las plantas silenciadas para *DcPar1*, mientras que *DcPsy1* aumentó sus niveles de transcritos en zanahorias que expresaron el gen *AtPar1*. Estos resultados nos permiten sugerir que el gen *Par1* posee un rol regulatorio sobre la síntesis y/o acumulación de carotenoides de la raíz de zanahoria que crece en oscuridad.

Este trabajo además, nos permitió ampliar nuestro conocimiento respecto de los mecanismos regulatorios de la síntesis y/o acumulación de carotenoides en zanahoria, además de proponer al gen *DcPar1* como un gen blanco a manipular con el propósito de aumentar los niveles de estos compuestos antioxidantes en cultivos de interés económico.

Abstract

The carotenoids are isoprenoids pigments synthesized by plants, algae and by some yeast and bacteria. In plants, these pigments play fundamental functions related with photosynthesis, photo-oxidative protection and synthesis of phytohormones.

The synthesis of carotenoids in plants has been well characterized at the molecular level in plants, however these studies have focused mainly on the carotenogenic genes that are part of carotenoid biosynthesis pathway, while the study of non-carotenogenic genes is scarce. On the other hand, it has been reported that the synthesis of carotenoids in plants is regulated by light, which would induce the synthesis and accumulation of these pigments in leaves, fruits and flowers in model plants such as tomato, tobacco and *Arabidopsis*. *Daucus carota* (carrot) synthesizes and accumulates a large amount of carotenoids in its root that grows in darkness, contrary to that reported in other plant models, allowing this organ to acquire its characteristic orange color.

Our research group has determined that light inhibits the carotenoid synthesis and accumulation in the carrot root, causing the development of chloroplasts (chlorophyll accumulators) instead of chromoplasts (carotenoid accumulators) in the root. Furthermore, at the molecular level, a negative regulation is generated on the carotenogenic genes. This background allows us to propose that light plays an inhibitory role in the carotenoid synthesis in the carrot root that causes this plant to behave distinctly to other plant models. The carotenogenic genes of various plants and those of carrots, have been widely characterized. Considering that light has a negative effect on carotenoid synthesis in carrot root, in this work we identified non-

carotenogenic genes repressed by light in the root of *Daucus carota*, performing an RNA-Seq analysis from 8-week old roots grown in light (R/L) versus roots grown in darkness (R/O). Among the differentially expressed genes (DEGs) identified are those involved in hormone signaling and genes involved in plastid and chromoplast biogenesis. However, an important group of genes that caught our attention were those that participate in light-mediated signaling, among which are *PhyA*, *PhyB*, *Par1*, *Pif4*, among others. Of these, the *Par1* gene was selected. *Par1* encodes a transcriptional cofactor involved in the shade avoidance syndrome (SAS) and photomorphogenesis. The functional characterization of *DcPar1* by post-transcriptional silencing in carrot, caused a decrease in the levels of α and β -carotene in the root from 4 to 60 times, while the constitutive expression of the Arabidopsis orthologous gene *AtPar1* caused an increase in β -carotene in the carrot root from 2.4 times. This was correlated with the transcripts levels of key carotenogenic genes such as *DcPsy1* and *DcPsy2*, which decreased their relative expression levels in *DcPar1* silenced plants, while *DcPsy1* increased their transcripts levels in carrots that expressed *AtPar1* gene. These results allow us to suggest that the *Par1* gene has a regulatory role on the synthesis and/or accumulation of carotenoids in the carrot root that grows in darkness.

This work allowed us to expand our knowledge regarding the regulatory mechanisms of the synthesis and/or accumulation of carotenoids in carrots, in addition to proposing the *DcPar1* gene as a target gene to manipulate with the purpose of increasing the antioxidant compounds levels in economic interest crops.

1. Introducción

1.1. Carotenoides: características generales

Los carotenoides comprenden un grupo de pigmentos que son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos y algunas bacterias y hongos (Al-Babili et al., 2006; Lu and Li, 2008; Hannoufa and Hossain, 2012; Rodriguez-Concepcion and Stange, 2013; Simpson et al., 2016a). Son compuestos de 40 carbonos, lipofílicos isoprenoides con cadenas poliénicas que pueden contener hasta 15 dobles enlaces conjugados, siendo esta última característica la responsable de que los carotenoides funcionen como cromóforos (Tanaka and Ohmiya, 2008; Rodriguez-Concepcion and Stange, 2013). Estos pigmentos otorgan el color característico a algunos frutos, flores y raíces. Colores como el amarillo (por ej., maíz y plátanos), el naranja (por ej., zanahorias y naranjas) y el rojo (por ej., tomates y sandía) se deben a la acumulación de carotenoides en los cromoplastos presentes en estos órganos (Rodriguez-Concepcion, 2010).

Los carotenoides, dada sus características estructurales, cumplen diversos roles. Su más reconocida función es la que ejercen a nivel celular, protegiendo a las células frente a las especies reactivas de oxígeno, lo que es especialmente importante en organismos que realizan fotosíntesis (Sandmann, 2015; Simpson et al., 2016a). Además, protegen a las células vegetales frente al daño foto-oxidativo gracias a su estructura química de dobles enlaces conjugados, y son fundamentales para la fotosíntesis ya que actúan como pigmentos accesorios absorbiendo el exceso de luz y disipando energía (Hirschberg, 2001; Howitt and Pogson, 2006; Sandmann et al., 2006;

Simpson et al., 2016a). También son precursores de fitohormonas como el ácido abscísico (ABA) (Al-Babili et al., 2006; Sandmann, 2015; Simpson et al., 2016a) y las estrigolactonas (Ruyter-Spira et al., 2013). En animales, cumplen funciones importantes y deben ser incluidos en la dieta ya que no son sintetizados *de novo*. Principalmente son necesarios para la visión, al ser precursores de la Vitamina A, cuya deficiencia puede ocasionar degeneración macular o ceguera (Cazzonelli et al., 2010). También se le han atribuido otras propiedades beneficiosas para la salud, como protección frente a enfermedades crónicas, acción anti-inflamatoria, aumento en la respuesta inmune y prevención de algunos tipos de cáncer, todo esto probablemente debido a su elevado poder antioxidante (Sandmann, 2015).

1.2. Síntesis de carotenoides en plantas

La ruta de síntesis de carotenoides en plantas se muestra en la Figura 1. Esta ocurre en los plastidios y comienza con la producción de los precursores de isoprenoides. Los primeros intermediarios para la producción de carotenoides se obtienen a partir de la condensación del isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP), compuestos generados en la vía de los metileritriol fosfatos o vía MEP (Figura 1) donde participan enzimas como DXS (1-deoxi-d-xilulosa-5-fosfato sintasa) y DXR (1-deoxi-d-xilulosa-5-fosfato reducto isomerasa). Esta condensación produce un intermediario de 20 carbonos llamado geranyl geranyl pirofosfato (GGPP), molécula precursora para la síntesis de carotenoides. El primer paso crítico de la ruta es la condensación de dos moléculas de GGPP, reacción catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY), formándose un compuesto de 40 carbonos llamado fitoeno. El fitoeno, un carotenoide

incolore, sufre desaturaciones e isomerizaciones hasta generar licopeno. Primero, el fitoeno es desaturado por la enzima fitoeno desaturasa (PDS), luego isomerizado por la 15-cis- ζ -caroteno isomerasa (ZISO) generando fitoflueno. Este último es convertido en licopeno por acción de las enzimas ζ -caroteno desaturasa (ZDS) y luego la caroteno isomerasa (CRTISO). A raíz de las desaturaciones, estos compuestos presentan colores que van del amarillo pálido hasta el rojo. Posteriormente, el licopeno es ciclado para formar α y β -caroteno, punto en el cual la ruta de síntesis se ramifica en dos. Por un lado, la enzima licopeno β -ciclasa (LCYB) participa en la formación del β -caroteno, mientras que para producir el α -caroteno se requiere de las enzimas licopeno β -ciclasa y la licopeno ϵ -ciclasa (LCYE). Luego, el α -caroteno es hidroxilado por la enzima caroteno β -hidroxilasa (CHBX) y la caroteno ϵ -hidroxilasa (CHEX), para generar luteína. Por su parte el β -caroteno es hidroxilado para producir zeaxantina (Figura 1). Posteriormente, a partir de la zeaxantina se sintetiza el ABA (Armstrong, 1996; Cunningham Jr., 1998; Farre et al., 2011; Rodriguez-Concepcion and Stange, 2013; Simpson et al., 2016a; Simpson et al., 2016b).

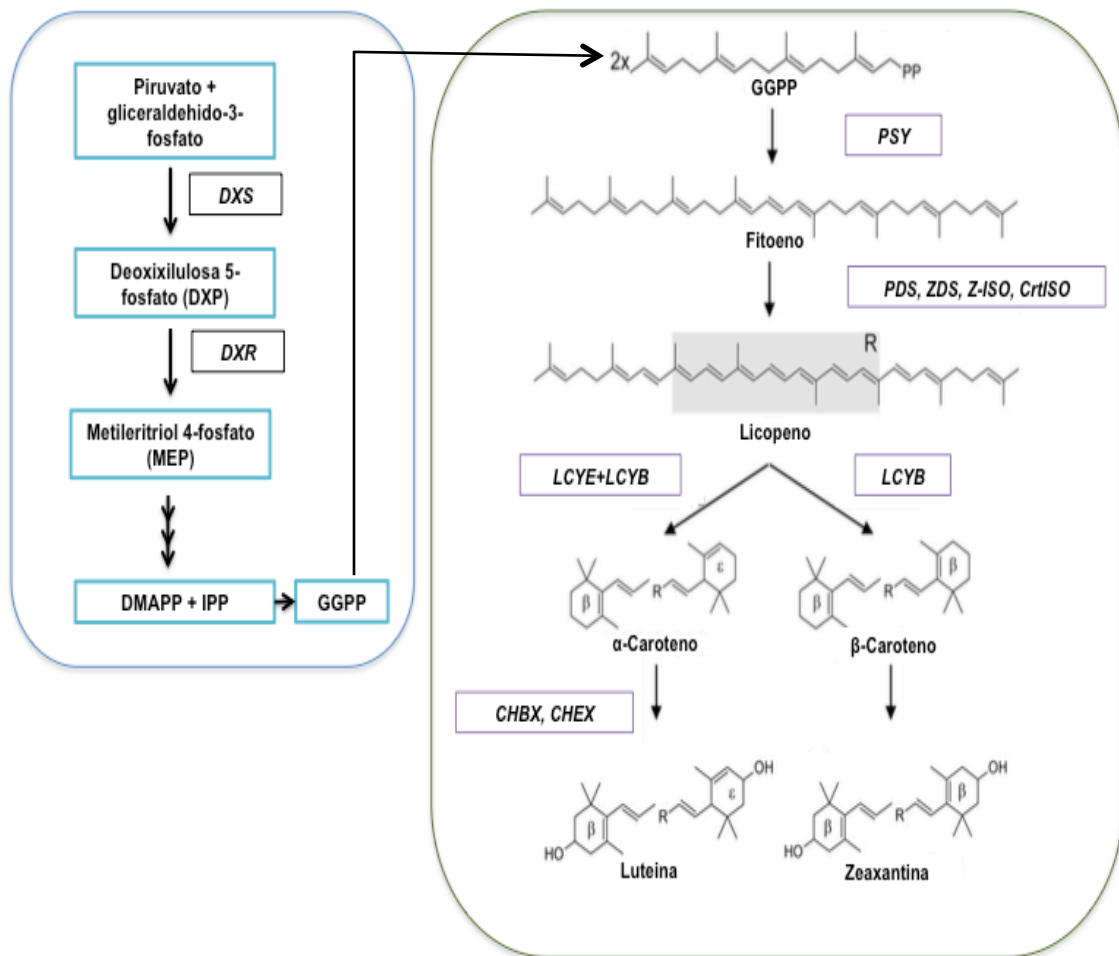


Figura 1. Esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas (panel derecho) y Ruta MEP (panel izquierdo). IPP, isopentenil pirofosfato; IPI, isopentenil isomerasa; DMAPP, dimetilalil pirofosfato; GGPP, geranilgeranil pirofosfato; DXS, 1-deoxi-d-xilulosa-5-fosfato sintasa; DXR, 1-deoxi-d-xilulosa-5-fosfato reducto isomerasa; PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; ZDS, ζ-caroteno desaturasa; Z-ISO, 15-cis-ζ-caroteno isomerasa; CRTISO, caroteno isomerasa; LCYB, licopeno β-ciclasa; LCYE, licopeno ε-ciclasa; CHBX, caroteno β-hidoxilasa; CHEX, caroteno ε-hidoxilasa. Modificado de Rodríguez-Concepción and Stange (2013) y Simpson et al. (2016a).

1.3. Regulación de la síntesis de carotenoides en plantas

Debido a la importancia de estos pigmentos para las plantas, y las características beneficiosas para los animales, la regulación de la biosíntesis de los carotenoides ha sido estudiada por más de 40 años (Stange and Flores, 2012). Existen múltiples niveles de regulación: a nivel génico, transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona. Sin embargo, estudios sobre genes no carotenogénicos (genes que no codifican para las enzimas de la ruta de síntesis de carotenoides) que regulan este proceso, se han focalizado mayormente en órganos fotosintéticos (hojas) y en órganos no fotosintéticos (frutos y flores) de plantas modelos tradicionales como *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* (tabaco) y *Solanum lycopersicum* (tomate) (Romer and Fraser, 2005; Howitt and Pogson, 2006). Debido al objetivo central de esta investigación, solo se ahondará en los antecedentes respecto de la regulación mediada por luz.

1.3.1. Percepción de la luz y síntesis de carotenoides

La luz participa de funciones vitales como lo es la fotosíntesis y el desarrollo fotomorfogénico, que incluye la síntesis de carotenoides.

En el caso de la fotomorfogénesis, las plantas experimentan un conjunto de cambios en respuesta a la luz, como la de-etiolación. Este proceso se refiere al cambio en el desarrollo que se induce una vez que la planta ha percibido la luz por primera vez luego de la germinación. Inicialmente, luego de ocurrida la germinación, la plántula exhibe un color amarillo pálido o más bien blanquecino, debido a la falta de pigmentación (plántula etiolada). Una vez que la plántula percibe la luz se desarrolla el

proceso fotomorfogénico evidenciado en un fenotipo de-etiolado donde ésta se torna verde debido a que se activa el metabolismo fotosintético, que involucra la síntesis de clorofila y de carotenoides (plántula de-etiolada) (Quail, 2002; Kami et al., 2010; de Wit et al., 2016).

La percepción de la luz en las plantas, y por tanto la de-etiolación, se lleva a cabo gracias a la presencia de fotoreceptores como los fitocromos (PHYA-PHYE), los criptocromos (CRY) y fototropinas (Kami et al., 2010; Stange and Flores, 2012; de Wit et al., 2016). Los más estudiados son los PHY y CRY, los cuales son activados en presencia de luz, activando así la maquinaria de transducción de señales que a su vez estimula la transcripción de genes que responden a la luz, entre los que se encuentran los genes carotenogénicos dado que son necesarios para la fotosíntesis y la fotoprotección de las plantas (Rodríguez-Concepcion and Stange, 2013). La mayoría de los datos respecto de esta maquinaria de señalización provienen del estudio de la de-etiolación en *Arabidopsis thaliana* (Quail, 2002; Kami et al., 2010) (Figura 2). En términos generales, la luz induce la expresión de los genes carotenogénicos en las hojas, frutos y flores (Hirschberg, 2001; Simkin et al., 2003; Woitsch, 2003; Adams-Phillips et al., 2004; Giovannoni, 2004), en diferentes estadios del desarrollo de la planta, propiciando la transición de etioplastos a cloroplastos durante la fotomorfogénesis. En el caso de tomate, por ejemplo, se ha reportado que la luz activa los genes carotenogénicos a nivel transcripcional en hojas (Bramley, 2002). En tabaco la expresión del gen *Psy* se induce luego de la exposición continua de las hojas a luz roja y blanca (Woitsch, 2003) mientras que en hojas de pimiento se demostró una regulación negativa de los genes *Psy*, *Pds*, *Zds* y *Lcyb* en la oscuridad (Simkin et al., 2003). Este fenómeno se explica en la Figura 2, donde en condiciones de oscuridad los fitocromos se encuentran en su forma inactiva (PHY Pr) en el citoplasma de la célula

junto a CRY y los factores de transcripción pertenecientes a la familia de los PIF (Phytochrome-Interacting Factor) se acumulan y unen a elementos de respuesta a luz (Light Responsive Element o LRE) presentes en los promotores de genes que responden a luz, inhibiendo su expresión (Figura 2A). En condiciones de luz, los fitocromos en su forma activa (PHY Pfr) junto a los CRY, se translocan al núcleo, secuestran a los PIFs los que finalmente son degradados. Debido a esto, se favorece la unión de factores de transcripción como HY5 (Long Hypocotyl 5) que promueven la transcripción de genes de síntesis de clorofilas y carotenoides, como *Psy* (Figura 2B) (Toledo-Ortiz et al., 2010; Stange and Flores 2012; Rodriguez-Concepcion and Stange, 2013; Bou-Torrent et al., 2015; de Wit et al., 2016; Llorente et al., 2017).

Por otro lado, se ha demostrado que el co-factor transcripcional PAR1 (Phytochrome-Rapidly Regulated 1) se une a PIF1 y, de esta forma, impide la unión de este factor de transcripción al promotor del gen *Psy* en *Arabidopsis thaliana*, y por tanto favorece la síntesis de carotenoides (Bou-Torrent et al., 2015). Previamente se había reportado la participación de PAR1 en el síndrome de huida de la sombra (SAS), una respuesta mediada por la adaptación de las plantas a sombra que involucra a los fitocromos (Roig-Villanova et al., 2006; Roig-Villanova et al., 2007; Bou-Torrent et al., 2008; Hao et al., 2012; Zhou et al., 2014). Estos resultados aportan antecedentes respecto de la existencia de genes no carotenogénicos que estarían regulando la síntesis de carotenoides en las plantas siendo parte de una maquinaria dependiente de luz. Sin embargo, estos estudios se han realizado en tejido fotosintético, y con respecto a las raíces es muy escaso lo que se conoce de esta regulación.

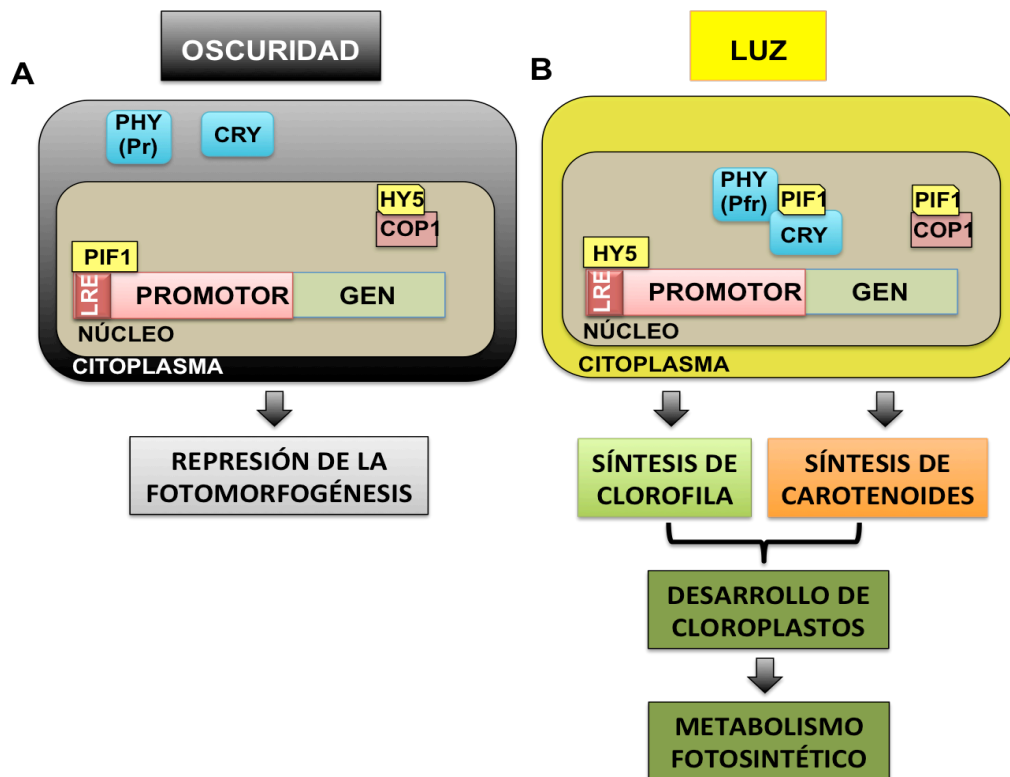


Figura 2. Señal de transducción dependiente de luz involucrada en el proceso de fotomorfogénesis (de-etiolación) en plantas. La transición entre la condición oscuridad (A) y la condición luz (B) permite la activación del metabolismo fotosintético gracias al desarrollo de cloroplastos una vez que es posible la síntesis de pigmentos. LRE: elementos de respuesta a luz; PHY Pr/Pfr: fitocromo inactivo/activo; CRY: criptocromo; HY5: factor de transcripción long hypocotyl 5; PIF1: factor de transcripción phytochrome interacting factor 1; COP1: constitutive photomorphogenic 1 (proteína que media la degradación de otras proteínas mediante el signalosoma). Adaptado de Stange and Flores, 2012.

1.4. *Daucus carota* como modelo de estudio de la síntesis de carotenoides

Daucus carota (zanahoria, $2n=18$) es una planta que se caracteriza por poseer una raíz de reserva que acumula carotenoides y cuyo genoma fue recientemente secuenciado

(Iorizzo et al., 2016). Gracias a la información obtenida a través de la secuenciación del genoma de la zanahoria tipo-Nantes (DH1), se pudo establecer que el tamaño de su genoma es aproximadamente de 480 Mb, con 32113 genes predichos ensamblados que corresponderían a 108,2 Mb del genoma secuenciado (Iorizzo et al., 2016).

Existen diversas variedades de zanahoria de distintos colores como las blancas, amarillas, moradas, naranjas y rojas, que poseen distinta composición de pigmentos carotenoides y antocianinas (Simpson et al., 2016a). La variedad más consumida posee una raíz modificada de color naranja que acumula altos niveles de α -caroteno y β -caroteno, que juntos constituyen hasta el 95% de los carotenoides totales, los que pueden alcanzar 1 mg/g peso seco (Fraser and Bramley, 2004; Baranska et al., 2006; Rodriguez-Concepcion and Stange, 2013; Simpson et al. 2016b). Las raíces jóvenes de zanahoria de 4 semanas, son delgadas y pálidas, y solo luego de 8 semanas de cultivo comienzan a engrosar y acumular carotenoides, llegando a un máximo después de los 3 meses creciendo en oscuridad (Clotault et al., 2008; Stange et al., 2008; Fuentes et al., 2012; Simpson et al. 2016a). Esto último nos sugiere que deben existir mecanismos que regulan coordinadamente tanto el desarrollo de la raíz modificada como la síntesis y acumulación de carotenoides en ésta, y nuestro conocimiento al respecto es aún limitado. En nuestro grupo de estudio hemos caracterizado la función de genes de síntesis de carotenoides como *Dxs* (Simpson et al., 2016b), *Psy1* y *Psy2* (Carvajal, 2011; Simpson et al., 2018), *Lcyb1* (Moreno et al., 2013; Moreno et al., 2016), *Lcyb2* (Rosas, 2015), *Zds1* y *Zds2* (Flores, 2010). Con estos estudios hemos constatado que los genes caracterizados codifican para enzimas funcionales que inducen aumento en carotenoides y clorofila en sistemas heterólogos como bacterias, plantas modelos y/o en zanahoria.

Por otro lado, al ser la luz un recurso fundamental para la síntesis de pigmentos en tejido fotosintético y en frutos, hemos estudiado el rol que cumple este estímulo en el desarrollo y síntesis de carotenoides en *Daucus carota*. En este contexto, la zanahoria es un modelo interesante ya que sintetiza carotenoides en la raíz de reserva en ausencia de luz y en hojas en presencia de luz (Fuentes et al., 2012).

1.4.1. Regulación de los genes carotenogénicos mediada por la luz en zanahoria

Todos los genes carotenogénicos son expresados tanto en hojas como en la raíz de la planta durante su desarrollo. En la raíz de zanahoria, los genes carotenogénicos son inducidos durante su desarrollo en oscuridad (Stange et al., 2008; Clotault et al., 2008; Fuentes et al., 2012) en correlación con el aumento de carotenoides en los cromoplastos, donde son almacenados como cristales (Maass et al., 2009; Fuentes et al., 2012).

En trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación, se ha demostrado que la luz reduce la acumulación de carotenoides en la raíz de zanahoria y también los niveles de transcritos de los genes carotenogénicos, en particular aquellos que conllevan a la síntesis de β -caroteno (Fuentes et al., 2012). A las 8 semanas de crecimiento de la planta, su raíz de reserva crecida en condiciones de oscuridad (R/O) comienza a engrosar y acumular carotenoides, tornándose de un color anaranjado (Suslow, 1999; Clotault et al., 2008). Sin embargo, cuando esta raíz de 8 semanas de desarrollo es crecida en luz (R/L), a simple vista se constata que es una raíz delgada y de color verde, como se muestra en la Figura 3 (Stange et al., 2008; Fuentes et al., 2012). Además, en la raíz crecida en luz (R/L), se induce el desarrollo de cloroplastos

(mayor presencia de clorofila) en vez de cromoplastos (acumuladores de carotenoides) a partir de proplastidios en la raíz (Fuentes et al., 2012).

Es evidente entonces que la luz juega un rol diferente en la síntesis de carotenoides entre distintas especies. Es posible que existan genes (no carotenogénicos) que son parte de una maquinaria de regulación compleja en zanahoria, dependiente de la ausencia de luz, que regulan la síntesis y acumulación de pigmentos carotenoides en las raíces de zanahoria. Es así que se vuelve interesante el estudio y la búsqueda de nuevos factores que participen en la regulación del proceso de síntesis o acumulación de carotenoides en *Daucus carota*.

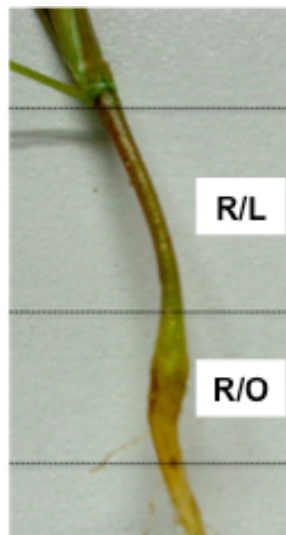


Figura 3. Fenotipo de una raíz de zanahoria de 8 semanas. Parte de esta raíz fue crecida en luz (R/L, raíz/luz) y la otra sección creció en condiciones de oscuridad (R/O, raíz/oscuridad).

1.5. Secuenciación del genoma y de los transcritos en *Daucus carota*

Si bien el año 2007 Just et al. depositaron en la base de datos de NCBI las secuencias completas de cDNA de la mayoría de los genes carotenogénicos de zanahoria, los

estudios sobre la ruta de biosíntesis de estos pigmentos se limitaban debido a que no existía la secuenciación de su genoma.

El surgimiento de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva de alto rendimiento (Shendure and Ji, 2008; Morey et al., 2013), ha permitido que una mayor cantidad de información genómica y transcriptómica de zanahoria esté disponible hoy en diferentes bases de datos como NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/LNRQ00000000>) y Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>).

En el año 2011 se reportó el primer transcriptoma *de novo* de zanahoria, gracias al cual se identificaron nuevos genes involucrados en la síntesis de antocianinas (Iorizzo et al. 2011). Posteriormente, se reportaron trabajos en los que se utilizó la tecnología de secuenciación para generar transcriptomas *de novo* de zanahoria (Rong et al., 2014; Xu et al., 2014a; Xu et al., 2014b; Chen et al., 2015; Huang et al., 2015; Tian et al., 2015; Wang et al., 2015a; Wang et al., 2015b). En la publicación de Xu et al. (2014b) se reportó la secuenciación *de novo* del genoma de *Daucus carota* ssp. *sativus* L. ('DC-27'), lo que les permitió a los investigadores desarrollar una base de datos genómica y transcriptómica de zanahoria llamada CarrotDB (<http://apiaceae.njau.edu.cn:8080/carrotdb/>).

En el año 2016, Iorizzo et al. publicó la secuenciación del genoma de *Daucus carota*, dejando a libre disposición secuencias genómicas, transcritos y proteínas en plataformas como NCBI y Phytozome. Por otro lado, luego de la publicación de Iorizzo et al. (2016), se han publicado trabajos que toman como referencia este genoma para el estudio de diversos fenómenos biológicos que ocurren en la zanahoria o que se relacionan a su domesticación (Ellison et al., 2017; Ma et al., 2018; Ellison et al., 2018; Machaj et al., 2018).

1.5.1. Transcriptoma *de novo* de la raíz de zanahoria de 8 semanas crecida en luz (R/L) versus la crecida en oscuridad (R/O)

En el año 2014, en nuestro grupo de investigación se realizó una secuenciación de los transcritos de la raíz de zanahoria de ocho semanas que crece en luz (R/L) y en oscuridad (R/O), con el objetivo de ahondar respecto de los mecanismos y/o genes que estarían involucrados en la síntesis de carotenoides en una raíz que crece en ausencia de luz y de ampliar la investigación ya publicada en Stange et al. (2008) y Fuentes et al. (2012). La razón principal por la cual se escogió las ocho semanas de desarrollo para realizar la secuenciación fue que es el momento en el que ocurre la transición de una raíz delgada y sin pigmentación hacia una raíz engrosada y acumuladora de carotenoides. Esta transición además, va acompañada de un aumento en los niveles de transcritos de los genes carotenogénicos (Clotault et al., 2008; Stange et al., 2008; Fuentes et al., 2012) y probablemente, de los niveles de transcritos de genes no carotenogénicos reguladores del proceso de síntesis de carotenoides.

Teniendo en cuenta que en la fecha en que se realizó la secuenciación de los transcritos de la zanahoria no se contaba con un genoma de referencia (Iorizzo et al., 2016), se ensambló un transcriptoma modelo de raíz de zanahoria de 8 semanas R/L vs. R/O de 63124 contigs (sección 2.6.), trabajo realizado en el laboratorio de Genómica Funcional & Bioinformática de la Facultad de Ciencias Agronómicas, de la Universidad de Chile, por los doctores Jonathan Maldonado y Herman Silva. Sobre este transcriptoma modelo, finalmente se realizó el análisis RNA-Seq analizado en esta tesis.

1. 6. Propuesta de investigación para esta tesis de doctorado

Teniendo en cuenta que, al contrario de lo descrito en otros modelos, la luz tiene un efecto negativo sobre la expresión de genes carotenogénicos y la acumulación de carotenoides en la raíz modificada de zanahoria, es que *Daucus carota* se convierte en un modelo de estudio interesante para profundizar nuestros conocimientos sobre carotenogénesis en plantas (específicamente en raíces) y el rol regulatorio que tendría la luz (su presencia/ausencia) sobre este proceso. Los resultados obtenidos podrían aportar también a entender la razón de la gran capacidad de síntesis y acumulación de pigmentos que posee esta especie en comparación con otras. Nuestras observaciones anteriores nos llevaron a plantear variadas preguntas, como por ejemplo, ¿qué mecanismos moleculares inducidos por la presencia/ausencia de luz, estarán involucrados en la regulación de la síntesis y/o acumulación de carotenoides en la raíz de zanahoria?. Por otro lado, considerando que los genes carotenogénicos de zanahoria están bastante caracterizados por nuestro grupo de investigación y también por otros grupos, nos insta a ampliar nuestros blancos de estudio y comenzar con la búsqueda y caracterización de genes que no forman parte de la ruta de síntesis pero que podrían estar regulándola. Por tanto, cabe preguntarse ¿qué genes, que no son parte de la ruta de biosíntesis de carotenoides, estarán involucrados en la síntesis de estos pigmentos en la raíz de zanahoria? y ¿cómo son regulados estos genes por la luz/oscuridad?

Utilizando el transcriptoma *de novo* modelo ensamblado a partir de la secuenciación de la raíz de 8 semanas R/L versus R/O, trabajo que se realizó previo a esta tesis, la

propuesta consistió en realizar un análisis RNA-Seq entre estas dos condiciones experimentales. Utilizando esta estrategia, se propuso determinar qué gen (o genes) no carotenogénico(s) está(n) expresándose en la raíz de zanahoria de 8 semanas crecida en oscuridad (R/O) y reprimiéndose en la condición de luz (R/L), poniendo énfasis en aquellos genes que pudieran estar relacionados a la síntesis de carotenoides y/o siendo regulados por oscuridad o luz. Entre los genes diferencialmente expresados se seleccionó un gen en particular para su caracterización funcional y determinar así su participación en la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva de *Daucus carota*, de tal modo de aportar y ampliar nuestro entendimiento respecto de los mecanismos regulatorios que rigen la síntesis de carotenoides en esta planta. Por otro lado, la identificación de nuevos genes que participan de forma directa o indirecta en la síntesis de carotenoides en zanahoria tienen un potencial uso biotecnológico en el contexto de desarrollo de alimentos funcionales biofortificados y/o en la producción de carotenoides con fines comerciales.

La propuesta de investigación y su flujo de trabajo se resume en la Figura 4.

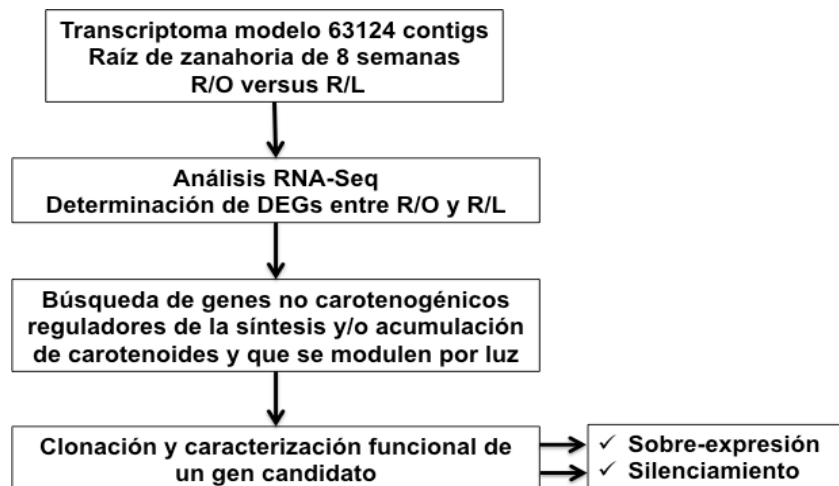


Figura 4. Esquema que resume la estrategia de trabajo de esta tesis. R/O: raíz de zanahoria de 8 semanas crecida en oscuridad; R/L: raíz de zanahoria de 8 semanas crecida en luz; DEGs: genes diferencialmente expresados (por sus siglas en inglés).

1.7. Hipótesis de trabajo

Genes no carotenogénicos cuya transcripción es afectada negativamente por la luz, participan en la síntesis o acumulación de carotenoides en la raíz de *Daucus carota* que crece en oscuridad.

1.8. Objetivos del trabajo

1.8.1. Objetivo general

Identificar genes no carotenogénicos cuya transcripción sea regulada negativamente por la presencia de luz en la raíz de *Daucus carota* y determinar la participación de uno de ellos en la síntesis o acumulación de carotenoides mediante una caracterización funcional.

1.8.2. Objetivos específicos

- a) Analizar *in silico* el transcriptoma de *Daucus carota*, e identificar genes diferencialmente expresados (DEGs) en la raíz de zanahoria crecida en oscuridad (R/O) versus la crecida en luz (R/L).
- b) Validar el análisis de ensamble bioinformático y la expresión diferencial de genes identificados en el transcriptoma.
- c) Seleccionar un gen regulado negativamente por la luz para ser caracterizado funcionalmente mediante sobreexpresión y/o silenciamiento en *Daucus carota*.

2. Materiales y Métodos

2.1. Medios de cultivo y materiales de biología molecular

Se utilizaron reactivos de calidad apropiada para llevar a cabo las técnicas de biología molecular y cultivo de bacterias y plantas. Estos reactivos eran de marcas como Fermentas, Merck, Invitrogen, New England BioLabs, Promega, Axygen, Agilent technologies, Sigma-Aldrich y Phyto Technology Laboratories.

2.2. Materiales Biológicos

Se utilizaron plantas de zanahoria variedad Nantesa, las que fueron cultivadas *in vitro* y en invernadero acondicionado para tal propósito.

Las cepas bacterianas utilizadas fueron células de *Echerichia coli* quimiocompetentes comerciales TOP10 F- *mcrA* Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 Δ lacX74 *nupG* *recA1* *araD139* Δ(ara-leu)7697 *galE15* *galk16* *rpsL*(Str^R) *endA1* ē⁻ (Invitogen™) con el fin de propagar los plásmidos obtenidos en esta tesis, además de células quimiocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101.

2.3. Métodos de cultivo y transformación

2.3.1. Cultivos bacterianos de *E. coli* TOP10 y *A. tumefaciens* GV3101

Para generar los cultivos de *E. coli* TOP10 transformadas con los vectores generados en esta tesis, se inocularon alícuotas de estas células en medio LB líquido (Tryptona

1% p/v; NaCl 0.8% p/v y extracto de levadura 0,5% p/v) o bien en placas de Petri con medio LB sólido (medio LB líquido suplementado con agar-agar 1,6 %), suplementado con el antibiótico de selección correspondiente al plásmido introducido, y mantenido durante 12 horas a 37°C a 200 rpm.

Para generar los cultivos de *A. tumefaciens* GV3101, se cultivaron estas células en medio LB líquido suplementado con rifampicina 10 mg/L (antibiótico que permite la selección cromosómica), gentamicina 50 mg/L (antibiótico que permite la selección del material genético extra-cromosómico en esta cepa) más el antibiótico de selección del plásmido de interés, durante 20 horas a 28°C.

Ambas cepas bacterianas fueron alicuotadas para su almacenamiento a -80°C, en una mezcla de 800 µL de cada cultivo con 200 µL de glicerol 80% estéril.

2.3.2. Generación de células de *A. tumefaciens* GV3101 competentes

Se inoculó *A. tumefaciens* GV3101 en 5 mL de LB líquido suplementado con 10 mg/L de rifampicina y gentamicina 50 mg/L, crecido a 28°C en agitación por 16 horas. Luego, se vaciaron los 5 mL de cultivo anterior en 100 mL de LB líquido fresco, manteniendo las mismas condiciones de cultivo y suplemento de antibióticos antes mencionados, hasta que se alcanzó una D.O.₆₀₀ de 0,5. Luego se incubó el cultivo en hielo por 10 min. y se centrifugó a 4°C durante 20 min a 3000xg. Se eliminó el sobrenadante obtenido y el precipitado de células fue resuspendido suavemente en 1 mL de CaCl₂ 20 mM frío y estéril. Las células se almacenaron a -80°C en alícuotas de 100 µL en 30% de glicerol hasta su utilización.

2.3.3. Transformación de *E. coli* TOP10 quimiocompetentes con los vectores de interés

Al tratarse de cepas quimiocompetentes comerciales, este procedimiento se realizó según las recomendaciones del fabricante (Invitogen™). Brevemente, se añadieron entre 2-7 µL del vector de interés a 100 µl de células quimiocompetentes y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Luego, se les dio un golpe de calor por 30 segundos a 42°C, para inmediatamente ser transferidos a hielo. Se añadió a las células 250 µL de medio LB líquido sin antibióticos y de esta manera se cultivaron por 1 hora en agitación constante (200 rpm) a 37°C. Finalmente, se sembraron entre 50-100 µL de las células transformadas en medio LB sólido suplementado con el antibiótico requerido para seleccionar el vector de interés, y se cultivaron a 37°C durante toda la noche. La corroboración de colonias transformantes se realizó mediante PCR de colonia (sección 2.4.2.2.).

2.3.4. Transformación de *A. tumefaciens* GV3101 competentes con los vectores de interés

Alícuotas de 100 µL de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 competentes se descongelaron en hielo y cada una de ellas se mezcló con 300-500 ng del vector de interés. Estas mezclas se sometieron a un golpe de frío sumergiéndolas 5 minutos en N₂ líquido, para posteriormente permitir su descongelamiento a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se les agregó 1 mL de medio LB líquido y se incubaron en agitación constante (200 rpm) a 28°C durante 4-6 horas. Luego, se centrifugaron las muestras (6000xg por 5 minutos), se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado de células en 100 µL de medio LB líquido. Finalmente, se sembraron los

cultivos en medio LB sólido suplementado con rifampicina 10 mg/L, gentamicina 50 mg/L y el antibiótico de selección del vector de interés, y se incubó por 36-48 horas a 28°C. Las colonias de *A. tumefaciens* transformadas con los distintos vectores de interés y chequeadas por PCR de colonias, fueron crecidas en medio LB líquido suplementado con rifampicina 10 mg/L, gentamicina 50 mg/L y el antibiótico de selección del vector de interés durante toda la noche en agitación constante a 28°C; luego fueron alicuotadas en glicerol y almacenadas a -80°C, para su posterior uso en las transformaciones de plantas.

2.3.5. Cultivo de *A. tumefaciens* para la transformación de *Daucus carota*

A. tumefaciens GV3101 transformada con el vector de interés se cultivó toda la noche en medio LB líquido suplementado con los antibióticos correspondientes, en agitación constante a 28°C hasta alcanzar una D.O₆₀₀ de 0,3-0,6. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 2000xg durante 15 minutos, y el sedimento obtenido se resuspendió en medio MS líquido suplementado con acetosiringona 100 µM [(Medio Murashige & Skoog Basal Medium with vitamins (PhytoTechnology Laboratories®) más sacarosa 3%]. Finalmente, se midió nuevamente la D.O₆₀₀ para corroborar que se mantuvo en los parámetros deseados.

2.3.6. Cultivo y transformación de *Daucus carota*

2.3.6.1. Cultivo de *Daucus carota*

El cultivo se realizó según lo descrito en Chen and Punja (2002) y Moreno et al. (2013). Para esto, semillas de la variedad Nantesa fueron esterilizadas superficialmente sumergiéndolas en una solución al 2% (p/v) de fungicida captan con agitación constante durante 20 minutos. Luego, se sumergieron las semillas en hipoclorito de sodio comercial y se agitaron durante 30 minutos más. Finalmente, las semillas fueron enjuagadas 4-5 veces con agua destilada estéril, secadas sobre papel absorbente estéril, todo en condiciones de esterilidad. Luego las semillas fueron sembradas sobre medio de germinación (Tabla 1, sección Anexo) e incubadas en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas luz a 25°C. Plántulas de entre 10-20 días obtenidas por este medio fueron utilizadas como material vegetal para las transformaciones y/o para su traspaso a tierra.

Para el cultivo en tierra, las semillas fueron sembradas directamente sobre tierra esterilizada (mezcla de tierra más vermiculita en una proporción 1:1 humedecida y autoclavada) o traspasadas desde cultivo *in vitro*. Las plantas se cultivaron en condiciones de invernadero y fueron regadas 1-2 veces por semana.

2.3.6.2. Transformación y embriogénesis somática de *Daucus carota*

El protocolo de transformación y embriogénesis somática se llevó a cabo según lo descrito previamente en Chen and Punja (2002) y Moreno et al. (2013). El contenido de los medios de cultivo se detalla en la Tabla 1 sección Anexo. Hipocótilos de plántulas

de entre 10-20 días post-germinación crecidas *in vitro*, fueron cortados en secciones de 5 cm aproximadamente. Luego, estas secciones se sumergieron en una solución que contiene *A. tumefaciens* transformado con el vector de interés (sección 2.3.4.), y luego cortadas en secciones de 1 cm aproximadamente. Estos explantes posteriormente se traspasaron al medio de co-cultivo (Tabla 1 sección Anexo) y mantenidos durante dos días en oscuridad a 25°C en la cámara de cultivo. Posterior a esta incubación en medio de co-cultivo, los explantes transformados fueron sometidos a 3 lavados con agua estéril más 1-2 lavados con medio MS líquido (medio MS con vitaminas sin sacarosa), esto con el objetivo de eliminar el exceso de *A. tumefaciens*, y secados sobre papel absorbente estéril. Los explantes fueron traspasados al primer medio de cultivo (MI; Tabla 1 sección Anexo) suplementado con higromicina 2 mg/L para la selección de embriones transformantes y mantenidos en oscuridad en una cámara de cultivo a 25°C. Después de 4-6 semanas, los explantes se traspasaron al segundo medio de cultivo (MII; Tabla 1 sección Anexo) suplementado con higromicina 4 mg/L y mantenidos en condiciones de luz (16 h), a 25°C por 4-6 semanas. Finalmente, los explantes fueron traspasados al tercer medio de cultivo (MIII; Tabla 1 sección Anexo) suplementado con higromicina 6 mg/L hasta que los embriones formaron plantas completas (entre 4-6 semanas). Plántulas transformantes de 5 cm de longitud aproximadamente, fueron traspasadas a tierra, aclimatadas y cultivadas en condiciones de invernadero (sección 2.3.6.1.). Durante todo el proceso de transformación y embriogénesis somática se incluyeron controles positivos y negativos del proceso, siendo los controles positivos explantes sin transformar que se cultivaron en todos los medios sin suplemento del agente de selección, y los controles negativos por el contrario, correspondieron a explantes sin transformar que fueron cultivados en los mismos medios suplementados con higromicina.

2.4. Métodos de Biología Molecular

2.4.1. Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos

2.4.1.1. Extracción de RNA a partir de raíz y hojas de zanahoria

Para la extracción de RNA a partir de raíz u hojas de zanahoria se utilizaron entre 50-200 mg de tejido, el cual fue congelado con N₂ líquido y macerado en estas condiciones en morteros estériles hasta obtener un polvo muy fino, cuidando que el tejido no se descongelara en ningún momento. Se mezcló el tejido con 800 µL a 1 mL de buffer de extracción (CTAB 2%, PVP40 2%, EDTA 25 mM, NaCl 2 M, TrisHCl 100 mM, Trihidroclorato de espermidina 0,05% y β-mercaptoetanol 2%), el que previamente fue calentado a 65°C (Fuentes et al., 2012). Se incubó la muestra a 65°C con agitación ocasional durante 20 min, para luego ser mezclada con 1 volumen de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v). La mezcla se centrifugó dos veces a 12000 rpm por 15 minutos, rescatándose el sobrenadante. El sobrenadante fue mezclado nuevamente con la solución de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v) y centrifugado por 15 minutos, hasta obtener un sobrenadante limpio. Finalmente, la fase rescatada que contiene el RNA, fue precipitada utilizando LiCl 10M durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó la muestra (12000 rpm por 15 minutos), se obtuvo el precipitado de RNA el cual fue lavado con 1 mL de etanol 75% (en agua libre de nucleasas), para ser resuspendido en 20 µL de agua libre de nucleasas y almacenado a -80°C hasta su uso. La integridad y pureza del RNA obtenido se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa y su concentración fue determinada mediante espectrofotometría (NanoVue™).

2.4.1.2. Extracción de DNA genómico de zanahoria

La extracción del DNA genómico de plantas se realizó siguiendo una modificación del método descrito inicialmente por Doyle y Doyle (1987). Aproximadamente 200 mg de tejido de hoja fueron pulverizados en morteros en presencia de nitrógeno líquido y se les agregó 600 μ L del tampón CTAB (bromuro de cetil trimetilamonio al 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20mM y Tris 100 mM pH 8) precalentado a 60°C y 4 μ L de β -mercaptoetanol. La mezcla se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL y se incubó con agitación ocasional durante 20 minutos a 60°C. Luego se adicionó 400 μ L de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. y la fase acuosa superior (donde se encuentra soluble el DNA) se precipitó con un volumen de isopropanol durante 10 min. a -80°C (o a -20°C por 1 hora). Luego de una centrifugación a 13000 rpm por 10 min. se obtuvo el precipitado de DNA, el cual fue lavado con etanol 75% (en agua libre de nucleasas), secado y resuspendido en 50 μ L de agua libre de nucleasas. La integridad y pureza del DNA obtenido se verificó como se señaló en la sección 2.4.1.1.

2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.4.2.1. PCR convencional con DNA genómico o DNA complementario (cDNA) de zanahoria

Las reacciones de PCR convencional se llevaron a cabo para amplificar los genes desde el DNA genómico, y de este modo verificar la presencia del inserto en plantas transformadas. También se realizaron amplificaciones por PCR convencional desde cDNA para determinar la adecuada síntesis de esta molécula, amplificando el gen de

expresión constitutiva ubiquitina. Cada reacción de PCR se llevó a cabo en mezclas de 25 μ L en agua libre de nucleasas con 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, New England BioLabs o Sigma), 1x del tampón de la Taq DNA polimerasa, $MgCl_2$ 2 mM (solo cuando fue requerido), dNTPs 200 μ M (Fermentas), 200 nM de partidor en sentido, 200 nM de partidor en antisentido y 1-2 μ L de DNA o cDNA blanco. En todas las reacciones de PCR se realizó en paralelo una reacción de control negativo, carente de blanco, y cuando fue posible, se realizó también una reacción de control positivo, utilizando un DNA que previamente había sido chequeado en cuanto a su calidad y utilizado en otras reacciones de PCR. En el caso de las reacciones de PCR para la verificación de la correcta síntesis del cDNA (RT-PCR), se incluyó además un PCR control realizado a todas las reacciones de tratamiento de RNA con la enzima DNasa I. Este control consistió en reacciones de PCR utilizando como templado una cantidad equivalente de RNA proveniente desde el tratamiento con DNasa I, con el fin de asegurar la ausencia de DNA genómico en los cDNAs sintetizados. Todos los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis en geles de agarosa. El programa general de PCR convencional se detalla en la Tabla 3 sección Anexo. La temperatura de hibridación de los partidores es específica para cada par de partidores y se ajustó de acuerdo a la temperatura de disociación (TM) teórica de cada partidor. El tiempo de extensión dependió a su vez del tamaño del fragmento a amplificar y se estima en 1 minuto por cada 1000 pb a amplificar. Variaciones en este protocolo se indican en los resultados.

2.4.2.2. PCR de colonias de *E. coli* TOP10 y *A. tumefaciens* GV3101 transformadas con vectores de interés

Para determinar las colonias de *E. coli* o *A. tumefaciens* GV3101 transformantes se realizaron reacciones de PCR utilizando directamente una muestra de las colonias formadas en las placas Petri con medio LB sólido luego de la transformación celular (sección 2.4.7.2.). Para esto, se picó una colonia utilizando una punta de pipeta estéril para luego llevarla hacia la mezcla de reacción de PCR y resuspender la muestra bacteriana tomada en el mix de PCR (mix que incluye todo menos el DNA templado, que en este caso se reemplaza por la muestra de la colonia). La reacción de PCR se llevó a cabo en una mezcla de 25 μ L en agua libre de nucleasas con 1U de Taq DNA polimerasa (New England BioLabs o Sigma), 1x del tampón de Taq DNA pol, 200 μ M de dNTPs (Fermentas), 200 nM de partidor en sentido, 200 nM de partidor en antisentido y la muestra directa de la colonia bacteriana picada y resuspendida en el mix, siguiendo el programa "PCR de colonias" (Tabla 3 sección Anexo). Los partidores utilizados fueron específicos para cada gen analizado y los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

2.4.2.3. Tratamiento de DNAsa I y Síntesis de cDNA

Estos procedimientos se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante con modificaciones detalladas a continuación. Con el objetivo de sintetizar la hebra de DNA complementaria al RNA mensajero de zanahoria (cDNA), se realizaron reacciones de transcripción reversa (RT) utilizando la enzima RT Improm II (Promega). Primero, entre 3-7 μ g de RNA total fue incubado con DNAsa I con el propósito de eliminar remanentes

de DNA que pudieran estar presentes en la muestra producto del proceso de extracción de RNA. Para esto cada reacción con 3-7 µg de RNA de alta pureza se incubo con 1 µL de DNasa I (Fermentas), 1 µL de Inhibidor de RNasa (Ribolock, Fermentas) y 2 µL de tampón de la DNAsal (Fermentas), en agua libre de nucleasas en un volumen de reacción de 20 µL, durante 40 min, a 37°C en el termociclador. Luego, la reacción se detuvo agregando 1 µL de EDTA 50 mM e incubando a 65°C durante 10 minutos con el fin de inactivar la DNasa I.

Para la síntesis del cDNA, primero se tomaron 9 µL del RNA tratado con DNasa I (aproximadamente 3 µg de RNA) y se incubó con 1,5 µL de oligo AP 10 µM (5'-CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT -3') durante 5 minutos a 70°C. Se pausó el programa 'RT-PCR' y se enfriaron las reacciones en hielo durante 5 minutos y seguido a esto se le añadió 9,5 µL de una mezcla de RT en agua libre de nucleasas (0,5 µL de Inhibidor de RNasa (Ribolock, Fermentas), 1 µL de dNTPs 10 mM (Fermentas), 2,8 µL de MgCl₂ 25 mM, y 4 µL de tampón 5x de la RT Improm II (Promega) y 1,2 µL de RT Improm II (Promega)) en tubos de 0,2 mL y se continuó el programa en el termociclador. Finalmente, se obtuvieron 20 µL finales de cDNA por cada muestra de RNA inicial.

2.4.2.4. Determinación de la expresión relativa de genes mediante PCR en tiempo real (qRTPCR)

Para la determinación de los niveles de transcritos de los genes (expresión relativa), se llevaron a cabo reacciones de qRTPCR utilizando el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para el cálculo de la expresión relativa de genes, se siguió el método descrito por Pfaffl en 2001.

En términos generales, se utilizaron 10 ng de cDNA por cada reacción de qRT-PCR realizada. En cada experimento se utilizaron tres réplicas biológicas, que consistían en 3 réplicas de RNA extraídas desde 3 distintos grupos de plantas (en el caso de raíces de 8 semanas crecidas en oscuridad o en luz) o desde 3 zonas distintas de la misma planta (en el caso de raíces de zanahorias transgénicas o silvestres (WT) y hojas). A partir de estas réplicas biológicas de RNA se sintetizó el cDNA y durante los ensayos de qRT-PCR se utilizaron 2 réplicas técnicas por cada réplica biológica. Los partidores utilizados fueron diseñados específicamente para este tipo de experimento amplificando cada par un tamaño entre 100 a 200 pb mientras que las eficiencias fueron determinadas según Fuentes et al. (2012). Las secuencias de cada partidore utilizado se señalan en la Tabla 4 sección Anexo. El programa de amplificación o perfil térmico utilizado se detalla en la Tabla 3 sección Anexo.

Con respecto a la evaluación de los niveles de transcritos de genes en plantas transgénicas, se utilizó como calibrador o control, los niveles de transcritos de los genes en plantas silvestres (WT). En el caso de la evaluación de los niveles de transcritos de genes en zanahorias crecidas en luz y oscuridad, se utilizó como calibrador los niveles de transcritos de los genes de la zanahoria crecida en oscuridad. Como normalizador de los transcritos de todos los genes analizados, tanto en plantas transgénicas, plantas silvestres (WT) y plantas crecidas en luz y oscuridad, se utilizó el nivel de transcritos de un gen constitutivo cuya expresión relativa no cambió en ningún caso experimental, como es el caso de ubiquitina, miosina y/o actina según el ensayo (Tabla 4 sección Anexo).

2.4.3. Amplificación mediante PCR del gen de *Daucus carota* *DcPar1*

Desde el año 2016 se cuenta con el genoma de *Daucus carota* disponible en plataformas como NCBI y Phytozome (Iorizzo et al., 2016). Utilizando la secuencia nucleotídica de los contigs correspondientes a *DcPar1* (encontrados en el transcriptoma analizado en este trabajo, sección 2.6.), se realizó una búsqueda del CDS (secuencia codificante) completo de este gen mediante Blast. Como resultado, se obtuvo la secuencia del CDS de *DcPar1* (número acceso NCBI XM_017390696.1), secuencia que presentaba un alto porcentaje de identidad con el contig (sobre el 70% de identidad). Por lo tanto, se diseñaron partidores *Forward* y *Reverse* (Tabla 2 sección Anexo) para amplificar desde el ATG del gen hasta el codón de termino o hasta un codón antes del término para su clonación fusionado al gen reportero *Gfp* (que codifica la proteína fluorescente verde, GFP). Para la amplificación, se utilizó como templado el ADN complementario (cDNA) de raíz de zanahoria adulta.

2.4.4. Clonación del gen *DcPar1* en vector de entrada

Para la clonación del gen, se utilizó como vector de entrada, el plásmido PCRTM8/GW/TOPO[®] vector (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Primero, luego de la amplificación del CDS del gen utilizando cDNA (sección 2.4.2.3), se realizó una extracción del fragmento amplificado desde el gel de agarosa (1% v/v) utilizando el kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Este fragmento purificado se ligó al vector de entrada, para luego ser introducido en células competentes de *E. coli* TOP10, las cuales fueron crecidas toda la noche a 37°C en medio LB sólido suplementado con el antibiótico de selección Espectinomicina (100

mg/L). Se comprobó la presencia del vector en las bacterias mediante PCR de colonia (sección 2.4.2.2.) utilizando los partidores *Forward* y *Reverse* (Tabla 2 sección Anexo) del gen clonado. A las colonias positivas por PCR se les realizó una extracción del plásmido utilizando el kit E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I (OMEGA bio-tek).

El plásmido purificado, denominado PCR8:DcPar1, fue sometido a ensayos de digestión con enzimas de restricción para verificar la presencia del inserto y el sentido en el cual fue ligado el fragmento clonado (en sentido o en antisentido). Para comprobar la presencia del inserto, se digirió el plásmido PCR8:DcPar1 con la enzima EcoRI (Thermo Scientific), la cual corta a ambos lados del inserto ligado al vector (entre los sitios de recombinación *attL1* y *attL2*), liberando así el inserto de 363 pb. Para comprobar el sentido en el cual se clonó el fragmento en el vector de entrada PCR8:DcPar1, éste se digirió con la enzima Bgl I (Thermo Scientific) que posee un sitio de corte dentro del fragmento de *DcPar1* y otro en el vector. Finalmente, el vector de entrada fue secuenciado en Macrogen, USA (www.macrogenusa.com).

2.4.5. Obtención de vectores de destinación para la expresión en plantas

Para la clonación en el vector binario se utilizó la metodología Gateway™ de clonación por recombinación. El vector utilizado para la transformación estable de zanahoria con el gen *DcPar1* fue PGWB5, el que posee sitios de recombinación Gateway™ (*attR1* y *attR2*), un promotor de expresión constitutiva en plantas CaMV 35S y la secuencia del gen reportero *Gfp*, la cual queda fusionada al gen de interés en el extremo 3'UTR. Dado que el vector de entrada PCR8:DcPar1 también posee sitios de recombinación Gateway™ (*attL1* y *attL2*), se llevó a cabo una recombinación entre el vector de entrada y el de destinación, utilizando el Kit Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix

(Thermo Fisher scientific), según las indicaciones del fabricante. Luego, las células competentes de *E. coli* TOP10 fueron transformadas con el producto de recombinación y crecidas en medio LB sólido toda la noche a 37°C, suplementado con el antibiótico de selección Kanamicina (100 mg/L). Se comprobó la presencia del vector en las bacterias crecidas mediante PCR de colonia, utilizando los partidores *Forward* y *Reverse* (Tabla 2 sección Anexo) del gen clonado. A las colonias positivas por PCR se les realizó una extracción del plásmido con el kit E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I (OMEGA bio-tek) y finalmente, el plásmido purificado, denominado PG5:DcPar1, fue utilizado para transformar *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 (sección 2.3.4.), bacterias que se utilizaron para la transformación estable de *Daucus carota* (sección 2.3.6.2.).

2.4.6. Obtención de vector para silenciamiento de genes en plantas

Con el objetivo de silenciar el gen *DcPar1*, se optó por clonar la secuencia del gen en orientación antisentido. Para esto, se siguió la metodología de clonaje como se describe en las secciones 2.4.3. y 2.4.4.. Mediante la digestión del vector de entrada PCR8:DcPar1 con la enzima de restricción Bgl I (Thermo Scientific), se determinó y seleccionó aquellos plásmidos cuyo patrón de digestión indicara que el fragmento clonado estaba en orientación antisentido, obteniéndose así el vector de entrada para el silenciamiento del gen *DcPar1*: PCR8:DcPar1AS. Este plásmido de entrada fue secuenciado (Macrogen, USA) y utilizado para la recombinación Gateway™ con el vector de destinación PGWB5, tal como se describe en la sección 2.4.5. Finalmente, el producto de recombinación, el plásmido pG5:DcPar1AS, fue transformado en *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101, la que se utilizó para transformar explantes de zanahoria (sección 2.3.6.2.).

2.4.7. Obtención de vectores para ensayos de BifC (*Bimolecular fluorescence complementation*)

En este trabajo se utilizaron vectores binarios de destinación BifC basados en la tecnología GatewayTM, (GatewayTM-based BifC binary vectors, pYFC43 y pYFN43; Belda-Palzón et al., 2012). Estos vectores fueron donados por el Dr. Jaume Martínez-García del Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG), CSIC-IRTA-UAB-UB, Barcelona, España. Brevemente, estos vectores BifC poseen entre los sitios *attR*, la secuencia que codifica para la región N-terminal o para la región C-terminal de la proteína fluorescente amarilla YFP (por sus siglas en inglés yellow fluorescent protein), de tal manera que, al llevar a cabo la recombinación GatewayTM con los vectores de entrada que poseen el gen de interés, la secuencia del gen de interés queda fusionada a la secuencia de la región N-terminal o la C-terminal, según la recombinación llevada a cabo. Por lo tanto, al expresarse el gen, la proteína de interés estará fusionada a una de las regiones de la proteína YFP. Estos vectores BifC poseen además, el promotor de expresión constitutiva en plantas CaMV 35S y la secuencia que codifica para el gen *KanR*, el cual otorga resistencia al antibiótico Kanamicina en bacterias.

Para obtener los vectores BifC de esta tesis, y comprobar la interacción entre la proteína DcPAR1 con un factor de transcripción tipo PIF, se llevó a cabo una recombinación GatewayTM utilizando el Kit GatewayTM LR ClonaseTM II Enzyme mix (Thermo Fisher scientific), según las indicaciones del fabricante, entre los vectores de entrada PCR8:*DcPar1* y los vectores de destinación pYFC43 (vector con C-terminal de YFP) y pYFN43 (vector con N-terminal de YFP). Producto de la recombinación, se generaron los vectores BifC pYFN:DcPar1 y pYFC:DcPar1. Luego, estos vectores fueron introducidos en células competentes de *E. coli* TOP10 y las bacterias crecidas

en medio LB sólido toda la noche a 37°C, suplementado con el antibiótico de selección Kanamicina (100 mg/L). Se comprobó la presencia del vector de destinación en las bacterias crecidas mediante PCR de colonia, utilizando un partidor *Forward* que hibridaba en el promotor CaMV 35S y un partidor *Reverse* que hibridaba en el gen de interés (Tabla 2 sección Anexo).

En el caso de los vectores BifC que poseían la secuencia del factor de transcripción de *Arabidopsis thaliana*, PIF7, éstos fueron facilitados por el Dr. Jaume Martínez-García. Finalmente, los plásmidos fueron purificados e introducidos en *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101, tal como se describe en sección 2.4.3.

2.4.8. Interacción proteína-proteína mediante ensayo BifC

Para determinar la interacción entre proteínas de interés mediante BifC, las colonias de *A. tumefaciens* GV3101 positivas para la presencia de los vectores BifC que poseen los distintos genes de interés fueron crecidas en medio LB líquido suplementado con Kanamicina 100 mg/L, durante toda la noche y hasta alcanzar una OD₆₀₀ entre 0,4-0,6. Estas bacterias fueron centrifugadas a 2000g durante 15 minutos y el pellet bacteriano fue resuspendido en 30 mL de medio de cultivo MS líquido (medio de cultivo MS sin agar-agar). Luego, se hicieron mezclas de los cultivos MS líquidos de *Agrobacterium tumefaciens* que poseían los vectores BifC que se querían ensayar en volúmenes equivalentes. Por ejemplo, se mezclaron 100 mL del cultivo de *A. tumefaciens* transformadas con pYFN:DcPar1 con 100 mL del cultivo de *A. tumefaciens* transformadas con pYFC:AtPif7, y así mismo con todas las combinaciones deseadas. Las combinaciones realizadas en esta tesis se detallan en la Tabla 5 sección Anexo. Las mezclas de cultivos de *A. tumefaciens* se utilizaron para agroinfiltrar hojas de

plantas de *Nicotiana benthamiana*. Se tomaron entre 5 a 10 mL del cultivo y se inyectó en las hojas, por su lado axial, ejerciendo presión con una jeringa sin aguja. Por cada combinación de vectores, se utilizó una planta completa de aproximadamente 1 mes de edad (5 o más hojas). Luego de cuatro días post-agroinfiltración, se cortaron trozos de hojas de no más de 3 mm y se colocaron sobre un portaobjetos para ser observados bajo microscopia confocal (LEICA TCS SP5). Se hidrataron los trozos de hoja con agua destilada para evitar la deshidratación del tejido vegetal. La fluorescencia emitida por la proteína YFP fue detectada con una luz de excitación de longitud de onda 488 nm y con filtros para YFP a 520-560 nm. Las imágenes fueron obtenidas y procesadas con el software Leica LAS AF Lite. Estos ensayos fueron realizados en el laboratorio del Dr. Jaume Martinez-Garcia, del Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG), Barcelona, España, durante una pasantía de investigación (diciembre 2017-marzo 2018).

2.5. Determinación de la concentración y composición de carotenoides

2.5.1. Extracción de carotenoides a partir de raíz y hojas de zanahoria

Para la extracción de carotenoides se masaron entre 50 a 200 mg de raíz u hojas de zanahorias, tanto de plantas silvestres (WT) como de líneas transgénicas. El tejido colectado fue macerado en un mortero en presencia de N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. Luego, se agregaron 4 mL de una solución hexano:acetona:etanol (2:1:1) de manera de obtener una mezcla homogénea. Esta se traspasó a un tubo de 15 mL y se agitó vigorosamente durante 2 minutos. Transcurrido ese tiempo el tubo se incubó en hielo y oscuridad por otros 2 minutos. Luego, se centrifugó a 10000 rpm por 10 min a

4°C. Finalmente, los carotenoides se recuperaron de la fase superior, recolectándolos en tubos de 15 mL. Estos fueron secados mediante N₂ gaseoso durante 20-40 minutos a 4°C. Una vez secas, las muestras se resuspendieron en 600 µL a 1 mL de acetona. Todo el proceso de extracción de carotenoides fue realizado con la menor cantidad de luz posible y manteniendo las muestras siempre en hielo.

2.5.2. Cuantificación de carotenoides totales mediante espectrofotometría

Los pigmentos carotenoides obtenidos en la extracción (sección 2.5.1.) fueron resuspendidos en acetona y luego utilizados en una primera etapa para la determinación de carotenoides totales mediante medición en espectrofotómetro (JENWAY 6300). Se midió la absorbancia a distintas longitudes de onda: 474 nm (absorción de carotenoides principalmente), 645/662 nm (absorción de las clorofilas *a* y *b*, que es utilizada para determinar su contribución en la medición a 474 nm, tal como se ilustra en la Figura 5) y 520/750 nm (datos necesarios para determinar la turbidez de la muestra y por ende validar los datos obtenidos). Las expresiones utilizadas para determinar las concentraciones de carotenoides totales fueron descritas anteriormente por Lichtenthaler y Buschmann (2001). Todas las mediciones se realizaron en una cubeta de cuarzo y se procuró que los datos de absorbancia se mantuvieran en el rango lineal de 0,3 a 0,85. Para lograr esto se diluyó la muestra cuando fue necesario. Los datos obtenidos fueron expresados en mg/g de peso seco.

Con las mediciones de absorbancia, se determinó la concentración de clorofila *a* (*Ca*), clorofila *b* (*Cb*) y carotenoides totales (*Ct*) mediante las ecuaciones descritas por Lichtenthaler y Buschmann (2001), en donde la concentración de los pigmentos queda expresada como µg/mL de extracto. Las ecuaciones son las siguientes:

$$C_a \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = 11,24 \times A_{662} - 2,04 \times A_{645}$$

$$C_b \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = 20,13 \times A_{645} - 4,19 \times A_{662}$$

$$C_t \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = \frac{1000 \times A_{470} - 1,9 \times C_a - 63,14 \times C_b}{214}$$

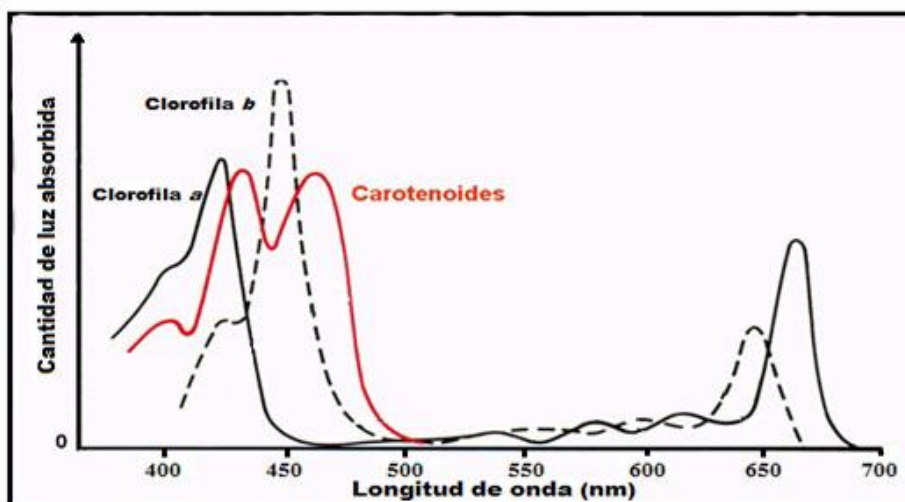


Figura 5: Espectro de absorción de los pigmentos clorofila a, b y carotenoides. En la figura se indican los espectros de absorción de los pigmentos cuantificados en este trabajo. Es posible visualizar que a una medición de absorbancia entre 450 y 474 nm aproximadamente, las clorofilas contribuyen significativamente a esta medición (especialmente clorofila b). Esta contribución a los carotenoides totales puede ser estimada midiendo la absorbancia de la muestra a 645 (clorofila a) y 662 (clorofila b) nm, longitudes a las cuales ningún carotenoide absorbe significativamente.

2.5.3. Determinación de la composición de carotenoides mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (HPLC)

Se utilizaron 20 μ L de los pigmentos resuspendidos en acetona obtenidos a partir de la extracción de carotenoides de zanahoria (sección 2.5.1.) para el análisis mediante

HPLC (Shimadzu HPLC LC-10AT) en fase reversa (RP-HPLC). Este análisis se realizó en una columna de fase reversa RP-18 Lichrocart 125-4 (Merck®) y se utilizó una fase móvil compuesta de acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5 v/v). Las condiciones cromatográficas consistieron en un flujo de 1,5 mL/min, a temperatura ambiente y bajo condiciones isocráticas y una duración de 30 min. Mediante el análisis de los cromatogramas obtenidos a una longitud de onda de 474 nm en el HPLC (determinación de los tiempos de retención, espectros de absorción y grado de pureza de los *peaks* obtenidos) y la concentración de pigmentos totales obtenida por espectrofotometría a 474 nm, se determinó la concentración de los principales compuestos carotenoides y clorofilas presentes en las muestras. Además, cada medición fue realizada utilizando tres replicas biológicas. De esta forma, la concentración de cada carotenoide se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$C_x = \frac{C_t \times A_x}{A_t}$$

En donde C_x corresponde a la concentración del pigmento; C_t corresponde a la concentración de carotenoides totales determinada mediante espectrofotometría; A_x corresponde al área bajo el *peak* del pigmento y A_t corresponde a la suma de las áreas de todos los carotenoides (Fuentes *et al.*, 2012).

2.6. Análisis bioinformático del transcriptoma *de novo* de raíz de zanahoria de semanas luz/oscuridad

Al inicio de esta tesis, se contaba con un transcriptoma *de novo* de *Daucus carota* variedad Nantesa, el cual consistió de 63124 contigs. Este transcriptoma se obtuvo al secuenciar los RNAs extraídos de raíces de zanahorias de 8 semanas crecidas en

condiciones de luz y oscuridad. Brevemente, plántulas de zanahoria de 8 semanas de crecimiento post-germinación, fueron crecidas con parte de su raíz expuesta a la luz (R/L) y el resto en la oscuridad (R/O). Estas plantas fueron crecidas en sustrato tipo vermiculita y en condiciones de invernadero (16h luz y 8h oscuridad). Tras las 8 semanas de crecimiento, se colectaron 3 grupos de plantas (aproximadamente 30 plantas cada grupo), con el objetivo de contar con 3 réplicas biológicas y obtener una concentración adecuada de RNA de cada una de las réplicas. Se extrajo el RNA a las 3 réplicas de forma independiente, separando las raíces crecidas en luz (R/L) de las crecidas en oscuridad (R/O). Es decir, se extrajeron 3 réplicas biológicas de RNA de cada condición. El RNA se aisló utilizando Trizol™ (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez determinada la buena calidad e integridad del RNA mediante geles de electroforesis en condiciones denaturantes, se procedió a depletar los RNA ribosómicos utilizando el kit RiboMinus™ Plant kit for RNA-Seq (Invitrogen™), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Las muestras finales de RNA se enviaron a la empresa OMICsSolutions, quienes construyeron la librería utilizando el kit IonXpress RNA (Thermo Fisher Scientific) y secuenciaron utilizando la plataforma Ion Torrent PGM (chip P1.1.17.).

La información generada tras la secuenciación fue procesada y el ensamble del transcriptoma *de novo* fue realizado con el software CLC Genomics Workbench 7.0.3. El transcriptoma ensamblado se consignó en un archivo Excel, en el cual se pueden visualizar las secuencias obtenidas (63124 contigs), su identificación (o anotación funcional), el número de reads de estas secuencias tanto en luz como en oscuridad, entre otra información relevante. Además, en este archivo hay disponible opciones de filtros que permiten al usuario obtener la información solicitada luego de colocar el filtro escogido. De este modo fue posible obtener, por ejemplo, las secuencias expresadas

en luz o en oscuridad, así como también aquellas secuencias diferencialmente expresadas entre ambas condiciones de crecimiento de la raíz (RNA-seq). Los análisis bioinformáticos y la búsqueda de genes diferencialmente expresados se realizaron utilizando este archivo.

2.6.1. Obtención de genes diferencialmente expresados (DEGs) entre la raíz de zanahoria de 8 semanas crecida en luz (R/L) y crecida en oscuridad (R/O)

Para la obtención de los DEGs entre la raíz de 8 semanas R/L y R/O, se utilizó el archivo Excel en el que se consignaron las secuencias contigs ensambladas luego de la secuenciación (sección 2.6.). En este archivo, se utilizaron los siguientes filtros:

- En primer lugar, se filtró por FDR (False Discovery Rate). Esta es una corrección que permite disminuir la aparición de falsos positivos en el análisis. Se utilizó un FDR menor a 0,05 (95% de confiabilidad).
- El segundo filtro fue, mostrar las secuencias que tuviesen un cambio en su expresión igual o superior a 2 veces (dos veces más expresados en luz respecto de oscuridad o dos veces más expresados en oscuridad respecto de luz).

De esta manera, y utilizando ambos filtros, se obtuvieron los genes diferencialmente expresados entre las dos condiciones de crecimiento de la raíz de zanahoria de 8 semanas.

2.6.2. Elección de genes para la validación del transcriptoma *de novo* mediante qRT-PCR

La validación del transcriptoma mediante qRT-PCR se realizó midiendo los niveles de

transcritos de genes que estuviesen más expresados en R/L y en R/O y de genes que no sufrieron cambios en sus niveles de transcritos en ninguna de las dos condiciones experimentales. Para la elección de los genes más expresados en R/L y en R/O, se utilizaron los mismos filtros de búsqueda detallados en la sección 2.6.1. ya que corresponden a genes diferencialmente expresados (DEGs). Para la búsqueda de genes sin cambios en su expresión entre R/L y R/O, dado que no son DEGs, no fue necesario utilizar filtros como el FDR que solo se ocupa en la búsqueda de genes diferencialmente expresados. En este caso, se buscaron genes que tuviesen entre 1-1,5 veces de cambio entre ambas condiciones de crecimiento, considerando que entre ese rango la diferencia de expresión es casi nula.

Una vez seleccionados los genes candidatos para la validación, se tomó en cuenta el número de *reads* o lecturas que tuvo cada uno en las distintas condiciones de crecimiento. Se consideró un mínimo de 8-10 reads para cada gen (Tabla 6 sección Anexo). Luego, y utilizando las secuencias contigs de cada gen seleccionado, se diseñaron partidores específicos “Reverse” y “Forward” para qRT-PCR, que finalmente fueron utilizados para realizar la validación. Las reacciones de qRT-PCR realizadas se llevaron a cabo tal como se describe en la sección 2.4.7.4. Las secuencias seleccionadas para la validación y los partidores utilizados para el qRT-PCR se señalan en la Tabla 6 y la Tabla 4 sección Anexo, respectivamente.

3. Resultados

3.1. Análisis *in silico* del transcriptoma *de novo* de *Daucus carota*: Identificación de genes diferencialmente expresados (DEGs) en la raíz de zanahoria crecida en oscuridad (R/O) versus la crecida en luz (R/L)

Previo al desarrollo de esta tesis nuestro grupo de investigación llevo a cabo una secuenciación de los transcritos de la raíz de zanahoria de 8 semanas crecida en oscuridad (R/O) y crecida en luz (R/L) (Transcriptoma R/O vs. R/L), esto con el objetivo de aportar nuevos antecedentes a los resultados obtenidos anteriormente (Fuentes et al., 2012). El transcriptoma resultante se compone de los perfiles de expresión que presenta la zanahoria de 8 semanas crecida en las condiciones experimentales que se desean evaluar (raíz crecida en oscuridad y en luz).

Para realizar los análisis de expresión diferencial entre ambas condiciones de crecimiento (RNA-Seq), se consideraron veces de cambio (*fold of change*) de dos veces (2X) como mínimo y un FDR (*False Discovery Rate*) menor a 0,05. En base a estos criterios, se obtuvieron 15427 genes que se expresaban más en la condición de crecimiento oscuridad (R/O) respecto a la condición de crecimiento en luz (R/L) y 3022 genes que se expresaban más en R/L respecto de R/O . En la Tabla 1 se resumen los filtros utilizados en el análisis y los resultados en cuanto al número de genes más expresados en una condición de crecimiento respecto de la otra. Dado que en el experimento realizado para generar el transcriptoma *de novo* la condición control es R/O (ya que es la condición de crecimiento normal de la raíz de zanahoria), ambas condiciones experimentales son contrastables entre si e interdependientes. Por lo tanto, cuando un gen determinado se expresa más en R/O, está menos expresado en R/L y viceversa.

Tabla 1. Filtros (FDR y veces de cambio) utilizados para el análisis RNA-Seq del transcriptoma de zanahoria crecida en condiciones R/O y R/L y cantidad de genes más expresados y menos expresados en ambas condiciones. R/O: raíz de zanahoria de 8 semanas crecida en oscuridad, R/L: raíz de zanahoria de 8 semanas crecida en luz, FDR: *false discovery rate*.

Filtros para RNA-Seq	Genes más expresados		Genes menos expresados	
	R/O	R/L	R/O	R/L
FDR < 0,05	15427 genes	3022 genes	3022 genes	15427 genes
Veces de cambio >2X	(contigs)	(contigs)	(contigs)	(contigs)

Posterior a la aplicación de los filtros antes mencionados, el RNA-Seq entregó una gran cantidad de información respecto de los perfiles de expresión que se manifestaron en las condiciones en que se llevó a cabo el experimento. A partir de estos análisis, y como se mencionó anteriormente, se determinó el número de genes que se expresaban más en R/O y en R/L, así como también los genes cuya expresión no cambió en las condiciones experimentales. Para validar estos resultados obtenidos de un análisis *in silico*, fue necesario realizar una validación *in vivo* mediante el análisis de los niveles relativos de transcritos de un número de entre 12 a 20 genes representativos (Ma et al., 2018), de tal manera de asegurar que la información resultante fuera un reflejo de lo que ocurrió en la planta y por tanto es información confiable y reproducible. Para ello, se realizó la búsqueda manual de 20 genes diferencialmente expresados (a partir de ahora denominados DEGs) y de genes que no cambian su expresión entre ambas condiciones experimentales, para luego cuantificar los niveles relativos de sus transcritos (o expresión relativa) mediante qRT-PCR

(sección 3.2.). En la Tabla 2 se muestra la lista de los 20 genes que se escogieron para la validación.

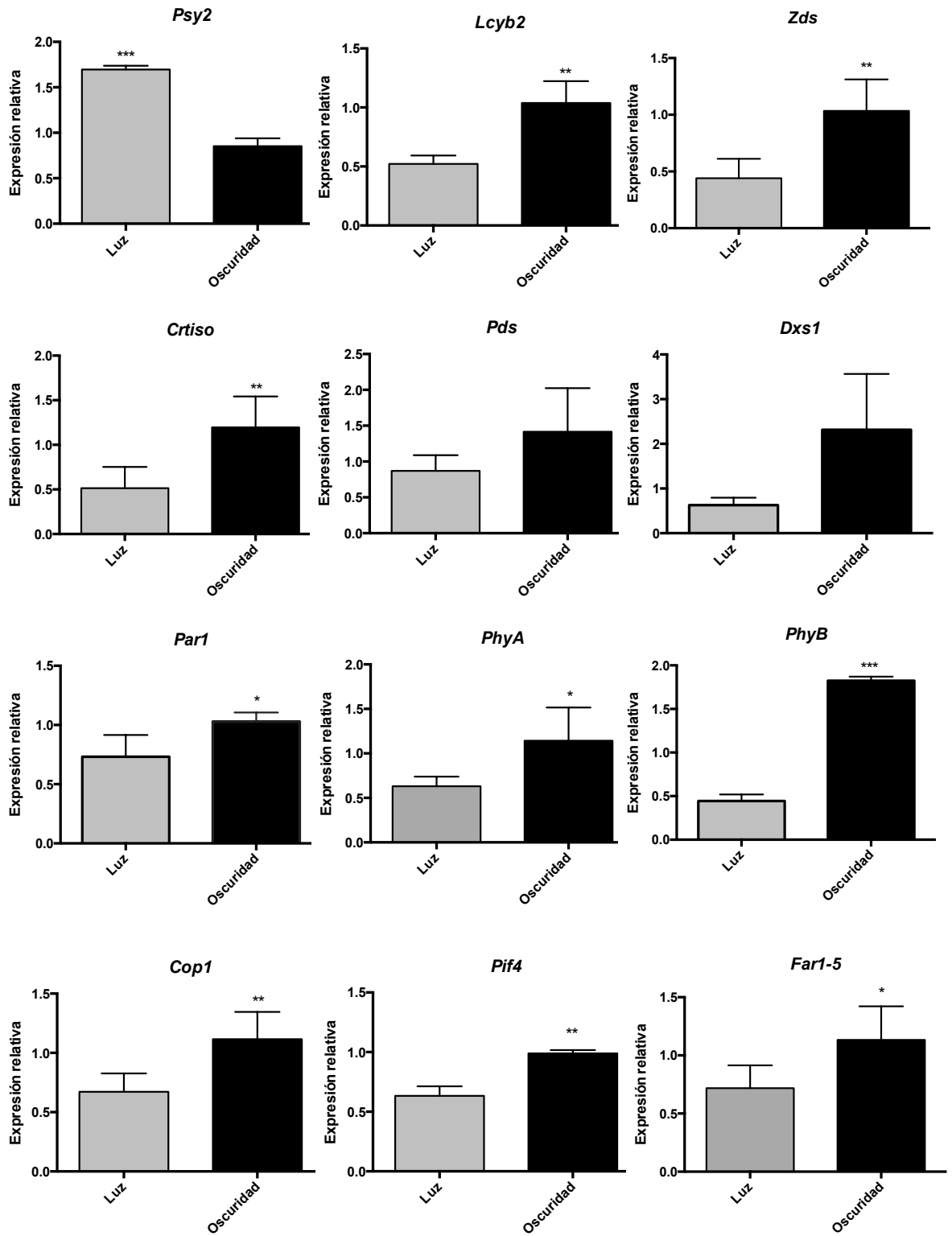
Tabla 2. Lista de genes escogidos para la validación de los resultados predichos por el RNA-Seq. Se muestra su nombre e identificación (contig ID) y veces de cambio en su expresión

Genes más expresados en oscuridad (R/O)	
Gen (contig ID)	Veces de cambio (R/O respecto de R/L)
<i>Pa1p</i> (contig 10351)	2863
<i>PhyA</i> (contig 7257)	1135
<i>Alf1</i> (Alfin 1) (contig 1983)	1022
<i>Arf 6</i> (contig 3577)	465
<i>Alf5</i> (Alfin 5) (contig 22603)	447
<i>Pds</i> (contig 6437)	328
<i>Zds</i> (contig 11017)	208
<i>Pif 4</i> (contig 3423)	103
<i>Par1</i> (contig 42760)	100
<i>Arc6</i> (contig 17614)	78
<i>Lcyb</i> (Contig 29892)	76
<i>Far1-5</i> (contig 28971)	67
<i>Cop1</i> (contig 1906)	51
<i>Dxs 1</i> (contig 457)	34
<i>PhyB</i> (contig 1318)	22
<i>Or</i> (contig 15664)	9
<i>Dag</i> (contig 12990)	6
Genes más expresados en luz (R/L)	
Gen (contig ID)	Veces de cambio (R/L respecto de R/O)
<i>Crtiso</i> (contig 33224)	11
<i>Psy2</i> (contig 3840)	3
Genes igualmente expresados en R/O y R/L	
Gen (contig ID)	Veces de cambio (R/O respecto de R/L)
<i>Mio1</i> (Miosina 1) (contig 5184)	1

3.2. Validación del ensamble bioinformático del transcriptoma *de novo* de *Daucus carota* y de los niveles relativos de transcritos (expresión relativa) de los genes diferencialmente expresados entre R/O y R/L

Para validar el ensamble y la tendencia de la expresión génica determinada por el análisis *in silico* (y por tanto la fidelidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos por medio del RNA-Seq), se determinó mediante qRT-PCR los niveles relativos de

transcritos (expresión relativa) *in vivo* de los 20 genes descritos en la Tabla 2 y establecer así una correlación entre los niveles de expresión predichas por el RNA-Seq y las determinadas por medio de los resultados del qRT-PCR. Para esto, se crecieron plantas de zanahoria en las mismas condiciones que se hizo para la secuenciación: dejando parte de la raíz de zanahoria en oscuridad y parte en luz, para luego de 8 semanas post-germinación, recolectar este tejido y realizar los análisis por qRT-PCR. Los resultados de expresión relativa determinados por qRT-PCR se muestran en la Figura 6. Se observa que de los 20 genes analizados, 17 muestran tener una expresión relativa que se correlaciona a la predicha por el RNA-Seq (y es estadísticamente significativa) (Tabla 2, Figura 6). En el caso de los genes *Pds* y *Dxs1*, si bien muestran una tendencia a expresarse más en la condición R/O respecto de la condición R/L, como se predice en el RNA-Seq, las diferencias no son estadísticamente significativas (Figura 6). En el caso del gen *Crtiso*, éste mostró estar significativamente más expresado en la condición R/O respecto de R/L, resultado opuesto al predicho por el análisis de RNA-Seq (Figura 6, Tabla 2). En el caso de los genes carotenogénicos como *Zds*, *Lcyb2* y *Psy2*, su expresión relativa medida por qRT-PCR muestra una correlación con la expresión predicha mediante RNA-Seq (Figura 6, Tabla 2). Así mismo ocurre con los genes *Mio1*, *Pa1p*, *Or*, *Par1*, *PhyA*, *PhyB*, *Pif4*, *Cop1*, *Far1-5*, *Dag*, *Arf6*, *Alf5*, *Alf1* y *Arc6* (Figura 6, Tabla 2). Si bien dentro del grupo de genes escogidos para la validación existen 3 cuya expresión relativa medida por qRT-PCR no coincide con la predicha por el RNA-Seq (es lo opuesto o no existen diferencias significativas entre las dos condiciones de crecimiento), el 85% de ellos presenta una correlación entre los niveles de expresión predichos por el RNA-Seq y los resultantes de qRT-PCR, lo que finalmente valida que la información entregada por el RNA-Seq es fidedigna.



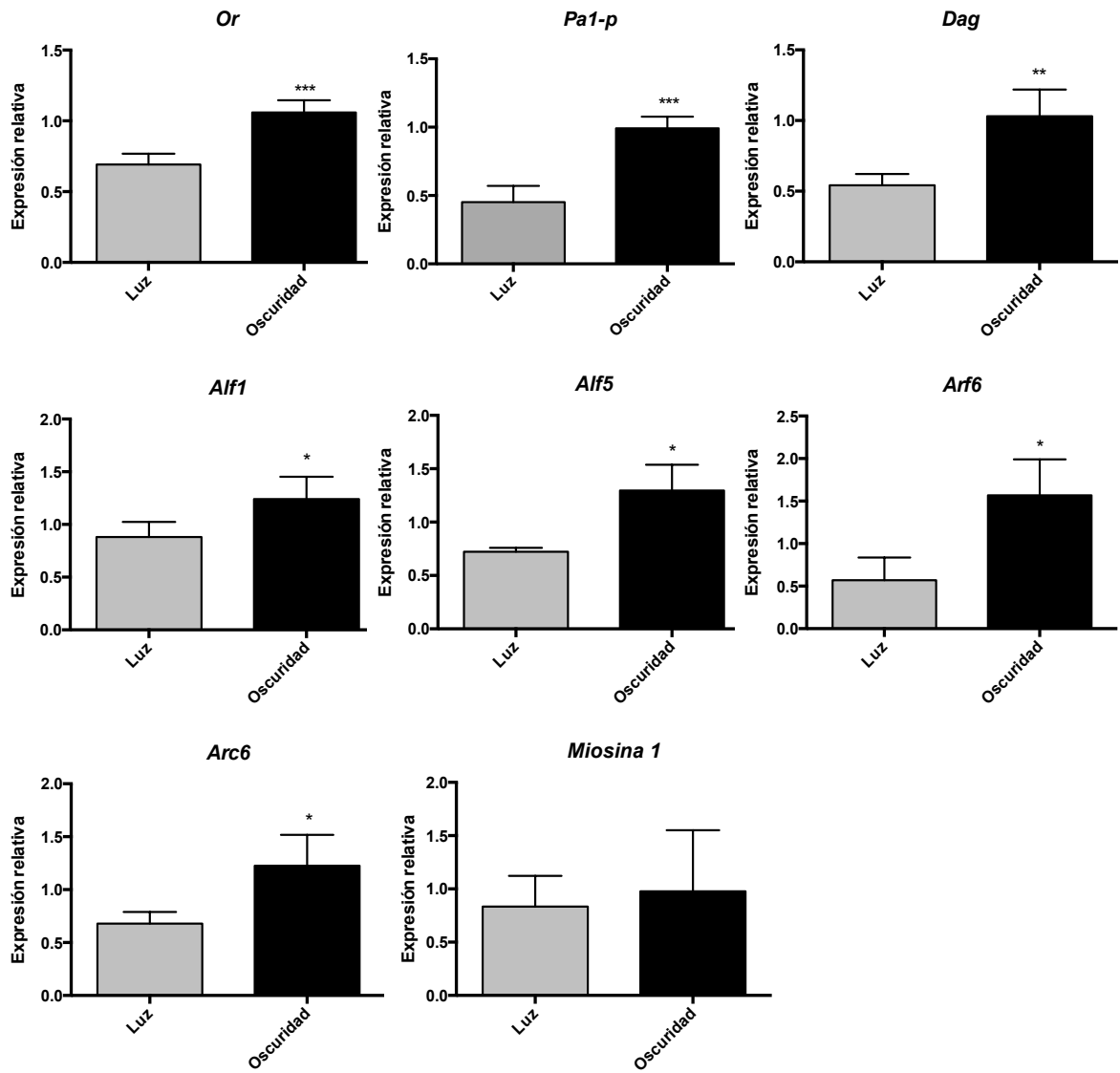


Figura 6. Niveles relativos de transcrito de genes escogidos para la validación de los DEGs obtenidos mediante el análisis de RNA-Seq. Los niveles de transcritos se normalizaron respecto a los niveles de transcritos del gen ubiquitina. Las diferencias significativas señaladas con asteriscos fueron calculadas mediante T-

3.3. Clasificación de DEGs y selección de un gen candidato para su caracterización funcional

Luego de la obtención de todos los genes más expresados en R/O respecto de R/L mediante el análisis RNA-Seq, se realizó una búsqueda manual de aquellos que pudiesen ser interesantes de caracterizar por estar posiblemente involucrados en la síntesis de carotenoides en oscuridad e inhibidos por luz. Para la selección de genes usamos los siguiente criterios: 1) un alto número de veces de cambio de R/O respecto R/L; 2) que los procesos en los que se han descrito que participan estos genes se vinculen, de alguna manera, con síntesis y/o acumulación de carotenoides, desarrollo de la planta y, por sobre todo, que sean regulados por luz. En las Tablas 3, 4, 5 y 6 se muestran algunos de los genes que presentaron las veces de cambio más elevadas de diferentes procesos metabólicos, teniendo en cuenta que todos estos se expresaron más en la raíz que creció en oscuridad (R/O) respecto de la que creció en luz (R/L). Estos genes además fueron agrupados en distintas categorías según la función ya descrita para ellos.

En la Tabla 3, se muestran los genes de la categoría “síntesis de carotenoides”. Como era lógico esperar, teniendo en cuenta que la raíz de zanahoria es un órgano que acumula grandes cantidades de carotenoides al crecer en oscuridad, se encontraron genes carotenogénicos más expresados en R/O respecto de R/L. En este grupo se encuentran, por un lado, aquellos genes que son responsables de la síntesis de los precursores de los carotenoides (*Dxr* y *Dxs*), y por otro genes que codifican algunas de las enzimas principales de la ruta de síntesis de estos pigmentos (*Lcy*, *Zds* y *Pds*) (Tabla 3). En el caso del gen que codifica para la enzima fitoeno sintasa (*Psy*, contig 3840), este mostró estar mayormente expresado en la raíz R/L, con casi tres veces

más expresión respecto de R/O. Lo mismo ocurre con el gen que codifica para la enzima CRTISO (*Crtiso*, contig 33224), el cual está casi diez veces más expresado en R/L respecto de R/O (Tabla 2).

Tabla 3. Genes más expresados en la condición de crecimiento R/O respecto de R/L, categoría “síntesis de carotenoides”. Los genes además son identificados con el número de contig asignado en el transcriptoma (contig ID) y las veces de cambio de R/O respecto de R/L

Síntesis de carotenoides	
Gen y contig ID	veces de cambio (R/O respecto de R/L)
<i>Pds</i> (contig 6437)	328
<i>Zds</i> (contig 11017)	208
<i>Lcyb2</i> (contig 29892)	76
<i>Dxs1</i> (contig 457)	34
<i>Dxr</i> (contig 8126)	14

Por otro lado, como ya se ha mencionado previamente en la introducción, la síntesis de carotenoides y su acumulación en la raíz de zanahoria, es un proceso que se lleva a cabo en conjunción al desarrollo de la planta y la raíz de reserva. Por tanto, era de esperar que genes involucrados en el crecimiento de la raíz de reserva y en la señalización por fitohormonas, se muestren más expresados en R/O respecto de R/L, teniendo en cuenta que R/O sigue su desarrollo normal y R/L no (Tabla 4). Estos últimos genes fueron clasificados en la categoría de “señalización por fitohormonas”, y entre ellos se encuentran más expresados en R/O genes como *Auxin response factor 6* (*Arf 6*, contig 3577) que corresponde a un gen inducido por la hormona auxina para así controlar distintos aspectos del desarrollo de una planta (Li et al. 2016).

Tabla 4. Genes más expresados en la condición de crecimiento R/O respecto de R/L, categoría “señalización por fitohormonas”. Los genes además son identificados con el número de contig asignado en el transcriptoma (contig ID) y las veces de cambio de R/O respecto de R/L

Señalización por Fitohormonas	
Gen y contig ID	Veces de cambio (R/O respecto de R/L)
<i>Aux1</i> (Auxin resistant 1) (contig 1281)	486
<i>Arf 6</i> (auxin response factor 6) (contig 3577)	466
Ethylene induced calmodulin binding protein (contig 5676)	315
<i>laa 8</i> (Indolacetic acid induced protein 8) (contig 59455)	176
<i>Saur-like</i> (contig 47130)	175
Brassinosteroid signalling positive regulator family protein (contig 35294)	121
Cytokinin oxidase 5 (contig 43733)	104
ABA responsive elements-binding factors 3 (contig 4978)	100
Jasmonate-zim-domain protein 4 (contig 18530)	90
ABA responsive elements-binding factors 2 (contig 16041)	79

También se encontraron un gran número de genes involucrados en distintos procesos biológicos y fisiológicos de las plantas. Estos genes se clasificaron en la categoría “procesos biológicos generales” y, en particular en este grupo, aparece aproximadamente 9 veces más expresado en R/O el gen *Or* (contig 15664) (Tabla 5). Este gen ha sido relacionado con el aumento en la acumulación de carotenoides en coliflor, papa dulce, maíz y *Arabidopsis* (Berman et al., 2017; Zhou et al., 2015; Ha Kim et al., 2013; Lu et al., 2006; Li et al., 2006; Li et al., 2001), participando como chaperona que estabiliza a la enzima PSY y en la diferenciación de plastidios a cromoplastos (Zhou et al., 2015) por lo que, al igual que los genes carotenogénicos, es esperado encontrarlo más expresado en la zanahoria R/O, ya que esta sección de la raíz sigue un patrón de síntesis y elevada acumulación de carotenoides en cromoplastos (Fuentes et al., 2012).

Tabla 5. Genes más expresados en la condición de crecimiento R/O respecto de R/L, categoría “procesos biológicos generales”. Los genes además son identificados con el número de contig asignado en el transcriptoma (contig ID) y las veces de cambio de R/O respecto de R/L

Procesos biológicos generales	
Gen y contig ID	Veces de cambio (R/O respecto de R/L)
<i>Pa1p</i> (contig 10351)	2863
<i>Pal2</i> (phenylalanine ammonia-lyasa2) (contig 2163)	394
Shoot gravitropism 2 (contig 2624)	325
<i>Arc6</i> (accumulation and replication of chloroplast) (contig 17614)	78
<i>Or</i> (contig 15664)	9
<i>Dag</i> (plastid development protein) (contig 12990)	6

Siguiendo con las condiciones previamente consideradas, buscamos genes regulados por procesos lumínicos. Sorprendentemente, en esta búsqueda aparecieron más expresados en R/O respecto a R/L, un grupo de genes que han sido descritos como elementos esenciales en rutas de señalización activadas por luz. Entre ellos, hay genes que codifican para proteínas involucradas en la captación de la luz en plantas (fotoreceptores), como los Fitocromos (*Phy*) (fitocromo A, contig 7257; fitocromo B, contig 1318) y Criptocromos (*Cry*) (criptocromo 2, contig 2372), los que se encuentran 1135 veces, 21,8 veces y 50,7 veces más expresados en R/O que en R/L, respectivamente. Además, se encuentran otros genes que codifican para proteínas involucradas en estas rutas de señalización por luz, como *Cop* (*Cop1*, contig 1906; *Cop9*, contig 43471) y *Fhy3* (contig 50091), y genes que han sido estudiados en *Arabidopsis* asociados al Síndrome de Huida de la Sombra (SAS por sus siglas en inglés) *Pif* (*Pif4*, Contig 3423) y *Par1* (contig 42760). Estos genes se clasificaron en la categoría “captación de luz y señalización por luz” (Tabla 6).

Tabla 6. Genes más expresados en la condición de crecimiento R/O respecto de R/L, categoría “captación de luz y señalización por luz”. Los genes además son identificados con el número de contig asignado en el transcriptoma (contig ID) y las veces de cambio de R/O respecto de R/L

Captación de luz y señalización por luz	
Gen y contig ID	Veces de cambio (R/O respecto de R/L)
<i>PhyA</i> (Phytochrome A) (Contig 7257)	1135
<i>Fhy3</i> (far-red elongated hypocotyls 3) (contig 50091)	680
<i>Pif 4</i> (Phytochrome-interacting factor 4)(Contig 3423)	103
<i>Par1</i> (Phy-rapidly regulated 1) (contig 42760)	100
<i>Cop 9</i> (contig 43471)	92
<i>Far1-5</i> (far1 related sequence 5) (contig 28971)	67
<i>Cop1</i> (contig 1906)	51
<i>Cry 2</i> (Cryptochrome 2) (Contig 2372)	51
<i>Phy B</i> (Phytochrome B) (contig 1318)	22

Normalmente factores involucrados en la percepción y señalización de luz en plantas como *Arabidopsis* son indispensables durante la de-etiolación y fotomorfogénesis donde, entre otros procesos, se induce la síntesis de carotenoides en presencia de luz (sección 1.3.1.). Entonces, teniendo en cuenta que genes que codifican para proteínas involucradas en la percepción y señalización de luz están más expresados en una condición de crecimiento de oscuridad, nos surge la interrogante de si participarían en la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva de *Daucus carota*. Por lo tanto, este grupo de genes aparecen como buenos candidatos para ser estudiados en nuestro grupo de investigación. Particularmente en esta tesis, se escogió el gen *Par1* para ser caracterizado funcionalmente dado que recientemente el grupo de investigación del Dr. Jaume Martínez-García, colaboradores nuestros, vinculó a este gen con la síntesis de carotenoides en tejido fotosintético de *Arabidopsis* (Bou-Torrent et al., 2015). Por lo tanto, determinar su rol en la síntesis de carotenoides en la raíz de zanahoria nos permitiría ampliar el conocimiento respecto de la regulación de este proceso biológico

en *Daucus carota*. Así mismo, se consideraron buenos candidatos otros genes involucrados en la señalización por luz, como *PhyA* (phytochrome A), *Fhy3* (far-red elongated hypocotyls 3) y *Pif4* (phytochrome interacting factor 4), por lo que su caracterización funcional es parte de trabajos y proyectos paralelos a esta tesis.

3. 4. Transformación estable de *Daucus carota* variedad Nantesa con el gen *Par1* de *Arabidopsis thaliana*

Como una aproximación para determinar si el cofactor transcripcional PAR1 participa en la regulación de la síntesis y/o acumulación de carotenoides en la raíz de zanahoria que crece en oscuridad, se utilizó como estrategia la expresión del gen *AtPar1* en *Daucus carota*. El objetivo fue determinar los efectos de la expresión de un gen *Par1* funcional (Bou-Torrent et al., 2015) y analizar si era capaz de provocar un cambio en el contenido de carotenoides acumulados en la raíz de zanahoria crecida en oscuridad y en la expresión relativa de genes carotenogénicos claves y comparar los resultados con aquellos previamente reportados (Bou-Torrent et al., 2015).

La construcción 35S:AtPar1:GFP utilizada para realizar la transformación estable y expresión génica en plantas fue facilitada por nuestro colaborador el Dr. Jaume Martínez-García del Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG, Barcelona, España). Esta actividad se realizó de forma paralela al análisis *in silico* y clonación del gen endógeno de zanahoria, *DcPar1*.

3. 4. 1. Expresión del gen de Arabidopsis *AtPar1* en *Daucus carota*

La expresión del gen *AtPar1* se realizó mediante la transformación de zanahorias variedad Nantesa (naranja), mediada por infección de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 que transportaba el vector con la construcción 35S:*AtPar1*:GFP (sección 2.3.6.2). Los explantes que fueron infectados, se cultivaron *in vitro* hasta la obtención de plantas transgénicas (9-10 meses aproximadamente) (sección 2.3.6.1.).

En cuanto al cultivo *in vitro*, durante la inducción de embriones a partir de los explantes infectados, se pudo observar el desarrollo de embriones anaranjados, dando cuenta de la acumulación de carotenoides en ellos (Figura 7A). Esto no se observó en embriones en la misma etapa de desarrollo en el cultivo control (embriones silvestres), lo que apoya la hipótesis de la acumulación de carotenoides en embriones transformantes *AtPar1* (Figura 7A). Por otro lado, al avanzar el desarrollo del cultivo *in vitro*, no se advirtieron diferencias fenotípicas evidentes entre las plántulas transformantes y las silvestres. En total, a partir del cultivo *in vitro* se obtuvieron 6 plantas transformantes para *AtPar1*, 5 de ellas transgénicas, de las cuales sobrevivieron 4. Todas las plantas analizadas fueron positivas para la presencia del transgen (Figura 7B).

En cuanto a las plantas adultas transgénicas, algunas de las líneas (OE5 y OE6) presentaron tallos mucho más alargados que las plantas silvestres, y las hojas eran de un color verde más claro (Figura 7C). Las líneas OE1 y OE2 no tuvieron diferencias fenotípicas evidentes respecto de las plantas silvestres.

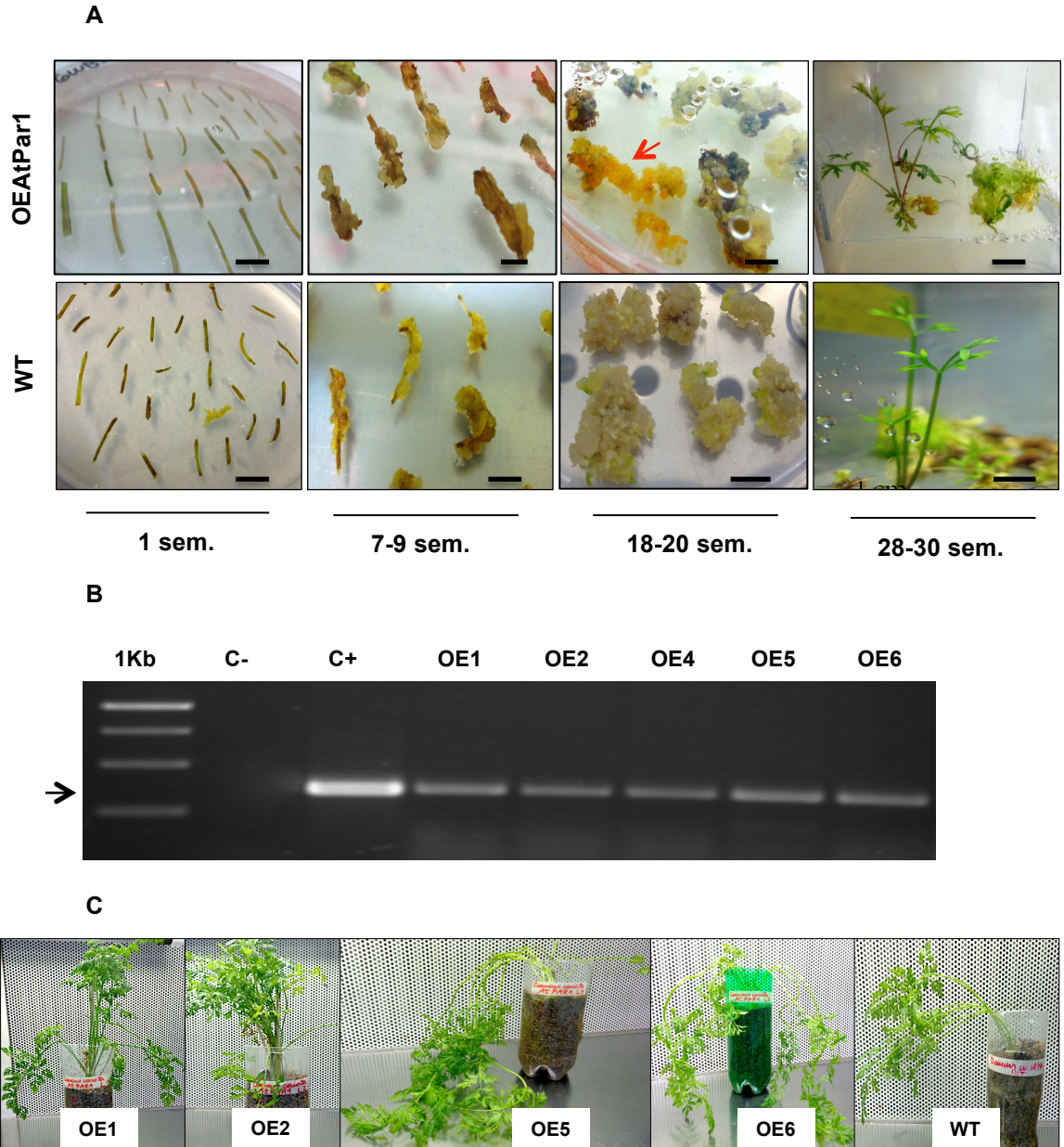


Figura 7. Obtención de plantas de zanahoria transgénicas para el gen *AtPar1* A) Cultivo *in vitro* de plantas transformantes en medio de inducción de embriones y en presencia de agente de selección. La flecha roja indica los embriones anaranjados obtenidos entre las semanas 18-20. Bajo cada panel se indican las semanas (sem.) de desarrollo post-transformación. Barras negras equivalen a 1cm. B) PCR para determinar la presencia del transgen *AtPar1* en líneas de plantas adultas transformantes. C) Plantas transgénicas adultas. OE1, OE2, OE5 y OE6 corresponden a plantas transgénicas positivas por PCR; WT planta silvestre; C+ plásmido pBF21:AtPAR1; C- reacción sin templado; 1kb marcador de peso molecular. La flecha indica el amplicón esperado de 356pb.

3.4.2. Perfil de expresión génica relativa de plantas transgénicas de *Daucus carota* transformadas con el gen *AtPar1*

A las cuatro líneas transgénicas obtenidas se les cuantificó la abundancia relativa del transcrito del transgen (expresión relativa). Como se muestra en la Figura 8, en todas las líneas hay expresión relativa del transgen. Cabe destacar que las líneas OE1 y OE2 presentan una mayor expresión relativa de *AtPar1* que OE5 y OE6, diferencia que es estadísticamente significativa (Figura 8).

Para determinar el efecto a nivel transcripcional de la expresión del gen *AtPar1* sobre la expresión relativa de los genes endógenos *DcPar1*, *DcPsy1* y *DcPsy2*, se determinó la abundancia de los transcritos endógenos de estos genes. En las plantas transgénicas se observa que *DcPar1* presenta una disminución significativa en su expresión relativa en todas las líneas, excepto OE2, respecto de plantas silvestres, entre un 30% y un 70% menos expresión (Figura 8). Con relación a la expresión relativa de genes carotenogénicos claves en la ruta de síntesis de carotenoides, tanto OE1 como OE2 presentan mayores niveles de expresión relativa del gen *DcPsy1* (250% y 150% mayor expresión, respectivamente), mientras que la línea OE5 no presenta diferencias en su expresión relativa y la línea OE6 presenta una menor expresión relativa de este gen (Figura 8). En cuanto a la expresión relativa de *DcPsy2*, se observa que todas las líneas presentan una menor abundancia del transcrito con respecto a las plantas silvestres (entre un 20% y 70% menos expresión) (Figura 8).

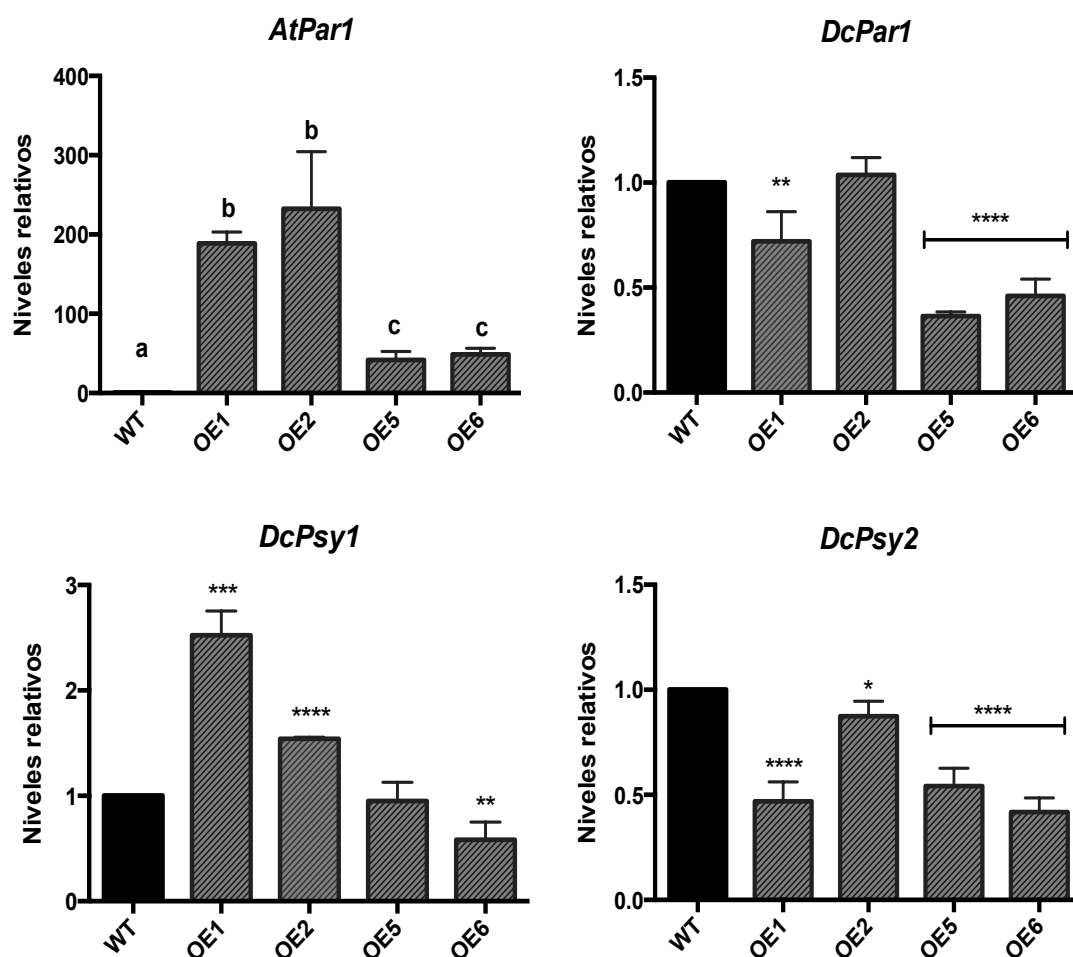


Figura 8. Niveles relativos de transcrito (en veces de cambio) de plantas transgénicas OEAtPar1. Los niveles de transcritos se calcularon relativos a los niveles de transcrito del gen normalizador ubiquitina. Los resultados para *DcPar1*, *DcPsy1* y *DcPsy2* se expresan en veces de cambio respecto a las plantas silvestres (WT). Los resultados para *AtPar1* corresponden a las diferencias significativas respecto de la expresión relativa entre las líneas transgénicas analizadas. Los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas y dos técnicas para cada línea. Las diferencias significativas señaladas con asteriscos o letras (a, b y c) se determinaron mediante un test ANOVA de una vía con un post test de Dunnet o de Tukey según correspondía al análisis.

3.4.3. Cuantificación de carotenoides en raíces de plantas transgénicas OEAtPar1

Se determinó el contenido de carotenoides de las raíces de las cuatro líneas transgénicas siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.5. Luego, se cuantificaron los carotenoides totales mediante espectrofotometría y se determinó el perfil carotenogénico mediante RP- HPLC (sección 2.5.2. y 2.5.3.).

Como se observa en la Figura 9A, los niveles de carotenoides totales en las líneas OE1 y OE2 son significativamente mayores respecto de plantas silvestres, llegando a poseer hasta un 250% (2,5 veces) más carotenoides, lo que equivale a 919,6 y 796,1 $\mu\text{g/gDW}$, respectivamente (Figura 9A). Esto no se observó en las líneas OE5 y OE6, las que no tienen niveles de carotenoides significativamente diferentes al de plantas silvestres (aproximadamente 300 $\mu\text{g/gDW}$) (Figura 9A). En cuanto a la composición de carotenoides, la línea OE1 es la única que presenta mayores niveles de α - caroteno, 230% (correspondiente a 305, 4 $\mu\text{g/gDW}$), mientras que el resto de las líneas no presenta diferencias significativas respecto de las plantas silvestres (Figura 9B). Tanto las líneas OE1 como OE2 presentan mayores niveles de β -caroteno en sus raíces respecto de plantas silvestres (230% y 240% más, respectivamente, lo que equivale a 570, 6 y 605 $\mu\text{g/gDW}$), el carotenoide más abundante en raíces de zanahorias (Figura 9B). Es interesante destacar que las líneas que poseen un aumento significativo de carotenoides son aquellas (OE1 y OE2) que presentan mayor nivel de expresión relativa del transgen (Figura 8).

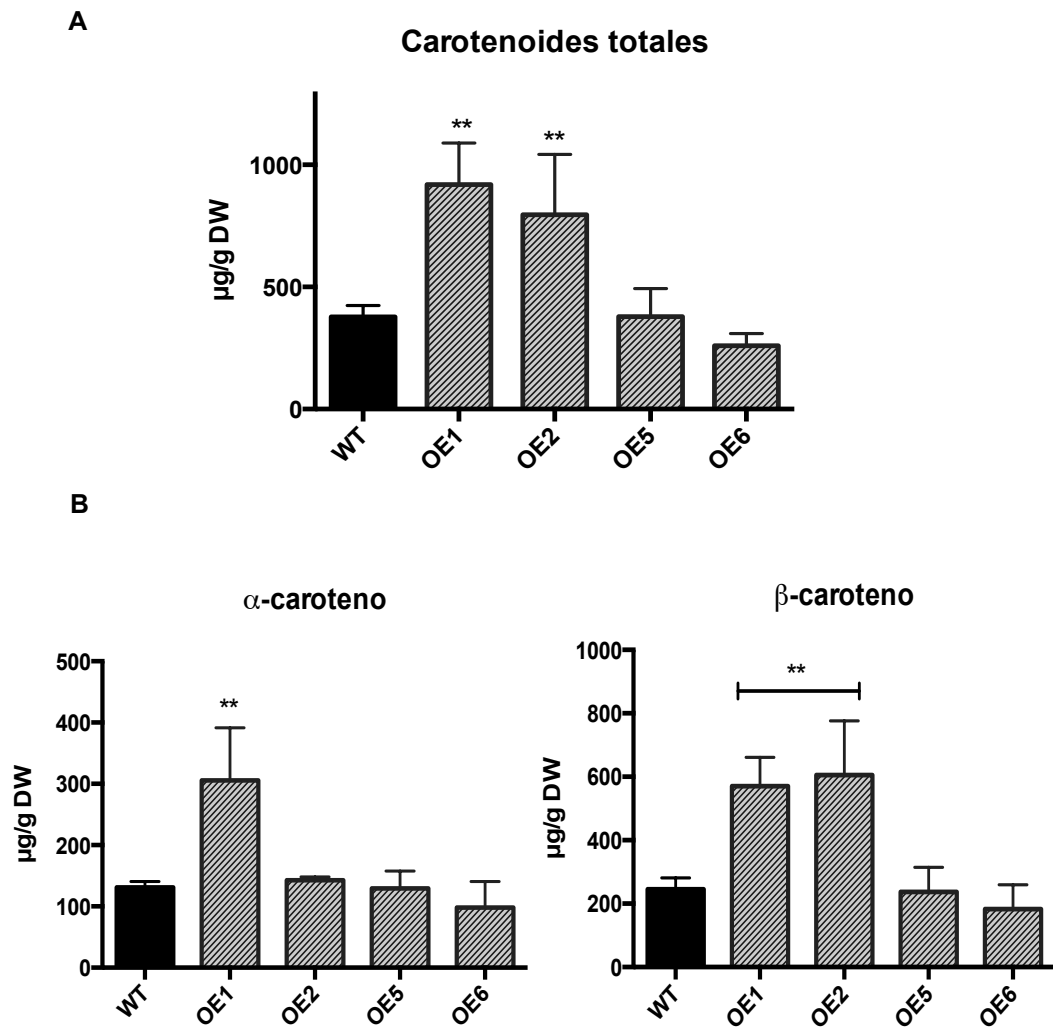


Figura 9. Contenido de carotenoides en raíces de plantas transgénicas OEAtPar1. A) Contenido total de carotenoides medidos a 474nm en espectrofotómetro. B) Composición de carotenoides (α - caroteno y β -caroteno) en las distintas líneas transgénicas analizadas (cuantificados por HPLC). Los contenidos de pigmentos se señalan en $\mu\text{g/gDW}$ (DW o peso seco). Las diferencias significativas, que se señalan con asteriscos, se determinaron con un test de ANOVA de una vía con un post-test de Dunnet.

3.5. Caracterización funcional del gen de *Daucus carota* *DcPar1*

3.5.1. Análisis nucleotídico de la secuencia del contig correspondiente al gen *DcPar1*

En los análisis *in silico* del transcriptoma *de novo*, se logró identificar dentro de los genes diferencialmente expresados en R/O, el contig 42760 que presentaba la anotación funcional correspondiente al gen *Par1* (*Phytochrome-rapidly regulated 1*; Tabla 6). Al no contar con un genoma de referencia en el momento en que se realizó la búsqueda de DEGs, para comparar las secuencias del contig y comprobar que efectivamente correspondía al gen predicho por el transcriptoma *de novo*, se realizaron constantes BLAST contra todas las secuencias de plantas existentes en la plataforma NCBI. Los resultados arrojaban que este contig poseía un alto porcentaje de identidad (sobre el 50%) con genes *Par1* de otras especies, resultado que respaldaba la confiabilidad de la predicción hecha por el transcriptoma *de novo*. Sin embargo, a partir de la publicación del genoma de zanahoria (Iorizzo et al. 2016), se comenzaron a depositar en NCBI un mayor número de secuencias de *Daucus carota* (subespecie *sativus*), por lo que nuevos resultados de BLAST realizados para el contig, mostraban un alto porcentaje de identidad tanto con secuencias anotadas como con secuencias no caracterizadas (sin anotación) de *Daucus carota* subespecie *sativus*.

El contig 42760, anotado como *Phytochrome-rapidly regulated 1* en el transcriptoma *de novo*, es una secuencia de 292 pb y presenta un 98% de identidad con la secuencia correspondiente al gen *Transcription factor PAR1* de *Daucus carota* subesp. *sativus* (número referencia NCBI: XM_017390696.1) (Figura 10). Luego, al realizar BLAST de la secuencia del contig 42760 contra el genoma de *Daucus carota* publicado y

depositado en la plataforma Phytozome se obtuvo un alto porcentaje de identidad con la secuencia denominada DCAR_013315, la cual no posee una anotación funcional. El alineamiento entre la secuencia arrojada por NCBI (XM_017390696.1) y la secuencia DCAR_013315 muestra una identidad del 100% (Anexo), corroborando que son la misma secuencia y que nuestro contig y DCAR_013315 corresponde al gen *Par1* de zanahoria.

```

DcPar1      ATGAAAAACATAACCACCGGAATGGCCAATGCCAAGCCCTTGAGCCACTCCTCATCTCTA
Contig42760 -----

DcPar1      GCCACCAAGGCATTAATGCCCCCTGCCACATCACTCTCAAGAGAAAAAGAGATGTGGGC
Contig42760 -----

DcPar1      TTAGCTGACAACACTGGAGCTGATGAGGATGAGGATGATGAAGAGGAGTGTAAGAAGAG
Contig42760 -----

DcPar1      GTGGAGAAGAAGATAGTTGAGCTGCAGAAGATAGTGCCAGGGGGAGAGTCACTTGAGAAT
Contig42760 -----CAGAAGATAGTCCAGGAGGAGAGTCACTGGAGAAT
                    *****  *****  *****  *****

DcPar1      GTAGACAATCTTTTTGAAGAAACAGCTGGCTACATTTTGGACTTGCAGAACCAAATCAAA
Contig42760 GTAGACAATCTTTTTGAAGAAACAGCTGGCTACATTTTGGACTTGCAGAACCAAATCAAA
                    *****

DcPar1      GGTCTCAGAGTCTTGCTTCTTTTTTCAATTACTTGACAAGCAAAAATCTAAGCTTGGA
Contig42760 GGTCTCAGAGTCTTGCTTCTTTTTT-CAATTACTTGACAAGCAAAAATCTAAGCTTGGA
                    *****

DcPar1      GGCTGA-----
Contig42760 GGCTGACAATCTCTGATTCAACACCACATATTTCTCTTATTTAAATATAATTAATTAC
                    *****

DcPar1      -----
Contig42760 ATTCCTTTTCACAGCTTTTCTCTATCTCTTTCTTTGCCTGTCTAGCTAGCTTAGCATGC

DcPar1      -----
Contig42760 TCAACAAGATCTAGATT

```

Figura 10. Alineamiento de secuencias nucleotídicas correspondiente al contig 42760 y la secuencia de *DcPar1* depositada en NCBI (XM_017390696.1). Los alineamientos fueron realizados utilizando la herramienta bioinformática *on line* Clustal Omega. Los asteriscos y las líneas indican coincidencia y ausencia de alineamiento respectivamente.

3.5.2. Análisis de identidad entre *DcPar1* y *AtPar1*

Una vez que se logró identificar la secuencia codificante o CDS del gen endógeno *Par1* (*DcPar1*) (sección 3.5.1.), se determinó la similitud existente entre las secuencias nucleotídicas de *DcPar1* y *AtPar1* y las secuencias aminoacídicas codificadas por estos genes. Para el alineamiento entre las secuencias nucleotídicas de las regiones codificantes (CDS) de ambos genes y la secuencia aminoacídica codificada por ellos, se utilizó la herramienta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). El algoritmo de esta herramienta, predijo la existencia de un 57,7 % de identidad nucleotídica entre ambas secuencias, un 44% de identidad aminoacídica y un 63% de similitud aminoacídica (Figura 11A). Por otro lado, y con el objetivo de averiguar si en la secuencia aminoacídica de DcPAR1 se reconocían dominios bHLH (básico hélice-loop-hélice), dominios presentes en la proteína AtPAR1 (Roig-Villanova et al., 2007), se realizó un análisis de búsqueda de dominios conservados utilizando las herramientas InterPro Scan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) y SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). En este último análisis, se predijo la existencia de un motivo tipo bHLH de longitud entre 43 (SMART, no incluye la secuencia básica solo el sub-dominio HLH) y 78 aminoácidos (InterproScan, incluye la secuencia completa bHLH entre los residuos 29 y 107) aproximadamente, los que se destacan en gris al igual que el dominio bHLH de la proteína PAR1 de Arabidopsis (Figura 11B). La presencia de este dominio es fundamental ya que es el responsable de que estos co-factores transcripcionales puedan unirse a otra proteína y de esta forma modular la transcripción de los genes (Roig-Villanova et al., 2007).

A

```

AtPar1      ATGGA-----AGAACTCTAGCCACTCCCGACGCCACGAGACGCTCTCTGTCCCG
DcPar1      ATGAAAAACATAACCACCGGAATGGCCAATGCCAAGCCCTTGAGCCACTCC-----
          *** *                               * **** * ** * ** * ** * ** *

AtPar1      TCATGCTCAGCCACCGTGAATCACGCGCCGC-----TGGTTTCGAGCGCAGAACC
DcPar1      TCATCTCTAGCCACCAAGGCATTAATGCCCCCTGCCACATCACTCTCAAGAGAAAAAGA
          ****      ***** * ** * ** *      * ** * ** * **

AtPar1      AAACGGAGATTGTCAGAGACTAACGCAAGCGTACGTGAAGACCAGAGAAGAAGCAGAAGAA
DcPar1      GATGTGGGCTTAGCTGACA--ACACTGGAGCTGATGAGGATGAGGATGATGAAGAGGAG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AtPar1      GAAGAAGATGAGGTCAAGGAAAAGATTGAGGCGTTGCAGAGGATTATCCCCGGAGGAGCG
DcPar1      TGTAAAGAAGAGGTGGAGAAGAAGATAGTTGAGCTGCAGAAGATAGTGCCAGGGGGAGAG
          **** ***** ** * ***** * * * ***** ** * ** * ** ***** *

AtPar1      GC---GCTTGGTGTGGACGCGCTCTTTCGAAGAGACAGCTGGTTACATTCTGTCTCTACAA
DcPar1      TCACTTGAGAATGTAGACAATCTTTTTGAAGAAACAGCTGGCTACATTTTGGACTTGCAG
          *              *** ** * ** * ***** ***** * ** * ** *

AtPar1      TGTCAGATCAAACCATTAAAGTCCTTACTTTCGTTTCTTCAACGCATAGATCAAGAAGAC
DcPar1      AACCAAATCAAAGGTCTCAGAGTTCTTGCCTTCTTTTTTCAATTACTTGACAAGCAAAAA
          ** ***** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * * *

AtPar1      ATGAAGTTCGGAGGTGA
DcPar1      TCTAAGCTTGGAGGCTGA
          *** * ***** **
  
```

B

```

ATPAR1      MEETLATPDATRRSLSPSCSATV---KSRAAGFERRTKRRLSETNASVREDREEAESEE
DCPAR1      MK-NITGGMANAKPLSHSSSLATKALMPPAHITLKRKRVDVGL-ADNTGADEDEDEEECK
          *: .:.* * . : ** *.* : .           :::. . * * :.. **.: ** :

ATPAR1      DEVKEKIEALQRIIPGGAAL-GVDALFEETAGYILSLQCIKTIKVLTSFLQRIDQEDMK
DCPAR1      EEVEKKIVELQKIVPGGESLENDNLFEEETAGYILDLOQIKGLRVLASFFQLD-KQKSK
          :*:.* **:*:* ** :* .** *****.* ** * :*:*:*: * :. . *

ATPAR1      FGG
DCPAR1      LGG
          :**
  
```

Figura 11. Alineamiento de secuencias AtPAR1 y DcPAR1. A) Alineamiento nucleotídico de los CDS de los genes *DcPar1* y *AtPar1*. B) Alineamiento aminoácido de las proteínas PAR1 de *Arabidopsis thaliana* y *Daucus carota*. En gris, se indican los dominios bHLH predichos para AtPAR1 (Roig-Villanova et al., 2007) y DcPAR1 (InterPro, Protein sequence analysis & classification y SMART). Ambos alineamientos se realizaron con la herramienta bioinformática Clustal Omega.

Posteriormente, al comparar esta secuencia predicha con una secuencia consenso para bHLH de plantas, la secuencia bHLH de DcPAR1 muestra poseer los residuos conservados claves para la formación de dímeros (residuo 23 del dominio) y la estabilización de esta unión (residuos hidrofóbicos de la hélice 2), pero no los necesarios para la unión a DNA como se esperaba (residuos 5, 9 y 13 del dominio) (datos no mostrados) (Heim et al., 2003).

En la figura 12, se muestra el alineamiento de los dominios bHLH predichos para zanahoria (en esta tesis) y Arabidopsis (Roig-Villanova et al., 2007). En la región básica del dominio se observa que en la posición 5 hay un residuo de ácido aspártico tanto en AtPAR1 como en DcPAR1, en la posición 9 hay residuos de alanina (Arabidopsis) y ácido glutámico (zanahoria) y en la posición 13 ácido glutámico (Arabidopsis) y lisina (zanahoria) (Figura 12, residuos indicados con el símbolo diamante). Por otro lado, en la hélice 1 (Helix 1) del subdominio HLH, se conserva un residuo de leucina en la posición 23, el cual ha sido sindicado como fundamental en el proceso de dimerización de las proteínas que poseen dominios bHLH (Heim et al., 2003) (Figura 12, residuo destacado en negro e indicado con el símbolo diamante). En el caso de la región hélice 2 (Helix 2), en ambos dominios se observan residuos hidrofóbicos como por ejemplo, valina, alanina, leucina e isoleucina (Figura 12), algo común en los dominios bHLH de plantas (Heim et al., 2003). Estas características predichas para el dominio bHLH de DcPAR1, sugieren que podría ser una proteína con la capacidad de dimerizar con otras, y de esta manera cumplir roles regulatorios como lo hace AtPAR1.

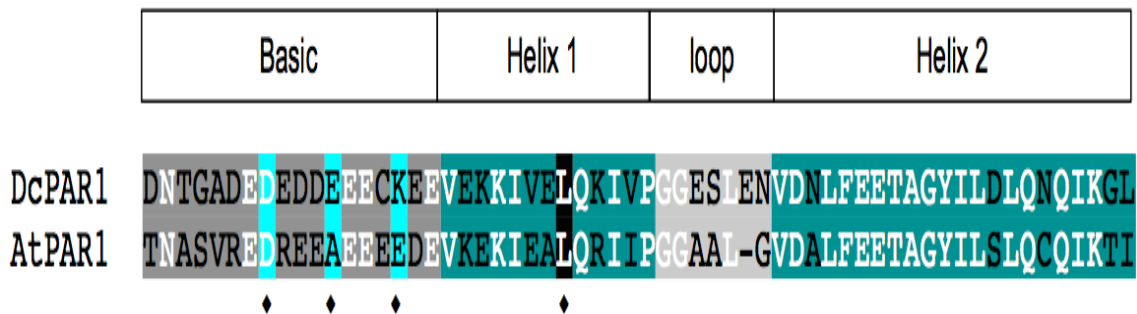


Figura 12. Alineamiento proteico de los dominios bHLH de AtPAR1 y DcPAR1. En colores se destacan los subdominios descritos para AtPAR1 (Roig-Villanova et al., 2007) y los predichos para DcPAR1 mediante InterPro Scan y SMART. En color gris oscuro se señala el subdominio básico, en verde las hélices alfa (Helix 1 y Helix 2) y en gris pálido el loop. En negro, y señalado con un símbolo diamante, se destaca el residuo conservado de Leucina 23. Los aminoácidos idénticos entre proteínas se señalan en color blanco. Las cajas superiores indican la extensión de los distintos subdominios en base a lo descrito en Heim et al., 2003 y Roig-Villanova et al., 2007.

3.5.3. Amplificación y clonamiento del gen *DcPar1*

Una vez identificado el gen *Par1* de zanahoria, se diseñaron partidores específicos para amplificar mediante RT-PCR toda la región codificante (CDS, 366 pb) desde el codón de inicio hasta el codón de término, o sin codón de término usando de referencia la secuencia depositada en la plataforma NCBI (XM_017390696.1) (Figura 13 A). El CDS de *DcPar1* es de 366 pb y sin intrones, características similares al CDS del gen *Par1* de Arabidopsis (Roig-Villanova et al., 2007).

El fragmento amplificado a partir de cDNA de raíz de zanahoria adulta fue clonado en el vector de entrada PCR8, el DNA plasmidial de los clones obtenidos fue digerido con la enzima de restricción BglI para determinar el sentido en que se clonó el CDS del gen y enviadas a secuenciar (Figura 13 B). Una vez verificada la correcta clonación del

CDS del gen mediante la secuenciación (carente de mutaciones que cambien el producto codificado por éste) se recombinó el vector de entrada PCR8 con el vector de destinación pGWB5. En este vector el gen en sentido sin condón de término queda fusionado en su extremo 3' al gen reportero *Gfp* (que codifica la proteína fluorescente verde GFP). Este vector se utilizó para su sobre-expresión en *Daucus carota*, mientras que el clonamiento en antisentido en pGWB5 fue usado para su silenciamiento post-transcripcional (SGPT). Finalmente, los vectores de destinación pGWB5 que contienen el gen de interés en sentido o en antisentido (pG5:DcPar1 y pG5:DcPar1AS, respectivamente), se usaron para transformar *Agrobacterium tumefaciens*. En la Figura 13C y 13D se muestran los análisis por PCR de colonias positivas de *Agrobacterium* para el vector en sentido (pG5:DcPar1) y en antisentido (pG5:DcPar1AS), respectivamente.

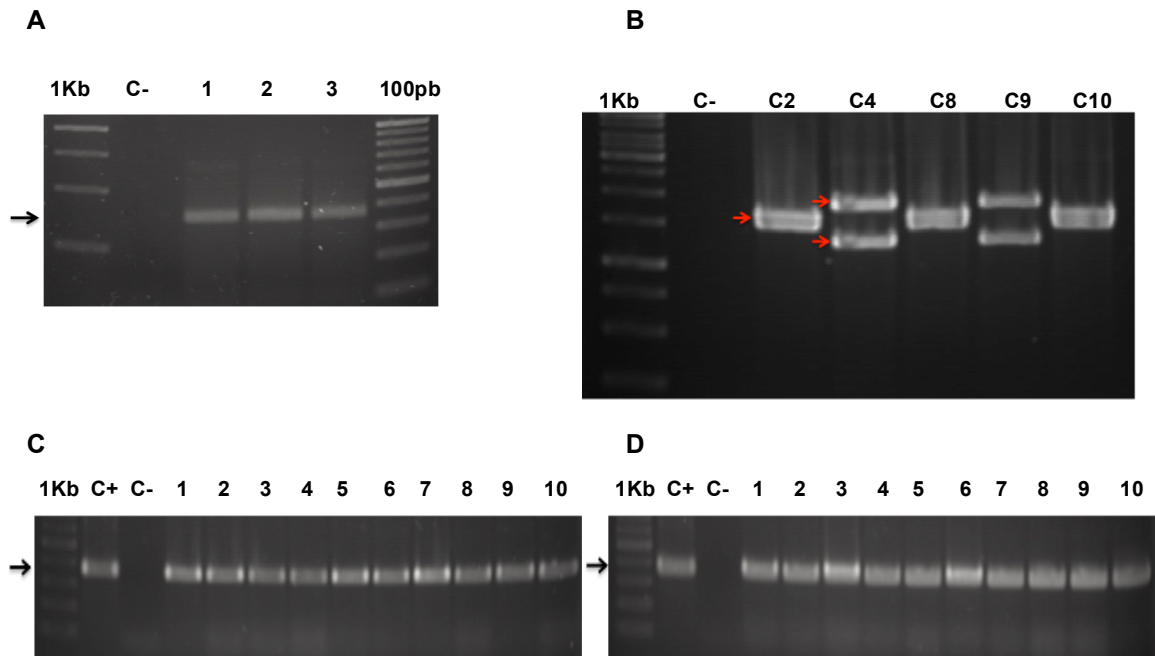


Figura 13. Clonación del gen *DcPar1*. A) Amplificación de la secuencia correspondiente al CDS de *DcPar1* desde codón de inicio sin codón de término mediante RT-PCR. 1-3 reacciones independientes de RT-PCR a partir de raíz de *D. carota* crecida en oscuridad. La flecha indica el tamaño esperado de 366pb B) Ensayo de digestión de plásmidos PCR8:*DcPar1* aislados de 5 colonias de *E. coli* (C2-C10). Estos fueron digeridos con la enzima BglI. Las flechas rojas indican el patrón de digestión esperado para el gen clonado en sentido (1 flecha, 1653 pb + 1530 pb) y en antisentido (2 flechas, 1888 pb + 1295 pb). Todas las colonias fueron secuenciadas, y las colonias C9 (antisentido) y C10 (sentido) fueron utilizadas para los análisis posteriores. C) Amplificación del gen *DcPar1* a partir de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con la recombinación resultante entre el vector de entrada PCR8:*DcPar1* (inserto en sentido) y el vector de destinación PGWB5. 1-10 colonias analizadas. D) Amplificación del gen *DcPar1* a partir de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con la recombinación resultante entre el vector de entrada PCR8:*DcPar1* (inserto en antisentido) y el vector de destinación PGWB5. 1-10 colonias analizadas. Las flechas indican tamaño de amplicón esperado de 366 pb. 1Kb y 100pb corresponden a estándares de peso molecular. C+ reacción de PCR que posee como templado el inserto. C- reacción de PCR sin templado o reacción de digestión enzimática sin plásmido.

3.5.4. Análisis de la unión directa entre el cofactor transcripcional DcPAR1 y un factor de transcripción del tipo PIF

Como una estrategia para caracterizar funcionalmente al gen *DcPar1* de zanahoria y de determinar su localización sub-celular, se llevó a cabo un ensayo BifC (sección 2.4.8.). Se ha descrito en la literatura, que la proteína PAR1 de *Arabidopsis thaliana* se une *in vivo* a proteínas del tipo PIF (Hao et al., 2012; Bou-Torrent et al., 2015). La proteína AtPAR1 modula la transcripción de genes ya que se une a los factores de transcripción PIF, permitiendo así la transcripción de algunos genes que se mantenían inhibidos por PIF, como por ejemplo *Psy* de *Arabidopsis* (Bou-Torrent et al., 2015). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se propuso determinar si la proteína DcPAR1 es capaz de actuar como co-factor transcripcional uniéndose *in vivo* a AtPIF7.

Para realizar el ensayo, se construyó un vector en el que se clonó el gen *DcPar1* fusionado a una región codificante para el N-terminal y el C-terminal de la proteína fluorescente YFP (sección 2.4.5.). Por otro lado, se contaba con el gen *AtPif7*, clonado en fusión a las regiones codificantes N-terminal y C-terminal de la misma proteína fluorescente YFP (construcciones facilitadas por el Dr. Jaume Martínez-García). Una vez que los vectores estuvieron insertos en *Agrobacterium*, se procedió a realizar el ensayo donde se co-agroinfiltraron los vectores C-YFP:PAR1 y N-YFP:PIF7 en hojas de *Nicotiana benthamiana* (sección 2.4.8.). Cabe aclarar que sólo habría fluorescencia de YFP al unirse *in vivo* PAR1 y PIF, dado que se re-establece la proteína YFP completa.

Como se puede ver en la Figura 14, se observa fluorescencia de YFP en los núcleos de las células co-agroinfiltradas con N-YFP:PIF7 y C-YFP:PAR1, demostrando de esta forma que ambas proteínas interactúan entre sí, además de que DcPAR1 posee

localización nuclear. Con menor intensidad se detecta fluorescencia en las interacciones N-YFP:PAR1 y C-YFP:PAR1, lo que nos indica que DcPAR1 puede homodimerizar, tal como se ha descrito para la proteína AtPAR1 (Bou-Torrent et al., 2015), y nuevamente confirma su localización sub-celular. Como control se muestra la homodimerización de PIF7 (co-agrofiltración de N-YFP:PIF7 y C-YFP:PIF7).

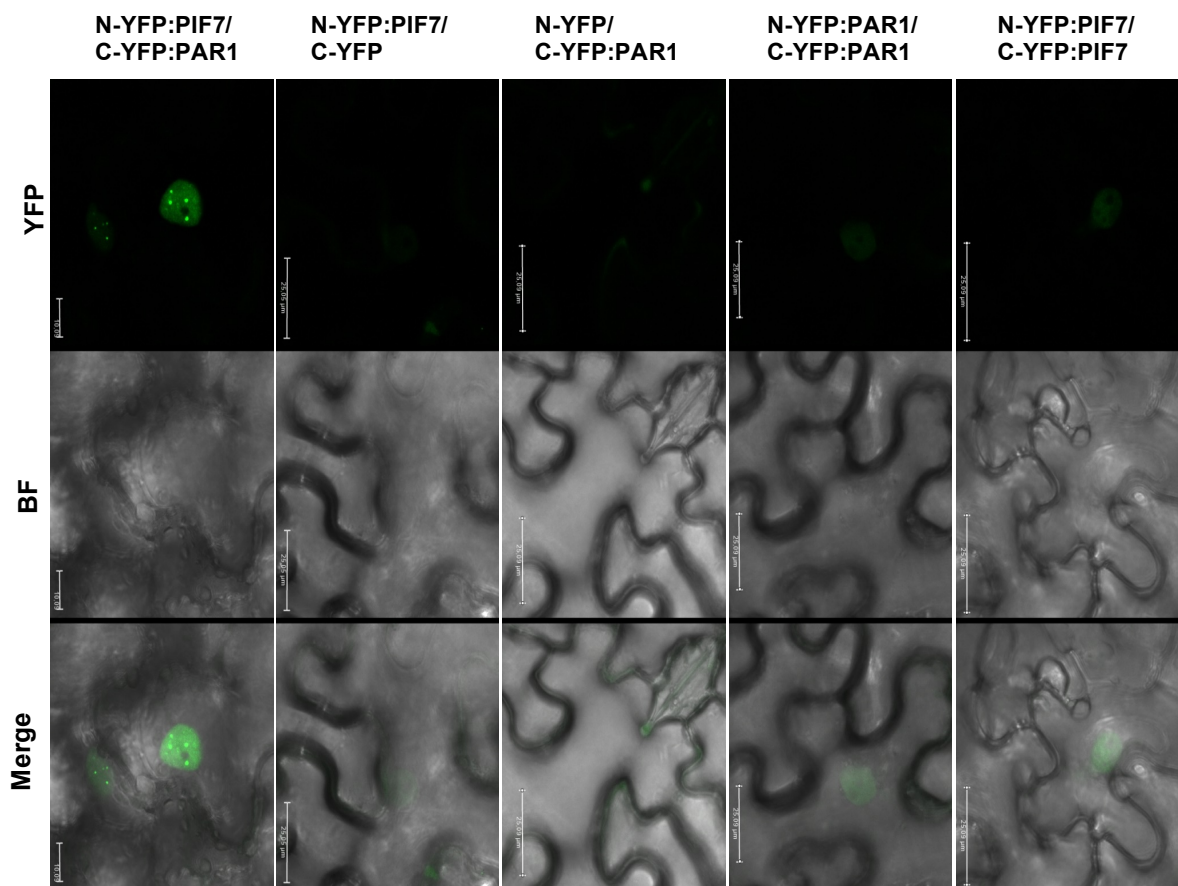


Figura 14. Unión *in vivo* de DcPAR1 a AtPIF7. En la parte superior de las imágenes se indican los vectores usados en la co-agroinfiltración mientras que en el costado izquierdo se indica el filtro utilizado para la observación bajo microscopía confocal. Con fluorescencia YFP se observan núcleos celulares mientras que en BF se observan las células. YFP (proteína fluorescente amarilla); BF (campo claro); Merge (sobreposición de YFP más campo claro).

3.5.5. Transformación estable de *Daucus carota* variedad Nantesa con el gen *DcPar1*

3.5.5.1. Sobreexpresión del gen *DcPar1*

Teniendo en cuenta que las proteínas AtPAR1 y DcPAR1 son muy similares en cuanto a su estructura aminoacídica, dominios bHLH y su capacidad de unión a factores de transcripción PIF, esperábamos que los resultados de la sobre-expresión del gen endógeno *DcPar1* fuesen similares a los obtenidos con la expresión del gen *AtPar1* en zanahoria .

Para lograr la sobre-expresión del gen *Par1* de *Daucus carota*, se recurrió a la transformación estable de explantes provenientes de hipocótilos y epicótilos de plantas de zanahorias mediante infección por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 que transportaba el vector de destinación pG5:DcPar1 con el gen clonado en sentido. Se transformaron explantes provenientes de la variedad Nantesa cuya raíz es de color naranja. Se infectaron explantes que luego fueron cultivados *in vitro* para promover la embriogénesis somática (sección 2.3.6.2.) con el objetivo de obtener plantas transgénicas. Este cultivo demoró entre 7-8 meses aproximadamente (30 semanas), hasta que se obtuvieron plántulas que se traspasaron a cultivo en tierra (Figura 15).

El desarrollo del cultivo *in vitro* de los explantes transformados se dio con normalidad, sin visualizarse diferencias fenotípicas en los embriones generados durante el proceso de cultivo respecto a los controles sin transformación (Figura 15). Esto difiere a lo observado durante la generación de embriones de zanahoria Nantesa transformados con el gen de *AtPar1*, los que fueron claramente anaranjados respecto de los embriones sin transformar (Figura 7A, sección 3.4.1.).

Finalmente, se obtuvieron 16 plantas variedad Nantesa transformantes para *DcPar1*, de las cuales sobrevivieron 6. Si bien estas plantas se obtuvieron luego de una extensa selección *in vitro* post- transformación, se determinó que ninguna de las plantas sobrevivientes era transgénica. Se realizaron análisis de la presencia del transgen mediante PCR convencional de su ADN genómico y su cDNA (amplificando desde el promotor 35S hasta el final del CDS en el caso del DNA genómico y amplificando el gen reportero *Gfp* en el caso de cDNA y DNA genómico) y no se logró detectar el amplicón esperado. Como última alternativa, y considerando que el PCR convencional puede fallar en algunos casos, se midieron los niveles de expresión relativa mediante qRTPCR del transgen reportero *Gfp*, no obteniéndose amplificación de este. Por lo tanto, las plantas obtenidas no eran transgénicas.

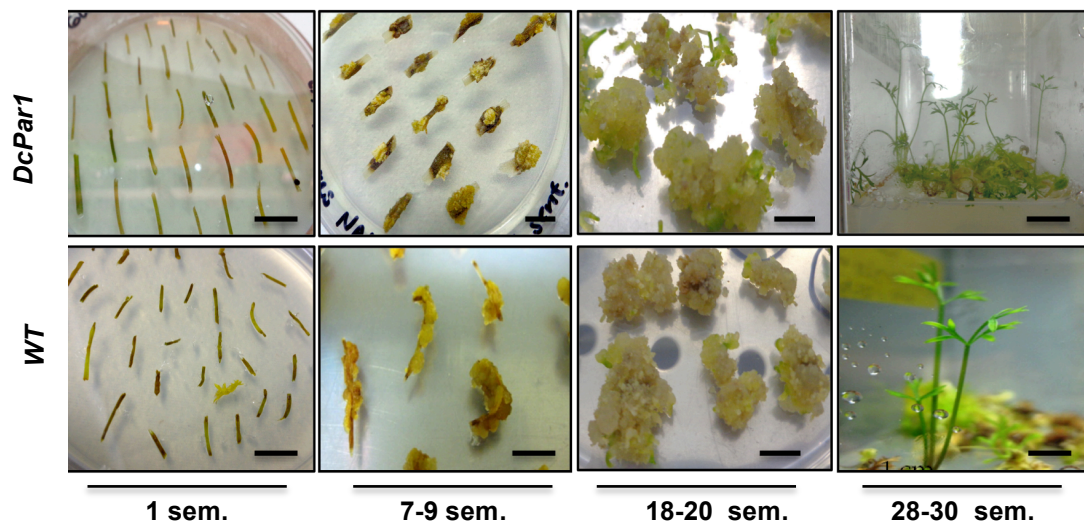


Figura 15. Cultivo *in vitro* y transformación de *Daucus carota* variedad Nantesa. Cultivo de plantas transformadas con el vector pG5:DcPar1 para la sobre-expresión del gen *DcPar1*. Bajo cada panel se indican las semanas de desarrollo post-transformación (sem.). Entre las 7-9 semanas se observa la aparición de los primeros embriones a partir de los explantes transformados. Entre las semanas 18-20, se observa un mayor número de embriones, con aspecto grumoso y de color amarillo pálido. Estos embriones darán origen a las plantas que pueden observarse a partir de la semana 28 aproximadamente. La barra de color negro en cada fotografía equivale a 1 cm aproximadamente.

3.5.5.2. Silenciamiento del gen *DcPar1*

Otra estrategia para evaluar la función de genes es mediante la reducción de su expresión usando silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT). Para lograr el silenciamiento del gen *Par1* de *Daucus carota*, se clonó su CDS en antisentido en el vector pGWB5 (sección 2.4.6.), obteniéndose el vector de destinación pG5:DcPar1AS, con el cual se transformó explantes de zanahoria tal como se describió previamente (sección 3.5.4.1).

El desarrollo del cultivo *in vitro* se llevó a cabo con normalidad formándose un máximo de embriones entre las 18-20 semanas y plantas completas hacia la semana 30, tal como ocurre con el cultivo *in vitro* de plantas silvestres. No se apreciaron cambios fenotípicos evidentes en los embriones desarrollados respecto de los embriones silvestres durante el proceso de cultivo o incluso en las plántulas traspasadas a cultivo en tierra (Figura 16A). De las más de 12 plantas que alcanzaron el cultivo en tierra, 11 lograron sobrevivir. De éstas, 10 muestran la presencia del gen *DcPar1* en antisentido, corroborado mediante un PCR convencional (Figura 16B).

Del total de líneas transgénicas se seleccionaron las líneas AS1, AS5, AS6 y AS10 para los siguientes ensayos moleculares y funcionales. Las líneas transgénicas seleccionadas mostraron una disminución significativa en los niveles de expresión relativa del gen *DcPar1* respecto de plantas silvestres, obteniéndose niveles de silenciamiento génico de hasta un 95% (hasta 40 veces menos expresión aproximadamente) (Figura 16C).

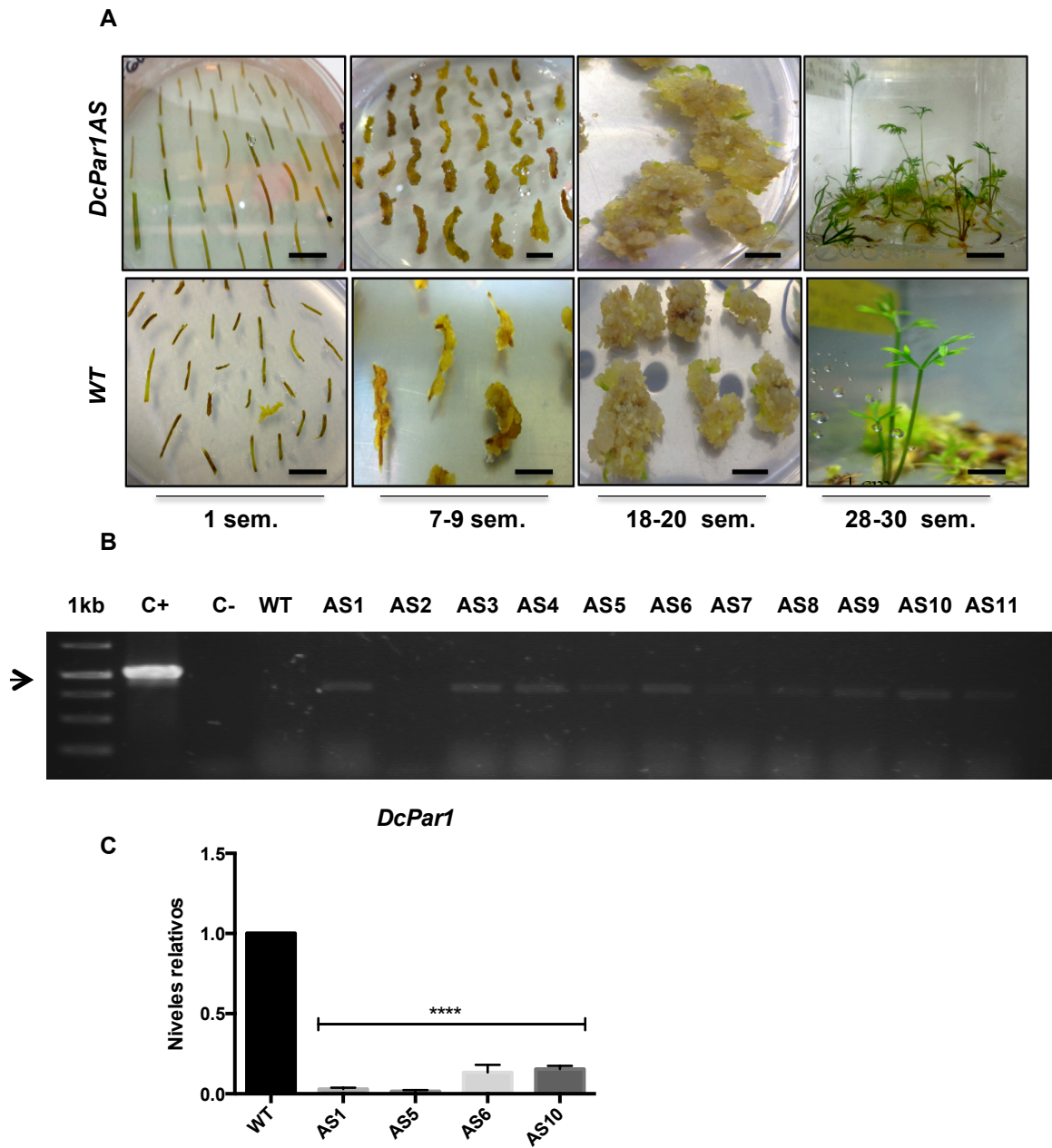


Figura 16. Obtención de plantas de zanahoria SiRNA *DcPar1*. A) Cultivo de plantas transformadas con el vector pG5:DcPar1AS. Bajo cada panel se indican las semanas de desarrollo post-transformación (sem). B) Amplificación del transgen *DcPar1* en antisentido. Se utilizaron una combinación de dos partidores *Reverse*, uno que hibridaba en el gen *Par1* y el otro en el gen reportero *Gfp*, por lo que el amplicón corresponde a una región de la secuencia en antisentido más una región del gen reportero. AS1-AS11 corresponden a plantas adultas transformantes analizadas por PCR; WT planta silvestre; C+ plásmido PCR8:DcPar1AS; C- reacción sin templado; 1kb marcador de peso molecular. La flecha indica el amplicón esperado de 990 pb. C) Niveles relativos de transcrito (en veces de cambio) de *DcPar1*, determinados mediante qRTPCR en raíz de plantas de 4 meses post-traspaso a cultivo en tierra. El nivel de expresión relativa del gen se calculó relativo a la expresión del gen normalizador ubiquitina. Las diferencias significativas señaladas por asteriscos se determinaron con un test de ANOVA de una vía con un post-test de Dunnet.

Luego, evaluamos el fenotipo de estas plantas y la composición de carotenoides de su raíz crecida en oscuridad. Sorpresivamente, las raíces de reserva de las plantas transgénicas adultas (de 4 meses post-traspaso a cultivo en tierra) presentaron un fenotipo distinto al de una raíz de zanahoria silvestre. En la Figura 17 se muestra el fenotipo representativo donde se observa que las raíces fueron mucho más pequeñas en longitud y diámetro, con una masa total promedio de la raíz que no superó los 400 mg, en comparación con una raíz silvestre adulta de la misma edad cuya masa puede superar los 7 g aproximadamente (Figura 17). Este fenotipo lo presentaron 8 de las 10 plantas transgénicas obtenidas, incluyendo aquellas analizadas molecularmente .

Por otro lado, la raíz denotaba a simple vista una pigmentación amarilla pálida, e incluso verdosa en algunas zonas, fenotipo totalmente opuesto al observado en una raíz silvestre, lo que sugería de antemano que los niveles de carotenoides acumulados en estas raíces transgénicas estaban reducidos (Figura 17). Por lo tanto, se concluye que el SGPT de *DcPar1* afecta considerablemente al fenotipo de la raíz de reserva mostrando una reducción en su crecimiento secundario y en coloración.



Figura 17. Fenotipo representativo de raíces adultas de plantas transgénicas SiRNA *DcPar1*. El fenotipo presentado en la imagen corresponde a una raíz silvestre (WT) y la raíz de la línea transgénica L10 de la misma edad (ambas con 4 meses post-traspaso a cultivo en tierra). El fenotipo de la raíz de 8 de las 10 líneas transgénicas obtenidas fue similar. La barra dentro de la fotografía corresponde a 1 cm.

3.5.5.2.1. Cuantificación de los niveles de carotenoides en raíces de zanahorias SiRNA *DcPar1*

Para determinar el contenido de carotenoides en líneas SiRNA *DcPar1*, se llevaron a cabo extracciones de pigmentos a partir de las raíces de 4 líneas transgénicas representativas (líneas AS1, AS5, AS6 y AS10) de 4 meses de edad post-traspaso a cultivo en tierra. Estas extracciones se realizaron en duplicados técnicos ya que por el tamaño y masa total de las raíces, la cantidad de tejido disponible para su procesamiento fue escaso. Posteriormente a la extracción de pigmentos, se cuantificaron los carotenoides totales mediante espectrofotometría y se determinó el perfil carotenogénico mediante RP- HPLC (sección 2.5.2. y 2.5.3.).

Como se puede observar en la Figura 18A, todas las líneas transgénicas analizadas presentaron entre 2 a 5 veces menos carotenoides totales respecto de una raíz de reserva silvestre de la misma edad, en concordancia con el fenotipo pálido que presentaron las raíces de reserva de estas plantas (sección 3.5.5.2., Figura 17). Así mismo, la determinación del perfil carotenogénico arrojó una disminución en los niveles de α - caroteno (entre 60 y 4 veces menos) y β -caroteno (entre 58 y 4 veces menos), pigmentos predominantes y abundantes en las raíces de reserva de zanahorias silvestres (Figura 18B). Sin embargo, y de forma sorpresiva, todas las líneas transgénicas analizadas presentaron mayores niveles de luteína (entre 6 y 15 veces más), un pigmento abundante en órganos fotosintéticos y que está ausente en las raíces de reserva de *Daucus carota* silvestre (Figura 18B).

Estos resultados nos indican que el silenciamiento del gen *DcPar1*, reduce la acumulación de carotenoides totales en la raíz de reserva de zanahoria que crece en oscuridad, particularmente disminuyendo el α -caroteno y el β -caroteno. La baja en el contenido acumulado de pigmentos que normalmente se encuentran en la raíz de

zanahoria, son una primera señal de que este gen puede tener un rol fundamental en el proceso de biosíntesis y/o acumulación de pigmentos, esto acoplado al desarrollo de la raíz de reserva.

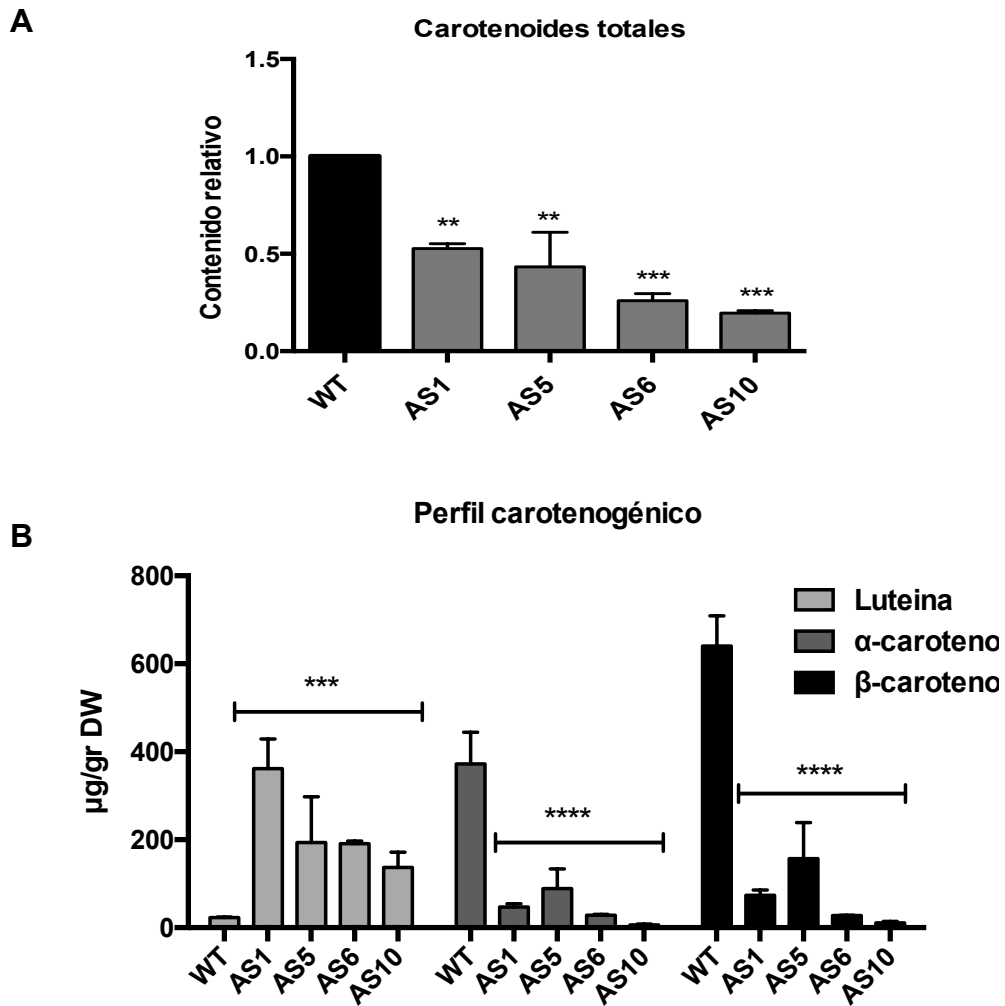


Figura 18. Cuantificación del contenido de carotenoides en raíces de plantas transgénicas SiRNA *DcPar1*. A) Contenido relativo de carotenoides totales (veces de cambio respecto a WT) de la raíz medidos por espectrofotometría a 474 nm. B) Cuantificación del perfil carotenogénico mediante HPLC de las raíces SiRNA *DcPar1*. WT: raíz silvestre; AS1, AS5, AS6 y AS10 son las líneas transgénicas analizadas. El ensayo se realizó con dos replicas técnicas en plantas de 4 meses post-traspaso a cultivo en tierra. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas con relación a WT. Las diferencias significativas se determinaron mediante un test ANOVA de una vía con un post test de Dunnet.

3.5.5.2.2. Perfil de expresión génica relativa de plantas SiRNA *DcPar1*

A las mismas raíces de las líneas analizadas en cuanto a su contenido de carotenoides, se les cuantificó la expresión relativa (niveles relativos de transcritos) de genes involucrados en la ruta de síntesis de carotenoides. Se observa que los genes carotenogénicos de zanahoria analizados sufrieron una disminución en su nivel de expresión relativa: *DcPsy1* entre 3 y 14 veces (entre un 70% y 93% menos expresión relativa), *DcPsy2* entre 4 y 10 veces (entre 80% y 90% menos expresión relativa) y *DcLcyb2* entre 2 a 10 veces (entre 50% y 90% menos expresión relativa) (Figura 19), lo que se correlaciona directamente con los bajos niveles de carotenoides detectados en estas mismas plantas (Figura 17). Por otro lado, y dado que las líneas transgénicas SiRNA *DcPar1* presentaron altos niveles de luteína, se midieron los niveles de expresión relativa de los genes *DcChxb1* y *DcChxb2*. Estos genes codifican para las enzimas β -caroteno-hidroxilasa 1 y 2 respectivamente, las que hidroxilan al α -caroteno para producir luteína. A diferencia de lo esperado, ambos genes presentan una expresión relativa significativamente menor a la observada en plantas silvestres. *DcChxb1* disminuyó su expresión relativa entre 3 a 5 veces (entre 90% y 70% menos expresión relativa), mientras que *DcChxb2* disminuyó su expresión relativa unas 100 veces en la línea AS10 y en la línea AS1 su expresión fue casi nula (entre un 99% y 100% menos expresión) (Figura 19).

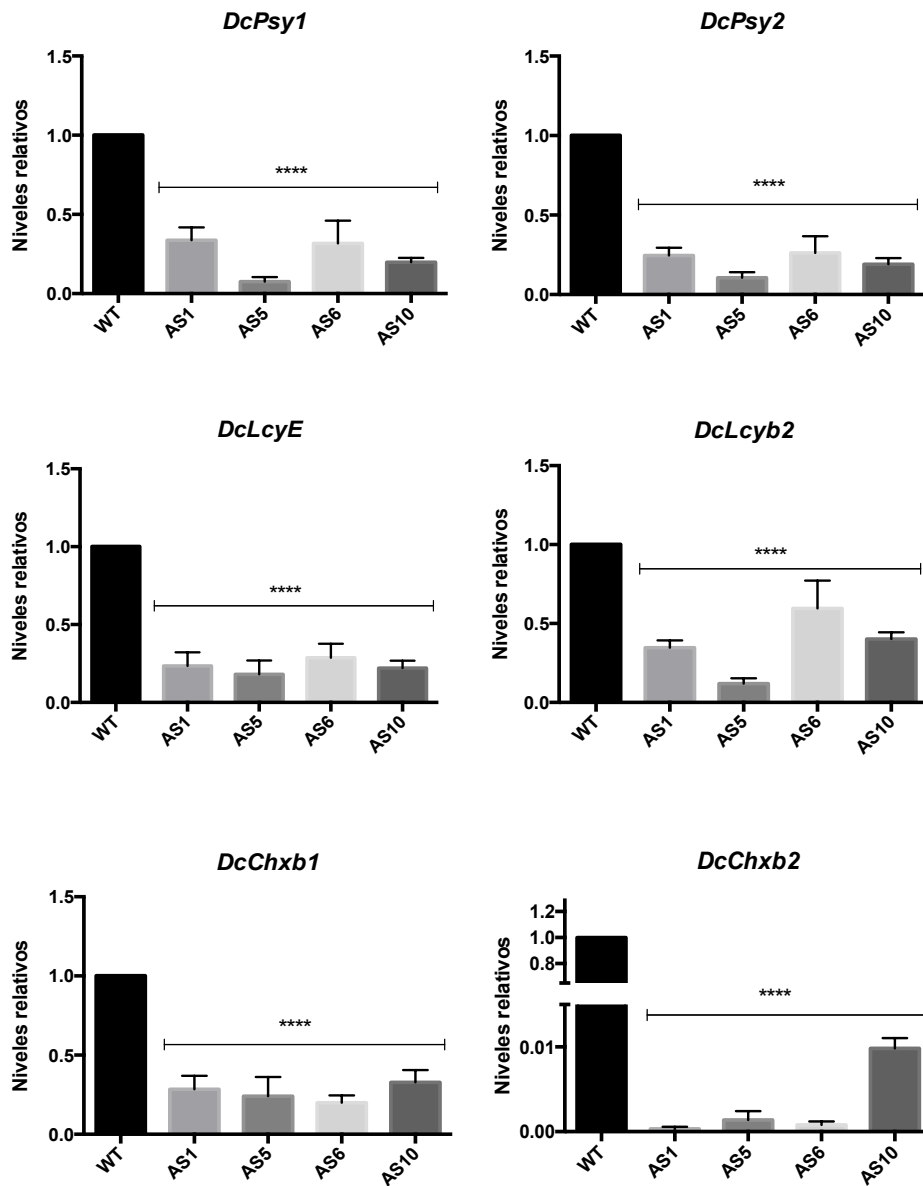


Figura 19. Niveles relativos de transcritos (en veces de cambio) de genes carotenogénicos en plantas transgénicas SiRNA *DcPar1*. *Psy1*: fitoeno sintasa 1; *Psy2*: fitoeno sintasa 2; *LcyE*: licopeno épsilon ciclasa; *Lcyb2*: licopeno beta ciclasa 2; *Chxb1*: beta caroteno hidroxilasa 1; *Chxb2*: beta caroteno hidroxilasa 2. Los niveles de transcritos (expresión relativa) se relativizaron a los niveles de expresión relativa del gen normalizador ubiquitina en plantas silvestres (WT). Se utilizaron 3 réplicas biológicas por duplicado y las diferencias significativas, señaladas por asteriscos, se determinaron mediante un test ANOVA de una vía con un post test de Dunnet.

4. Discusión

4. 1. Transcriptoma *de novo* de *Daucus carota*

Hasta hace un par de años, la información genómica con la que se contaba para *Daucus carota* era muy escasa, a pesar de que su raíz es un excelente modelo para el estudio de la síntesis y acumulación de carotenoides. Los estudios en zanahoria se centraron en la ruta de síntesis de carotenoides la cual ha sido caracterizada en los últimos años por nuestro grupo de investigación y otros (Surles et al., 2004; Baranska et al., 2006; Clotault et al., 2008; Pizarro and Stange 2009; Maass et al., 2009; Kim et al., 2010; Fuentes et al., 2012; Moreno et al., 2013; Simpson et al., 2016b; Simpson et al., 2018). Esto ha permitido entender en parte la relevancia que poseen los genes que codifican para las enzimas que son parte de esta ruta metabólica. Sin embargo, y a pesar de los diversos datos respecto de cómo se generarían estos pigmentos en zanahoria, la regulación transcripcional o post-transcripcional de los genes carotenogénicos es casi nula, esto debido sin duda a la poca información genómica de esta planta.

En el año 2012 pudimos determinar que la luz regulaba negativamente la expresión de genes carotenogénicos y la acumulación de carotenoides en la raíz de zanahoria (Fuentes et al., 2012). Este resultado, contrario a lo reportado en otros modelos vegetales, instaló la interrogante relacionada al hecho de cómo la luz regula la síntesis de carotenoides en una raíz que crece en oscuridad y por lo tanto nos propusimos identificar factores codificados por genes no carotenogénicos que regulen este proceso. Obedeciendo a lo anterior, la secuenciación de los transcritos de la raíz de zanahoria crecida en oscuridad (R/O) y de la raíz crecida en luz (R/L) surgió como una

buena alternativa para abordar de una forma global los fenómenos transcripcionales asociados a la regulación negativa de la síntesis de carotenoides en luz (R/L). Por lo demás, y a pesar de que no se contaba con un genoma de referencia de *Daucus carota*, la secuenciación masiva de transcritos y la generación de transcriptomas en zanahoria era una metodología que ya estaba siendo usada para estudiar la domesticación de esta planta y encontrar nuevos marcadores genéticos y genes involucrados en la síntesis de pigmentos (antocianinas) (Iorizzo et al., 2011; Rong et al., 2014).

La construcción o ensamble de transcriptomas significan un gran desafío bioinformático por la gran cantidad de información que se obtiene a partir de la secuenciación, desafíos que aumentan cuando no se tiene un genoma de referencia (Wang et al., 2009; Oshlack et al., 2010; Grabherr et al., 2011), como ocurrió en nuestro estudio. El transcriptoma *de novo* ensamblado R/O vs. R/L fue de 63124 contigs, cantidad de contigs promedios similares a transcriptomas *de novo* ensamblados para otras especies vegetales (He et al., 2012; Raney et al., 2014; Wang et al., 2015c; Wu et al., 2016). En el caso específico de *Daucus carota*, también se han reportado análisis transcriptómicos previos a la publicación de su genoma en 2016, con una cantidad de contigs muy similares a nuestro transcriptoma *de novo*. Por ejemplo, Iorizzo et al. (2011) reportó un transcriptoma *de novo* de 58751 contigs, Rong et al. (2014) obtuvo un transcriptoma *de novo* de 45165 contigs, Guang-Long et al. (2015) logró ensamblar un transcriptoma *de novo* de 32716 secuencias, mientras que Xu et al., (2014b) reporta el ensamble de un transcriptoma *de novo* de 61986 contigs. De esta manera, se establece que la cantidad de secuencias contigs ensambladas en el transcriptoma *de novo* que se analizó en este trabajo de tesis está dentro de un rango esperado, lo que permite sustentar los análisis que se realizaron posteriormente durante este trabajo.

Para el análisis de RNA-seq que se realizó en este trabajo, se aplicó una corrección por FDR (*False Discovery Rate*) menor que 0,05. Esta corrección se utiliza dado que en este tipo de análisis se realizan múltiples comparaciones con una gran cantidad de información (en este caso, comparaciones de secuencias contigs), lo que favorece la probabilidad de encontrar diferencias al azar (Oshlack et al., 2010). Esta misma corrección fue utilizada en estudios de RNA-Seq de zanahoria morada y zanahoria naranja recientemente publicados (Kodama et al., 2018; Ma et al., 2018, respectivamente), en los que se consideró que luego de aplicar este ajuste de FDR, las secuencias obtenidas estaban expresándose diferencialmente de manera significativa entre las condiciones experimentales evaluadas. En esta tesis, además de la corrección por FDR, se consideraron todas aquellas secuencias que tuviesen veces de cambio iguales o mayores a 2 veces entre R/O y R/L. Con el propósito de obtener la mayor cantidad de información posible a partir del RNA-Seq realizado en nuestras condiciones experimentales y teniendo en cuenta que el efecto de la luz en la síntesis de carotenoides en la raíz de zanahoria es muy escasa, se estimó que 2 veces de cambio sería un buen umbral para realizar la búsqueda de genes diferencialmente expresados sin perder información que podría ser valiosa. Este mismo criterio se utilizó en Wang et al. (2015a), en cuyo análisis RNA-Seq a partir de un transcriptoma *de novo* de zanahoria naranja (variedad Kurodagosum), para determinar los genes diferencialmente expresados entre distintos estadios de desarrollo de la raíz en *Daucus carota*.

Del análisis del transcriptoma modelo de 63124 contigs, y luego de aplicar la corrección por FDR y las dos veces de cambio en la expresión, se obtuvo que 15427 genes estaban más expresados en R/O respecto de R/L (es decir que estaban menos expresados en R/L). Debido a que R/O corresponde a la condición de crecimiento

usual de una raíz de zanahoria, era predecible que una mayor cantidad de genes se expresarían en R/O y que, dado el ambiente inusual de crecimiento en luz (R/L) exista una gran cantidad de genes que disminuyan su expresión, probablemente, producto de estrés lumínico. En relación a esto último, se ha reportado que la luz que llega directamente a las raíces de *Arabidopsis*, tiene la capacidad de cambiar el perfil de expresión en este órgano de la planta (Lee et al., 2016). Es por tanto interesante observar cuáles de los genes que disminuyen su expresión cuando la raíz se expone a la luz, pueden estar relacionados con la regulación de la síntesis de carotenoides en la raíz de zanahoria que crece oscuridad.

A diferencia de análisis de RNA-Seq reportados previamente en que se buscan genes diferencialmente expresados pero cuyo rol ya ha sido caracterizado con anterioridad (Délano-Frier et al., 2011; He et al., 2012; Raney et al., 2014; Wang et al., 2015a; Wang et al., 2015b), el análisis de los 15427 genes más expresados en R/O respecto de R/L se realizó manualmente, sin enfocarse en un grupo de genes con función conocida. Esto último se llevó a cabo para tener una información global de los genes que cambiaran su expresión y que pudieran estar relacionados a la síntesis de carotenoides sin ser genes carotenogénicos, y porque la información de cómo la luz regula la síntesis de carotenoides en la raíz de zanahoria es escasa.

En cuanto a la validación del ensamble del transcriptoma *de novo* mediante qRT-PCR, el 85% de los genes evaluados coincidieron sus niveles de expresión relativa con la predicha por el RNA-Seq (sección 3.2.). Estos resultados son similares a los reportados por Huang et al., en 2012 y Wu et al. en 2016, quienes obtuvieron un 70% y un 90% de coincidencia o correlación entre los resultados arrojados mediante qRT-PCR y los predichos por sus transcriptomas de *pungai* (árbol de guisante asiático de interés económico en la zona) y *camelia*, respectivamente. Este resultado nos indica,

por un lado, que el ensamble realizado fue de calidad y por otro, que los resultados de expresión diferencial *in silico* arrojados por el RNA-Seq se correlacionan con los datos de expresión diferencial obtenidos *in vivo*, lo que hace de nuestro transcriptoma una herramienta confiable para la obtención de información fidedigna. En consecuencia, se consideró válido el ensamble *de novo* del transcriptoma de *Daucus carota* analizado en este trabajo de tesis.

Luego de realizados los ensayos de validación del transcriptoma y la búsqueda de genes diferencialmente expresados (DEGs) entre R/O y R/L (sección 4.2.), durante el año 2016 se publicó el genoma de zanahoria (Iorizzo et al., 2016) lo que facilitó el clonamiento de genes de interés y permitió corroborar que los genes utilizados para el análisis de expresión diferencial y para la validación del ensamble fueron confiables.

4.2. Genes diferencialmente expresados entre la raíz crecida en oscuridad (R/O) respecto de las la raíz crecida en luz (R/L)

Considerando que nuestro transcriptoma *de novo* es confiable y válido, con una correlación entre lo predicho por el RNA-seq y lo obtenido *in vivo*, se analizaron las características del perfil de expresión entre R/O y R/L. La mayoría de los genes carotenogénicos presentaban mayor expresión en R/O, lo que coincide con el estadio de crecimiento de la zanahoria (8 semanas post-germinación), momento en que comienzan a sintetizarse y acumularse masivamente los carotenoides en la raíz (Clotault et al., 2008, Fuentes et al., 2012) (Tabla 3). Esta inferencia se confirma además considerando el perfil transcriptómico de zanahorias naranjas que expresan más genes que codifican para las enzimas que son parte de la ruta de síntesis de

carotenoides respecto de la zanahoria blanca carente de carotenoides (Iorizzo et al., 2016).

En el mismo sentido, las 8 semanas es una etapa en la cual la zanahoria comienza el desarrollo de su raíz de reserva (engrosamiento) (Clotault et al., 2008; Fuentes et al., 2012). Para este proceso requiere de fitohormonas como auxinas y citoquininas y por tanto fue satisfactorio identificar varios genes involucrados en la ruta de síntesis y señalización de estas hormonas en R/O (Tabla 4). Algunos de los genes como *Auxin response factor (Arf)*, *Auxin resistant (Aux)*, *Indolacetic acid induced protein (Iaa)* and *Small auxin up RNAs-like (SAUR-like)* (Tabla 4), participan en una cascada de señalización activada por la hormona auxina, la que permite regular un rango muy amplio de procesos relacionados al desarrollo de la planta, como el desarrollo de su raíz principal, de raíces laterales y la arquitectura de la raíz (Fukaki et al., 2007; Sozzani and Iyer-Pascuzzi, 2014; Takatsuka and Umeda, 2014; Ren and Gray, 2015; Li et al. 2016; van Gelderen et al., 2018). En raíces de zanahorias de 56 días, un estadio de desarrollo equivalente al de 8 semanas, un RNA-Seq a partir de un transcriptoma *de novo* de zanahoria naranja reportó que durante el desarrollo existe una mayor expresión del gen *Arf8* y del gen *Iaa8* respecto de raíces más jóvenes (Wang et al., 2015a).

Así mismo, y en concordancia con el desarrollo de la raíz, en este trabajo se encontraron más expresadas en R/O genes involucrados en diversos procesos biológicos como el gen '*accumulation and replication of chloroplast*' (*Arc6*) que codifica para un componente de la maquinaria que regula la división de plastidios (Glynn et al., 2008), mientras que el gen '*orange*' (*Or*), descubierto en principio en una coliflor mutante de color naranja que acumula una gran cantidad de β -caroteno en su inflorescencia (flor) (Li et al., 2001), codifica para una chaperona DNAJ (*DnaJ cysteine-*

rich zinc finger protein) que es la única conocida hasta el momento que participa en la biogénesis de cromoplastos y que además estabiliza la proteína PSY (fitoeno sintasa) en *Arabidopsis* y papa dulce (Li et al., 2001; Lu et al., 2006; Zhou et al., 2015; Park et al., 2016). Plantas sobre-expresoras del gen *Or* (papa, maíz, papa dulce, coliflor y *Arabidopsis*) presentan niveles aumentados de carotenoides (Berman et al., 2017; Zhou et al., 2015; Ha Kim et al., 2013; Lu et al., 2006; Li et al., 2006; Li et al., 2001), pero esto se debe a que aumenta la capacidad de almacenamiento de estos pigmentos en cromoplastos y no a una regulación transcripcional de los genes carotenogénicos (Zhou et al., 2015). Recientemente, se ha asociado la presencia del gen *Or* en variedades domesticadas de zanahoria que acumulan pigmentos carotenoides, sindicándolo como un gen marcador de la acumulación de estos compuestos en la raíz (Ellison et al., 2018), por lo que su mayor expresión en R/O respecto de R/L concuerda con el desarrollo de cromoplastos y cloroplastos en ambos tejidos, respectivamente (Fuentes et al., 2012).

Entre los genes clasificados como parte de la captación de luz y las cascadas de señalización activadas por luz (Tabla 6), se encontraban fotoreceptores (PHYA, PHYB y CRY) y factores de transcripción como PIF. Tanto PHYA, PHYB y CRY son fotoreceptores que cumplen un rol fundamental en el proceso de fotomorfogénesis, proceso caracterizado mayormente en tejido fotosintético (Wu, 2014; Gommers and Monte, 2018). Sin embargo, existe evidencia tanto de la expresión de los genes que codifican estas proteínas, como también de su actividad en raíces de *Arabidopsis* (Salisbury et al., 2007; Lee et al., 2016). Se ha reportado un rol funcional de los fitocromos en raíces, participando del control del fototropismo y gravitropismo, en la elongación de pelos radiculares y de la raíz primaria y la formación de raíces laterales (Reed et al., 1993; Ruppel et al., 2001; Correl et al., 2003; Correl and Kiss, 2005;

Salisbury et al., 2007; Lee et al., 2016), pero no se ha reportado un rol funcional directo en la síntesis de carotenoides en raíces.

En cuanto a los PIFs, éstos corresponden a factores de transcripción que participan de la regulación de la fotomorfogénesis, reprimiéndola en oscuridad (Wu, 2014; Gommers and Monte, 2018). En este contexto, los PIFs regulan negativamente la expresión del gen *Psy* uniéndose directamente a su promotor, generando una disminución en sus niveles de transcripción con una concomitante disminución en los niveles de carotenoides en *Arabidopsis* crecidas en oscuridad (Toledo-Ortiz et al., 2010). Lo mismo se observa en plantas de *Arabidopsis* sometidas a sombra simulada (Bou-Torrent et al., 2015). Sin embargo, esto solo ocurriría en el tallo (tejido fotosintético) de *Arabidopsis*, ya que en la raíz los PIFs no contribuyen significativamente a la regulación de los niveles de expresión de *Psy* y por tanto no regularían la síntesis de carotenoides en este órgano de la planta (Ruiz-Sola et al., 2014).

Entonces, el rol que poseen estos genes de señalización por luz en la raíz de zanahoria que crece en oscuridad, tal vez esté relacionado netamente con la coordinación de los procesos de desarrollo y crecimiento de este órgano (Quail et al., 2002; Gyula et al., 2003; Xu et al., 2015), los que involucrarían también la acción de fitohormonas como la auxina, cuyo transporte desde el tallo a la raíz es estimulado por la activación de los fitocromos en el vástago (Salisbury et al., 2007). Por otro lado, la percepción de la luz en el tallo afecta directamente a la activación de PHYB en la raíz. La luz percibida por el tallo viaja a las raíces y activa a PHYB, el que a su vez estabiliza al factor de transcripción HY5, el que en condiciones de oscuridad se encuentra reprimido por una acción coordinada entre PIF y COP (Stange and Flores, 2012; Lee et al., 2016). HY5 por su parte, está involucrado en la formación de la raíz primaria y raíces laterales (Oyama et al., 1997; Ang et al., 1998) y en la regulación del desarrollo

gravitrópico (Lee et al., 2016). La síntesis de carotenoides en la raíz de zanahoria está íntimamente relacionada al desarrollo de este órgano. Estos pigmentos aumentan su proporción a medida que la raíz va madurando (Suslow et al., 1999; Clotault et al., 2008). Por lo tanto, es altamente probable que, al igual como ocurre en tejido fotosintético durante el desarrollo fotomorfogénico, la síntesis y acumulación de carotenoides en la raíz de zanahoria que crece en oscuridad sea regulada por la activación de genes involucrados en la señalización por luz como los fitocromos. En análisis transcriptómicos en los que se comparó el perfil de expresión entre zanahorias blancas, amarillas, naranjas-pálidas y naranjas-oscuras, se observó una relación positiva entre la mayor acumulación de carotenoides y la mayor expresión de genes regulados por luz (Iorizzo et al., 2016). Esto se explicó aludiendo a que tal vez las raíces de zanahoria con una gran cantidad de carotenoides acumulados (variedad amarilla y naranja-oscura) son incapaces de inhibir la expresión de genes involucrados en la de-etiolación aun cuando crecen en ausencia de luz (Iorizzo et al., 2016). En este punto habría que determinar si en *Daucus carota* los fitocromos de su raíz, y todos los genes que se regulan rápidamente luego de su activación, como por ejemplo *Par1* (Roig-Villanova et al., 2006), son activados por la luz que viaja directamente desde el tallo, o simplemente toda la maquinaria que regula la fotomorfogénesis está constantemente activa aun cuando la raíz está en oscuridad, como se propone en Iorizzo et al. (2016). Desde nuestra perspectiva, aun cuando la luz pueda transmitirse desde el tallo, existe un fenómeno importante a descifrar y es que la raíz al exponerse a luz, se ve afectada en cuanto a su acumulación de carotenoides y su desarrollo. Por lo cual la hipótesis no parece simple de responder.

Otro de los genes involucrados en la señalización por luz y que estuvo más expresado en R/O fue el gen *Par1* (Phytochrome-Rapidly Regulated 1). Este gen codifica para un

co-factor transcripcional que participa en la regulación de la fotomorfogénesis y el síndrome de huida de la sombra (shade avoidance syndrome, SAS) (Roig-Villanova et al., 2006; Roig-Villanova et al., 2007; Bou-Torrent et al., 2008; Hao et al., 2012; Zhou et al., 2014; Roig-Villanova and Martínez-García, 2016). No hace mucho tiempo este gen fue vinculado a la regulación de la síntesis de carotenoides en tejido fotosintético de *Arabidopsis* (Bou-Torrent et al., 2015). Sus funciones y relación con la síntesis de pigmentos se discute con mayor detalle en las secciones siguientes.

4.3. Elección de *DcPar1*: gen candidato que participaría en la regulación de la síntesis de carotenoides en la raíz de zanahoria que crece en oscuridad

Entre los genes reprimidos por luz en R/L y activados en R/O, se escogió caracterizar el gen *DcPar1* puesto que al poco tiempo de comenzados los análisis del transcriptoma se vinculó este gen a la regulación de la síntesis de carotenoides en tejido fotosintético en *Arabidopsis* (Bou-Torrent et al., 2015). En esta publicación se sugiere que la proteína AtPAR1 sería un regulador negativo del factor de transcripción AtPIF1, el cual reprime la transcripción del gen *AtPsy*, gen clave en la ruta de síntesis de carotenoides. Se demuestra que plantas transgénicas sobre-expresoras de *AtPar1* muestran niveles elevados de carotenoides totales y una mayor expresión relativa del gen *AtPsy*. Por tanto, y en vista que *DcPar1* apareció mayormente expresado en R/O, que participa de la regulación fotomorfogénica y que además *AtPar1* fue vinculado a la síntesis de carotenoides en tejido fotosintético, se decidió caracterizar la función de *DcPar1* en la raíz de zanahoria que crece en oscuridad.

4.3.1. Las plantas OEAtPar1 poseen mayor expresión relativa del gen *DcPsy1* en su raíz que crece en oscuridad en correlación a un aumento en los niveles de carotenoides

El gen *Par1* fue descrito en *Arabidopsis* como uno de los genes que se regulan positiva y rápidamente en respuesta a fitocromos activos en condiciones de sombra simulada [luz blanca (W) más luz roja lejana (FR)] (Roig-Villanova et al., 2006). Si bien posee localización nuclear y un dominio proteico bHLH, carece de un dominio de unión al DNA funcional, por lo que su función reguladora la realiza dimerizando con otros factores de transcripción (Roig-Villanova et al., 2007; Hao et al., 2012; Bou-Torrent et al., 2015). El alargamiento del hipocótilo es una respuesta adaptativa normal en condiciones de escasas de luz, como ocurre en los casos de sombra simulada y de una alta densidad vegetativa alrededor de las plantas (Roig-Villanova et al., 2007; Hao et al., 2012; Roig-Villanova and Martínez-García, 2016). Se ha descrito que en condición de sombra los niveles de luz roja lejana (FR) activan a PHYA, el cual promueve la unión de PAR1 a los factores de transcripción tipo PIFs, lo cual inhibe la elongación excesiva del hipocótilo de las plantas en sombra. En este escenario PAR1 impide que el regulador negativo de la fotomorfogénesis, PIF, se una a promotores de genes que participan de procesos fotomorfogénicos. A la fecha, se ha podido determinar la interacción directa entre AtPAR1 y AtPIF4 (Hao et al., 2012) y entre AtPAR1 y AtPIF1 (Bou-Torrent et al., 2015). AtPAR1 es un regulador negativo de SAS y modula positivamente los procesos de-etiolación y fotomorfogénesis, estimulando en consecuencia la activación de la maquinaria fotosintética luego de que su transcripción se induce, e impidiendo la excesiva elongación de los hipocótilos promovida por los PIF en oscuridad (Roig-Villanova et al., 2007; Stange and Flores, 2012; Hao et al., 2012; Zhou et al., 2014). En plantas de *Arabidopsis* sobre-expresoras del gen *AtPar1* se promueve la fotomorfogénesis (de-etiolación) en oscuridad, bajo iluminación por luz

blanca, luz roja (R), luz FR y luz azul, evidenciándose este fenómeno a través de la inhibición de la elongación del hipocótilo respecto de plantas silvestres (WT) crecidas en las mismas condiciones (Hao et al., 2012; Zhou et al., 2014). También se observa que líneas sobre-expresoras de *AtPar1*, y crecidas en luz, presentan un fenotipo enano y color verde oscuro generalizado, esto último producto de una mayor acumulación de clorofila y carotenoides en su tejido fotosintético respecto de plantas silvestres (WT) (Roig-Villanova et al., 2007).

Sumado a lo anterior, se ha propuesto a PAR1 como un elemento integrador entre los fenómenos SAS y las redes transcripcionales activadas por fitohormonas como las auxinas y giberelinas (Roig-Villanova et al., 2007; Bou-Torrent et al., 2008; Hao et al., 2012). En sombra simulada (fenómeno que emula a SAS), PAR1 regula negativamente la transcripción de genes inducidos por auxinas (*Saur15* y *Saur68*), probablemente impidiendo la unión de factores de transcripción reguladores positivos que se unen a los promotores de estos genes (Roig-Villanova et al., 2007; Bou-Torrent et al., 2008). Dado que las auxinas promueven el desarrollo de la planta, incluida sus raíces, como bien se explicó en la sección 4.2., no es extraño que genes que forman parte de una cascada de señalización que se activa frente al fenómeno SAS (como *Par1*) en la que se modifica el desarrollo de la planta, estén regulando la respuesta frente a la acción de ciertas hormonas.

En el año 2015, y en concordancia con los resultados previamente publicados por Roig-Villanova et al. (2007), Bou-Torrent et al. (2015) reportó que PAR1 regula la síntesis de carotenoides en tejido fotosintético gracias a que promueve la transcripción del gen *Psy* en condiciones de sombra simulada (W+FR). PAR1 se uniría a PIF1, permitiendo así que reguladores positivos de *Psy* se unan a su promotor. De esta manera, aumentan los niveles de carotenoides totales en correlación al aumento en los

niveles de expresión relativa de *Psy*. Este fue el primer y único trabajo en que se propuso a PAR1 como un elemento regulador de la síntesis de carotenoides en plantas.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos anteriormente, se evaluaron los efectos fenotípicos que tuvo la expresión de *AtPar1* en la raíz de zanahoria que crece en oscuridad.

La expresión de *AtPar1* en *Daucus carota* provocó cambios en los niveles de expresión relativa de determinados genes carotenogénicos y en la expresión relativa del gen *Par1* endógeno de zanahoria (sección 3.4.2.). Dado que una expresión relativa mayor del transgen *AtPar1* se correlacionó con los niveles de expresión relativa del gen *DcPsy1* nos sugiere una posible regulación positiva de *AtPar1* sobre *DcPsy1*, y no así sobre *DcPsy2* cuyos niveles de expresión relativa disminuyeron en todas las líneas transgénicas analizadas (sección 3.4.2.).

Por otro lado, si bien todas las líneas transgénicas presentaron una disminución en la expresión relativa del gen endógeno *DcPar1* (sección 3.4.2.), esto podría ser consecuencia de que la expresión constitutiva del transgen compensa a la del gen endógeno, que solo debiese expresarse frente a determinados estímulos mediados por los fitocromos, por lo que no sería necesario invertir recursos en su expresión.

La presencia de embriones naranjos durante el cultivo *in vitro* de las plantas transformantes OEAtPar1, de antemano nos sugirió que el transgen podría estar regulando la síntesis de carotenoides, permitiendo la acumulación temprana de estos pigmentos. Un fenómeno similar se observó durante el cultivo *in vitro* de zanahorias sobre-expresoras del gen *DcPsy1* (Molineros, 2017). Si bien las plantas adultas regeneradas a partir de estos embriones y plántulas anaranjadas no sostuvieron este fenotipo, sí presentaron mayores niveles de carotenoides en su raíz que creció en

oscuridad (Molineros, 2017; Aguilera, 2018), al igual que en este trabajo. Ambas situaciones tienen en común no solo la producción de embriones anaranjados, si no también el aumento en los niveles de expresión relativa del gen *DcPsy1*. Es decir que, tal vez, la expresión temprana del gen *Psy1* producto de la regulación ejercida por *AtPar1* (regulación que se mantendría en plantas adultas) o la sobre-expresión constitutiva del mismo *Psy1*, es la responsable de que se acumulen mayores niveles de carotenoides tanto en tejidos tempranos como en tejidos adultos (raíz). Hasta este punto estas observaciones, sumadas a los resultados de los niveles de expresión relativa de las plantas adultas OE*AtPar1*, sugieren que *AtPar1* regularía la expresión de *Psy1*, modulando así la síntesis de carotenoides en la zanahoria.

El aumento de carotenoides en la raíz de OE1 y OE2 también fue similar al obtenido en líneas de zanahorias transgénicas sobre-expresoras del gen *Dxs* de *A. thaliana* (Simpson et al., 2016b). El gen *Dxs* codifica para la enzima DXS, la cual forma parte de la ruta MEP (ruta del metil-eritriol 4-fosfato) que provee de las moléculas precursoras para la síntesis de carotenoides y clorofilas en plastidios (Simpson et al., 2016b). Las líneas transgénicas para *AtDxs*, presentan un aumento en la expresión relativa de *DcPsy1* en concordancia al aumento en los niveles de carotenoides, lo cual concuerda con las líneas OE1 y OE2 y las líneas que sobre expresan el gen *DcPsy1* (Aguilera, 2018).

Estos resultados en su globalidad, nos sugieren que *AtPar1* podría estar regulando la síntesis de carotenoides en la raíz de zanahoria que crece en oscuridad por medio de la modulación positiva de la expresión relativa del gen *DcPsy1*. Para que ocurra esta regulación positiva sería necesario un determinado umbral del nivel de expresión del transgen, ya que en líneas transgénicas con una menor expresión relativa de *AtPar1*, no se observa el aumento de la expresión relativa de *Psy1* ni un aumento en

carotenoides (Figura 8.). Esta última hipótesis toma sentido si se consideran los resultados de Roig-Villanova et al., (2007) los que sugieren que es necesario que exista un determinado nivel de transcritos de *Par1* para una normal respuesta de genes inducidos por auxinas y regulados por PAR1 durante sombra simulada en plantas de *Arabidopsis*.

Por otro lado, los efectos de *AtPar1* sobre el contenido de carotenoides y sobre la expresión de *DcPsy1* en zanahorias adultas son similares a los observados producto de la sobreexpresión de *AtDxs* en esta planta. DXS participa en la ruta de síntesis de los precursores metabólicos de los carotenoides, por lo que su sobre expresión pondría a disposición una mayor cantidad de estas moléculas que luego son convertidas en carotenoides (Simpson et al., 2016b). La disposición de estos precursores estimularía la expresión de *Psy1*, para promover la síntesis de carotenoides. A mayor cantidad de precursores, más se induce la expresión de *Psy1* y esto generaría el aumento en los carotenoides. Cabe destacar que el aumento en la síntesis y acumulación de carotenoides en raíz de zanahoria se correlaciona directamente con el aumento en la expresión de genes carotenogénicos (Fuentes et al., 2012). A diferencia de *Dxs* cuya regulación sobre *Psy1* sería más bien indirecta, al ser PAR1 un co-factor transcripcional, la regulación sobre *Psy1* sería directa. *AtPAR1* activaría la transcripción de *DcPsy1* gracias a que inhibe a los PIFs, factores de transcripción que impiden la expresión de este gen carotenogénico, tal como lo propone Bou-Torrent et al. (2015). Ambos tipos de regulación determinarían la acumulación de carotenoides en la raíz que crece en oscuridad. Sería por esta razón que tanto *Dxs* como variados genes involucrados en la fotomorfogénesis se encuentran más expresados en raíces con una alta acumulación de carotenoides respecto de raíces con una baja acumulación de estos pigmentos (Iorizzo et al., 2016, esta tesis).

Estos resultados también sugieren fuertemente que el gen *DcPsy1* sería clave para la síntesis de carotenoides en la raíz de zanahoria y que, por tanto, está altamente regulado por factores involucrados en procesos fuera de la ruta de biosíntesis de estos pigmentos.

Para comprobar esta hipótesis en específico, sería necesario realizar nuevas aproximaciones experimentales para comprobar que factores de transcripción como los PIFs, se unen al promotor del gen *DcPsy1* (y/o de *DcPsy2*). Por lo demás, *DcPsy1* presenta elementos de respuesta a luz en sus promotores (G-Box), secuencias a las cuales se unen los PIF, por lo que en plantas expresoras de *AtPar1* la unión de PIF a estos elementos sería menor. Adicionalmente, habría que determinar y comparar la unión de PIF al promotor de *DcPsy1* tanto en raíces R/L, R/O y las raíces de plantas SiRNA *DcPar1*. Además, se podría dilucidar el fenómeno que subyace a que *DcPsy1* y *DcPsy2* no muestren el mismo nivel de inducción cuando *AtPar1* se está sobre-expresando en la raíz (Figura 9) a pesar de que ambos genes presentan en sus promotores elementos de respuesta a luz (G-box) a los que se unen los PIFs.

4.3.2. Caracterización funcional del gen *DcPar1*

Gracias a la secuenciación del genoma de zanahoria (Iorizzo et al., 2016), se pudo comparar la secuencia nucleotídica y aminoacídica de *DcPar1* con otras secuencias *Par1* disponibles en las bases de datos. Respecto de las proteínas PAR1 de *Arabidopsis* y zanahoria, estas muestran un alto nivel de similitud aminoacídica, 63,3% (43,97% de identidad) y el motivo bHLH, lo que sugirió que pueden tener la misma función molecular, lo que fue complementado con el análisis BifC y los análisis de funcionalidad (secciones 3.5.4. y 3.5.5.2.).

4.3.2.1. La proteína DcPAR1 se une *in vivo* al factor de transcripción de Arabidopsis AtPIF7

El motivo estructural basic-Helix-Loop-Helix (bHLH) es un dominio característico de una familia de factores de transcripción presentes en todos los organismos eucariontes y que han sido relacionados a la regulación de múltiples procesos fisiológicos, incluidos la proliferación celular y el desarrollo (Heim et al., 2003). Los dominios bHLH abarcan aproximadamente 60 aminoácidos, los que se dividen en dos subdominios: el dominio básico hacia el N-terminal, el cual participa en la unión del factor de transcripción al DNA, y hacia el C-terminal el dominio HLH de dos α -hélices anfipáticas unidas por un loop de secuencia y longitud variable, el que participa de la interacción proteína-proteína (Toledo-Ortiz et al., 2003; Roig-Villanova et al., 2007).

En plantas, los factores de transcripción del tipo bHLH poseen residuos altamente conservados en la región básica que son los responsables de que estas proteínas tengan afinidad por el DNA y se unan a este. Estos residuos claves normalmente corresponden a residuos de histidina (posición 5), ácido glutámico (posición 9) y arginina (posición 13) (Heim et al., 2003). Como se observó en la Figura 12, estos residuos no están presentes en las proteínas PAR1 de Arabidopsis y zanahoria, lo que explicaría su incapacidad para unirse al DNA. Por otro parte, se ha descrito que en todas las proteínas bHLH de plantas en la hélice 1 (Helix 1) se conserva un residuo de leucina en la posición 23, indicando su importancia en el proceso de dimerización (Heim et al., 2003). Este residuo de leucina 23 está presente en los dominios bHLH de Arabidopsis y zanahoria (Figura 12), lo que sugiere que DcPAR1 tendría la capacidad de dimerizar con otras proteínas.

La capacidad de DcPAR1 para dimerizar y de formar heterodímeros con otras proteínas *in vivo*, se comprobó mediante ensayos de BifC (sección 3.5.4.), mientras

que para AtPAR1 se describen estas mismas características en Hao et al., (2012) y Bou-Torrent et al. (2015).

El dímero formado por las proteínas del tipo bHLH se estabiliza gracias a los residuos hidrofóbicos presentes en la hélice 2 (Helix 2) (Heim et al., 2003). Este tipo de residuos hidrofóbicos, se observaron en la hélice 2 de las proteínas AtPAR1 y DcPAR1 (Figura 12).

Ya se ha determinado que AtPAR1 dimeriza con los factores de transcripción AtPIF1 (Bou-Torrent et al., 2015) y con AtPIF4 (Hao et al., 2012) y en esta tesis comprobamos que DcPAR1 tiene la capacidad de unirse a otras proteínas como AtPIF7 (Figura 13) y recientemente a DcPIF3 (Durán, 2019). En base a esto último, y considerando que el dominio bHLH de DcPAR1 conserva el residuo esencial que permite la dimerización con otras proteínas además de los residuos que permiten la estabilización de esta unión, sumado a su alto porcentaje de similitud con la proteína AtPAR1, nos permite sugerir que DcPAR1 cumpliría un posible rol regulatorio sobre la síntesis de carotenoides en la raíz de zanahoria.

4.3.2.2. Sobreexpresión del gen *DcPar1* en *Daucus carota*

La sobre-expresión de genes ha sido utilizada para la caracterización de otros genes de zanahoria involucrados en la síntesis de carotenoides, como por ejemplo *DcPsy1*, *DcPsy2*, *DcLcyb1* y *DcLcyb2* (Molineros, 2017; Aguilera, 2018; Rosas, 2015; Moreno et al., 2013). En estos trabajos se obtuvo un aumento en los niveles de carotenoides en plantas sobre-expresoras, y por tanto valida este tipo de estrategia para la caracterización de los genes.

Para el caso de la sobre-expresión del gen *DcPar1*, por tanto, llama la atención que no se obtuvieron plantas transgénicas, a pesar de que el cultivo *in vitro* fue exitoso (sección 3.5.4.1.) y conducido de manera regular: se seleccionaron los explantes transformantes con el agente de selección correspondiente, los embriones desarrollados tenían un fenotipo saludable similar a los embriones silvestres, la obtención de embriones transformantes fue un proceso que demoró más tiempo que la obtención de embriones silvestres, como era de esperarse. Por otro lado, explantes de zanahoria sin transformar (silvestres) que también se sometieron a las condiciones de cultivo *in vitro* para la obtención de embriones, pero en ausencia del agente de selección (control negativo del cultivo) murieron rápidamente, dentro de las primeras 3 semanas de cultivo. Tanto la muerte de explantes silvestres sometidos a cultivos con agente de selección, como la demora en el desarrollo de embriones transformantes respecto de embriones silvestres (desarrollados en medios de cultivo sin agente de selección), son señales que nos indican que el procedimiento y los medios de cultivo *in vitro* utilizados para la obtención de plantas transgénicas fueron correctos, por lo que no serían un factor determinante en el resultado de esta actividad.

Considerando los efectos fenotípicos a nivel del desarrollo que presentan plantas de *Arabidopsis* sobre-expresoras de *AtPar1*, los que incluyen enanismo y problemas de fertilidad (silicuas más pequeñas y con una baja considerable en la producción de semillas) (Roig-Villanova et al., 2007; Hao et al., 2012; Zhou et al., 2014), cabe plantearse la posibilidad de que la sobre-expresión del gen endógeno en zanahoria tal vez genere tempranamente problemas en la regulación del desarrollo de embriones que afecta negativamente al proceso de selección de éstos, generándose un alto porcentaje de plantas transformantes falsos positivos. Aunque esto no es concluyente

dado que en las plantas de zanahoria que expresaron *AtPar1* no se obtuvieron estos resultados.

No obstante a los resultados obtenidos para la sobre-expresión del gen *DcPar1* como metodología para la caracterización funcional del gen, la implementación de la estrategia de silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT) resultó exitosa (sección 3.5.4.2.), por lo que se cumple con el objetivo de caracterizar la función de este gen en la planta de *Daucus carota*.

4.3.2.3. Las plantas SiRNA *DcPar1* tuvieron una raíz modificada delgada y con una reducción en los niveles de carotenoides

El silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT) se ha realizado previamente en otras plantas que acumulan una gran cantidad de carotenoides como el tomate (Fraser et al., 1999; Ronen et al., 2000) y en nuestro grupo de investigación ya se ha optimizado esta estrategia en *Daucus carota* obteniendo resultados exitosos (Pizarro, 2008; Ocarez, 2010; Flores, 2010; Moreno et al., 2013). Mediante SGPT se caracterizó el rol del gen *DcLcyb1* en raíz de zanahoria. El silenciamiento de hasta un 95% de este gen provocó una disminución entre un 40% y 60% en los niveles totales de carotenoides y de α -caroteno y β -caroteno en correlación a una disminución en la expresión relativa de los genes *DcPsy1* y *DcPsy2*, resultados similares a las SGPT de *DcPar1*.

Por otro lado, el silenciamiento de hasta un 80% aproximadamente del gen *AtPar1* en plantas de *Arabidopsis*, generó cambios fenotípicos evidentes en las plantas sometidas a distintos tratamientos de luz asociados a la disminución de la expresión relativa del gen, cambios en el desarrollo y pigmentación de los hipocótilos (Zhou et al., 2014).

En esta tesis, el silenciamiento de hasta 95% del gen *DcPar1* (Figura 15) no afectó el desarrollo de las plantas, ni la pigmentación de los hipocótilos ni del tejido fotosintético. Sin embargo, tuvo drásticas consecuencias en la raíz de *D. carota* a nivel fenotípico (la reducción del tamaño de la raíz, Figura 17), molecular (disminución en los niveles de expresión relativa de todos los genes carotenogénicos analizados, Figura 19) y funcional (reducción en los niveles de carotenoides totales y de α -caroteno y β -caroteno acumulados, Figura 18).

Es importante mencionar que el grosor de las raíces también se redujo en las plantas silenciadas para *DcLcyb1* (Moreno et al., 2013), pero el efecto en las plantas SGPT de *DcPar1* fue muchísimo más drástico. Esto puede deberse, quizás, a un rol funcional más amplio que tiene el gen *Par1*, el cual es capaz de inhibir la elongación del hipocótilo en condiciones de sombra simulada, participar en la fotomorfogénesis, regular la respuesta que tienen genes inducidos por auxinas durante el crecimiento y regular la síntesis de carotenoides (Roig-Villanova et al., 2006; Roig-Villanova et al., 2007; Bou-Torrent et al., 2008; Hao et al., 2012; Zhou et al., 2014; Bou-Torrent et al., 2015), por lo que su silenciamiento pudo haber tenido efectos pleiotrópicos. Por otro lado, *Par1* podría tener un carácter de “*master gene*” dado que participa y regula diversos fenómenos fisiológicos en la planta. Es así que una disminución en sus niveles de expresión relativa producto de un silenciamiento afecta de cierta forma a todos los procesos regulados por este gen.

Por otra parte, proponemos que el desarrollo de la raíz de zanahoria está vinculada a la síntesis de carotenoides dado que las plantas a las que se les silenció el gen *DcLcyb1* y *DcPar1*, también manifestaron cambios en la morfología de su raíz (Moreno et al., 2013), y la sobre-expresión de genes como *DcLcyb1* y *DcPsy1* inducen un leve aumento del tamaño de la raíz (Moreno et al., 2013; Aguilera, 2018).

La reducción generalizada en la expresión relativa de los genes carotenogénicos endógenos ocurrida en correlación de los elevados niveles de silenciamiento de *DcPar1*, coloca nuevas interrogantes respecto de cómo se regulan transcripcionalmente estos genes y para ello son requeridos nuevos estudios donde, por ejemplo, se evalúe la abundancia de PIF y la unión de éste a los promotores de genes carotenogénicos en plantas silenciadas para *DcPar1* y plantas silvestres.

Proponemos que *DcPar1* forma parte de una cascada de señalización que induce la síntesis y acumulación de carotenoides en la raíz de zanahoria a través de la inducción de la expresión de los genes carotenogénicos. Al respecto y de manera que sustenta esta hipótesis, ponemos como referente a la raíz que crece en luz (R/L), la que presenta reducidos niveles de *DcPar1* (junto a otros genes como se mencionó anteriormente producto del resultado de RNA-Seq), una reducción en la expresión relativa de genes carotenogénicos y de acumulación de carotenoides, junto a tener un fenotipo delgado (Fuentes et al., 2012), similar al de la raíz de las plantas SiRNA *DcPar1*.

Por el contrario, en el tejido fotosintético no hubo cambios fenotípicos, evidenciando una regulación diferencial entre hoja y raíz.

Por otro lado, y como un resultado inesperado, en todas las líneas SiRNA *DcPar1* analizadas, se observó un aumento en el contenido del pigmento luteína. Este pigmento que deriva de la hidroxilación del α -caroteno, es el carotenoide más abundante en tejido fotosintético (Kim and DellaPenna, 2006) y se acumula tanto en las hojas como en la raíz de zanahoria que crece en luz (R/L) (Fuentes et al., 2012; Rodríguez-Concepción and Stange, 2013). Por lo tanto, las raíces SiRNA *DcPar1* presentan un perfil carotenogénico de tejido fotosintético similar al de R/L, lo que sustenta la hipótesis previamente planteada.

El hecho de que todos los genes carotenogénicos involucrados en la síntesis de α -caroteno, β -caroteno y de luteína se encontraron con expresión relativa reducida, nos sugiere que la razón de que la luteína haya aumentado en las plantas SiRNA *DcPar1* podría deberse a una modificación post-traducciona l de alguna de las enzimas caroteno-hidroxilasa o de la estabilidad de los pigmentos en los plastidios. Para responder a esta hipótesis se podría cuantificar el nivel de proteínas (enzimas) acumuladas y/o su eficiencia en cuanto a su actividad (en este caso, una alta eficiencia que permite convertir la mayor parte de los precursores en luteína).

En relación a lo anterior, *DcPar1* podría ser uno de los responsables de que la raíz de zanahoria que crece en oscuridad genere un desarrollo secundario de la raíz y mantenga un perfil de expresión de genes carotenogénicos y de acumulación de pigmentos acorde a sus condiciones de crecimiento en ausencia de luz. Este rol lo cumpliría en su calidad de co-factor transcripcional, uniéndose a factores de transcripción (como PIF, y tal vez otros factores de transcripción involucrados tanto en la síntesis de carotenoides como en el desarrollo de la raíz secundaria en zanahoria) que modulan negativamente la transcripción de genes carotenogénicos claves (como *DcPsy1*, y tal vez otros de los genes que codifican para enzimas de la ruta de biosíntesis de carotenoides).

En la figura 20, se resume en dos modelos propuestos lo que estaría ocurriendo a nivel transcripcional con los genes carotenogénicos y las proteínas DcPAR1 y DcPIF.

En base a nuestros resultados proponemos que en la raíz que crece en luz (R/L), la disminución en los niveles de transcritos de *Par1* se traduciría en una disminución en sus niveles proteicos (lo que se propone determinar como proyección), lo que favorecería que los factores de transcripción PIF (u otros) regulen negativamente la transcripción de genes carotenogénicos, como *Psy1*. La disminución de PAR1 no solo

afectaría negativamente al proceso de síntesis de carotenoides si no también a procesos relacionados con el desarrollo secundario de la raíz, la que sufre un cambio en su patrón de crecimiento normal (Figura 20A). Por el contrario, en la raíz que crece en oscuridad (R/O), los niveles de transcritos de *DcPar1*, y por consiguiente sus niveles proteicos, se mantendrían en un nivel adecuado para que este co-factor transcripcional regule positivamente el proceso de síntesis de carotenoides y el desarrollo de la raíz secundaria, tal como ocurre en una planta silvestre que crece completamente en oscuridad (Figura 20B). En cuanto a las raíces de zanahoria SiRNA *DcPar1* y que crecen en oscuridad, estas presentarían un perfil carotenogénico similar a las raíces R/L, así mismo como modificaciones en su patrón de desarrollo, dado que la disminución de los transcritos de *DcPar1* podrían correlacionarse a una disminución en sus niveles de proteínas, provocando lo descrito anteriormente para la raíz que crece en luz (R/L).

Por lo tanto, el gen *DcPar1* podría ser uno de los factores fundamentales que determinan que la raíz de zanahoria pueda acumular grandes cantidades de carotenoides en oscuridad, además de ser un elemento integrador (o '*master gene*') que participa de la coordinación de la síntesis de pigmentos con los procesos de desarrollo de la raíz.

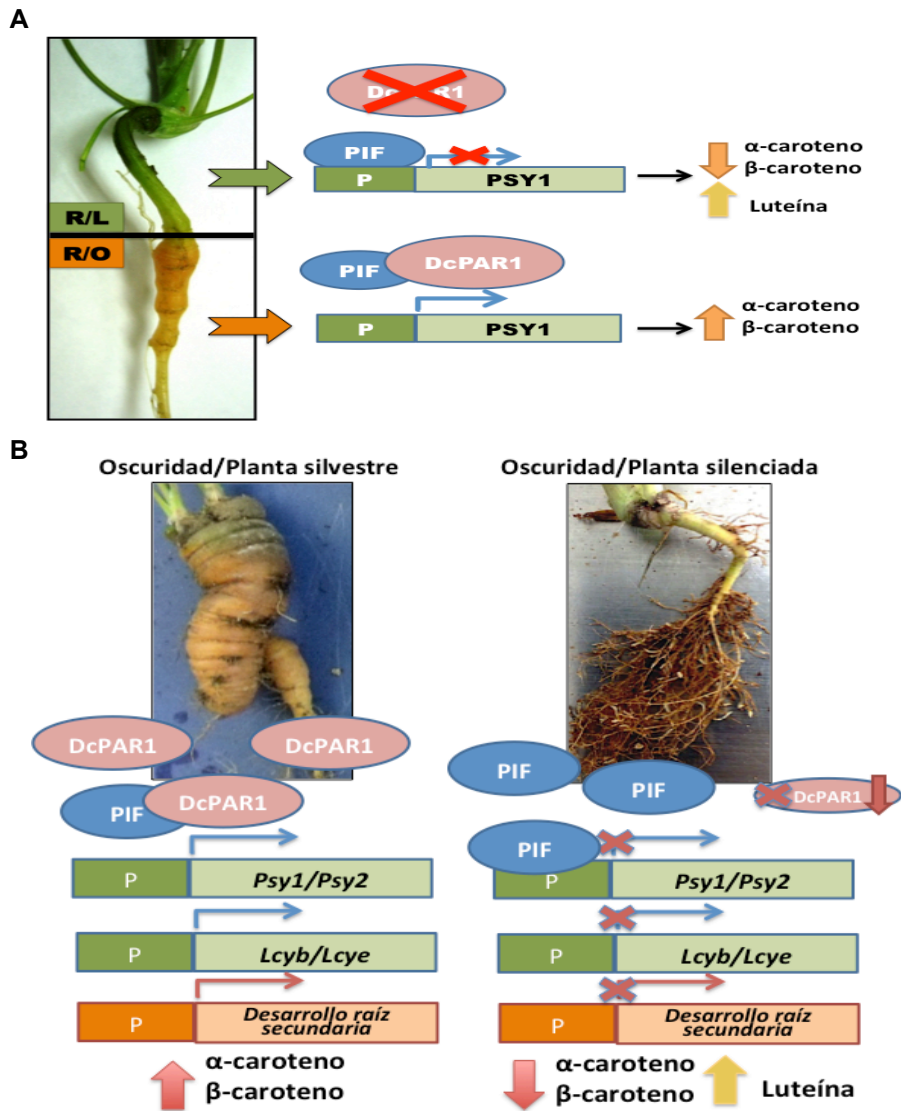


Figura 20. Modelos que explican el posible rol del gen *DcPar1* en la síntesis de carotenoides en *Daucus carota*. A) En luz, la baja abundancia del transcrito de *Par1* explicaría el fenotipo de la raíz crecida en luz (R/L) y la mayor abundancia de transcrito favorece la expresión de genes y síntesis de carotenoides en la raíz crecida en oscuridad (R/O). B) Rol de *Par1* en raíces silvestres y silenciadas para este gen que crecen en oscuridad. En raíces silvestres la abundancia del factor DcPAR1 permitiría la acumulación de carotenoides y el desarrollo secundario normal de la raíz, tal como se observa en la raíz R/O en Figura 20A. En plantas silenciadas, por el contrario, se verían afectadas la transcripción de genes carotenogénicos y posiblemente de genes involucrados en el desarrollo de la raíz, explicando así la disminución en los niveles de pigmentos y los cambios en los patrones normales de desarrollo de la raíz, tal como ocurriría en la raíz R/L en Figura 20A. Flechas indicando hacia arriba o abajo, significan aumento o disminución respectivamente; P: promotor; el símbolo 'X' indica bloqueo o disminución; *Psy1/Psy2*: gen para la fitoeno sintasa 1 y/o 2; *Lcyb/Lcye*: licopeno beta ciclasa y/o licopeno épsilon ciclasa; PIF: phytochrome interacting factor; PAR1: phytochrome rapidly regulated 1.

5. Conclusiones

1. La secuenciación de los transcritos de la raíz de zanahoria de 8 semanas crecida en luz (R/L) y oscuridad (R/O), permitió elaborar un ensamble transcriptómico *de novo* confiable, el cual fue validado *in vivo*.
2. Genes involucrados en síntesis y señalización de fitohormonas, desarrollo plastidial, de señalización por luz y en la fotomorfogénesis, son mayormente expresados en R/O y podrían participar en la regulación de la síntesis y/o acumulación de carotenoides en la raíz de zanahoria que crece en oscuridad.
3. El gen *DcPar1* cuyos niveles de transcritos son regulados positivamente en R/O y negativamente por la luz, codificaría una proteína con 63% de similitud con AtPAR1, y presentaría un dominio bHLH requerido para la heterodimerización. A nivel funcional, presenta localización nuclear y capacidad de unirse a factores de transcripción del tipo PIF.
4. Dado que el SGPT de *DcPar1* provoca una disminución en los niveles de transcritos de genes claves en la síntesis de carotenoides además de una disminución significativa en los niveles de carotenoides en la raíz de zanahoria que crece en oscuridad, proponemos que el gen *DcPar1* estaría vinculado a la regulación de la síntesis y/o acumulación de carotenoides en la raíz de zanahoria que crece en oscuridad.
5. Dado que el SGPT de *DcPar1* produjo raíces de *Daucus carota* delgadas con bajos niveles de carotenoides, se sugiere fuertemente que *DcPar1* participa en el desarrollo de la raíz de reserva de zanahoria, y que la síntesis y/o acumulación de carotenoides en ella está íntimamente relacionada al desarrollo de este órgano.

Entonces, podemos afirmar la hipótesis propuesta y concluir que el gen *DcPar1* es un gen regulado negativamente por la luz y que, siendo un gen no carotenogénico, es capaz de regular la síntesis de carotenoides en la raíz de *Daucus carota* que crece en oscuridad.

6. Proyecciones

6.1. Caracterización funcional del gen *DcPar1* y su rol en la síntesis de carotenoides

Las aproximaciones experimentales utilizadas en este trabajo permitieron establecer correlaciones entre los niveles de transcritos del gen *DcPar1* y *AtPar1*, la unión directa de PAR1 y PIF y los niveles de transcritos de genes carotenogénicos y el fenotipo de la raíz de zanahoria que crece en oscuridad (cambios en los niveles de carotenoides acumulados y/o cambios en el patrón de desarrollo normal de la raíz). Sin embargo, se hace necesario complementar estas aproximaciones considerando los niveles de proteínas codificadas por los genes analizados en este trabajo mediante Western Blot. Por ejemplo, considerar si la disminución en los niveles de transcritos de *DcPar1* en plantas silenciadas o en la raíz R/L se acompaña de una disminución en la cantidad de proteína PAR1 y las proteínas codificadas por los genes carotenogénicos, comparando esto con una raíz silvestre crecida en oscuridad (o R/O), explicando así los resultados observados.

Con relación a esto último, en la actualidad en nuestro grupo de investigación se está optimizando el protocolo de Western Blot a partir de proteínas de la raíz de zanahoria, para que puedan realizarse los análisis antes mencionados y los que se exponen a continuación.

Por otro lado, y para sumar antecedentes respecto de la función que cumple el gen *Par1* en la síntesis de carotenoides proponemos, por un lado, determinar factores de transcripción blancos de DcPAR1 mediante Co-Inmunoprecipitación de proteínas. Esto último considerando que PAR1 no solo interactúe con los factores de transcripción tipo PIF y que existan otros factores de transcripción, regulados por la luz, que participan

en la regulación de la síntesis de carotenoides y/o en la coordinación de este proceso con el desarrollo de la raíz. Al determinar los factores de transcripción blancos de PAR1, se propone también determinar la unión de DcPIF y de estos nuevos factores de transcripción a los promotores de genes carotenogénicos mediante la técnica ChiP-DNA (Inmunoprecipitación de cromatina), teniendo en cuenta que tanto *DcPsy1* como *DcPsy2* poseen elementos de respuesta a luz (G-Box) en sus promotores, elementos *cis* de unión de PIF. Encontrando nuevos blancos de PAR1, se puede ampliar no solo el estudio de la síntesis de carotenoides en la raíz de zanahoria que crece en oscuridad, si no que pueden surgir antecedentes respecto de procesos que se regulan paralelamente a este fenómeno (como el desarrollo de la raíz secundaria).

Además, sería interesante evaluar la posibilidad de generar plantas de zanahorias mutantes nulas de PAR1, mediante mutación sitio dirigida a los aminoácidos esenciales del dominio bHLH para impedir la interacción proteína-proteína de PAR1 (sección 4.3.3.) utilizando la técnica CRISPR-Cas. Impidiendo la unión de este co-factor transcripcional a sus factores de transcripción blanco, se podrían evaluar las consecuencias fenotípicas en un rango más amplio, no solo a nivel de síntesis y/o acumulación de carotenoides y desarrollo de la raíz, si no algunos niveles que tal vez no se perciban en las zanahorias silenciadas para *DcPar1*.

6.2. Relación funcional de *DcPar1* y otros genes más expresados en R/O que en R/L

El gen *Par1* forma parte de un grupo de genes que participan de cascadas de señalización activadas por luz y mediadas por fotoreceptores como los fitocromos. Varios genes involucrados en esta señalización como *PhyA*, *Pif4*, *Far1*, *Fhy3* y que

estuvieron más expresados en R/O respecto de R/L están siendo actualmente caracterizados por otros miembros de nuestro grupo de investigación, determinando su rol en la síntesis y/o acumulación de carotenoides en la raíz de zanahoria que crece en oscuridad. Estos estudios en un futuro permitirán relacionar la función de *DcPar1* con estos factores (posiblemente mediante análisis por BifC y/o Inmunoprecipitación, entre otros) y así posiblemente dilucidar la razón por la cual estas cascadas de señalización activadas por luz y caracterizadas previamente en tejido fotosintético, se encontrarían activas en un órgano de la planta que crece en ausencia de luz, interrogante también planteada por Iorizzo et al. (2016).

7. Bibliografía

1. Adams-Phillips, L., C. Barry and J. Giovannoni (2004). Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends Plant Sci* 7:331-338
2. Aguilera, A. (2018). Estudio de la funcionalidad del gen *DcPSY1* y su rol en la tolerancia a estrés abiótico mediante sobreexpresión en plantas de *Daucus carota*. Seminario de título, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
3. Al-Babili, S., T. T. Hoa and P. Schaub (2006). Exploring the potential of the bacterial carotene desaturase *CrtI* to increase the beta-carotene content in Golden Rice. *J Exp Bot* 57(4): 1007-1014.
4. Ang, L.H., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A. and Deng, X-W. (1998). Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development. *Mol Cell* 1:213-222
5. Armstrong, G. A., and Hearst, J. E. (1996). Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* 10: 228-237.
6. Baranska, M., R. Baranski, H. Schulz and T. Nothnagel (2006). Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta* 5:1028-1037
7. Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A.F., Culiáñez, F., Farràs, R., Carrasco, P. and Fernando, A. (2012). Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PLoS ONE* 7:e46907
8. Berman, J., Zorrilla-López, U., Medina, V., Farré, G., Sandmann, G., Capell, T., Christou, P. And Zhu, C. (2017). The Arabidopsis ORANGE (AtOR) gene promotes carotenoid accumulation in transgenic corn hybrids derived from parental lines with limited carotenoid pools. *Plant Cell Rep* 36:933.
9. Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I., Galstyan, A. and Martínez-García, J. M. (2008). PAR1 and PAR2 integrate shade and hormone transcriptional networks. *Plant Signaling & Behavior* 7:453-454.
10. Bou-Torrent, J., G. Toledo-Ortiz, M. Ortiz-Alcaide, N. Cifuentes-Esquivel, K. J. Halliday, J. F. Martinez-Garcia and M. Rodriguez-Concepcion (2015). Regulation of carotenoid biosynthesis by shade relies on specific subsets of antagonistic transcription factors and co-factors. *Plant Physiol* 169:1584-1594
11. Bramley, P. M. (2002). Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J Exp Bot* 377:2107-2113.
12. Carvajal, R. (2011). Complementación funcional en un sistema heterólogo del gen fitoeno sintasa 1 (*psy1*), involucrado en la biosíntesis de carotenoides en *Daucus carota* (zanahoria). Tesis para optar al título de Bioquímico, Universidad Católica de Valparaíso.
13. Cazzonelli, C. I., N. Nisar, D. Hussain, M. E. Carmody and B. J. Pogson (2010). Biosynthesis and Regulation of Carotenoids in Plants-Micronutrients, Vitamins and Health Benefits. Book *Plant developmental biology* Chapter 7:117-137
14. Chen, W.P. and Punja, Z.K.(2002). Transgenic herbicide- and disease-tolerant carrot (*Daucus carota* L.) plants obtained through *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 20:929-935
15. Chen, Y.-Y., Li, M.-Y., Wu, X.-J., Huang, Y., Ma, J., and Xiong, A.-S. (2015). Genome-wide analysis of basic helix-loop-helix family transcription factors and their role in responses to abiotic stress in carrot. *Mol Breeding* 35:125
16. Cloutault, J., D. Peltier, R. Berruyer, M. Thomas, M. Briard and E. Geoffriau (2008). Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *J Exp Bot* 13: 3563-3573
17. Correl, M.J. and Kiss, J.Z. (2005). The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots. *Plant Cell Phys* 46:317-323
18. Correl, M.J., Coveney, K.M., Raines, S.V., Mullen, J.L., Hangarter, R.P. and Kiss, J.Z. (2003). Phytochromes play a role in phototropism and gravitropism in Arabidopsis roots. *Adv Space Res* 31:2203-2210

19. Cunningham Jr., F. X., and Gantt, E. (1998). Genes and Enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Rev Plant Phys and Plant Mol Bio* 49:557-583
20. de Wit, M., Costa Galvao, V. And Fankhauser, C. (2016). Light-Mediated Hormonal Regulation of plant growth and development. *Annu Rev Plant Biol* 67:513-37
21. Délano-Frier, J.P., Avilés-Arnaut, H., Casarrubias-Castillo, K., Casique-Arroyo, G., Castrillón-Arbeláez, P.A., Herrera-Estrella, L., Massange-Sánchez, J., Martínez-Gallardo, N.A., Parra-Cota, F.I., Vargas-Ortiz, E., and Estrada-Hernández, M.G. (2011). Transcriptomic analysis of grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) using 454 pyrosequencing: comparison with *A. tuberculatus*, expression profiling in stems and in response to biotic and abiotic stress. *BMC Gen* 12:363-380
22. Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15
23. Duran, F. (2019). Estudio de la expresión de PIF3 en el desarrollo de *Daucus carota* y su interacción con DcPAR1. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
24. Ellison, S., Senalik, D., Bostan, H., Iorizzo, M. and Simon, P. (2017). Fine mapping, transcriptome analysis, and marker development for Y2, the gene that conditions β -carotene accumulation in carrot (*Daucus carota* L.). *G3* 7:2665-2675
25. Ellison, S., Luby, C.H., Corak, K.E., Coe, K.M., Senalik, D., Iorizzo, M., Goldman, I.L., Simon, P. and Dawson, J.C. (2018). Carotenoid presence is associated with the Or gene in domesticated carrot. *Genetics* 4:1497-1508
26. Farre, G., C. Bai, R. M. Twyman, T. Capell, P. Christou and C. Zhu (2011). Nutritious crops producing multiple carotenoids-a metabolic balancing act. *Trends Plant Sci* 10: 532-540
27. Flores, C. (2010). Estudio de la función de los genes de z-caroteno desaturasa I (*zds1*) y z-caroteno desaturasa II (*zds2*) de *Daucus carota* (zanahoria). Tesis de Magister. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
28. Fraser, P. D. and P. M. Bramley (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 3:228-265.
29. Fraser, P., Kiano, J., Truesdale, M., Schuch, W. and Bramley, P. (1999). Phytoene synthase-2 activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening. *Plant Mol Biol* 40:687-698
30. Fuentes, P., L. Pizarro, J. C. Moreno, M. Handford, M. Rodriguez-Concepcion and C. Stange (2012). Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Mol Biol* 79: 47-59
31. Fukaki, H., Okushima, Y. and Tasaka, M. (2007). Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *Int Rev Cyt* 256:111-137
32. Giovannoni, J. J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16:170-180.
33. Glynn, J.M., Froehlich, J.E. and Osteryoung, K.W. (2008). Arabidopsis ARC6 coordinates the division machineries of the inner and outer chloroplast membranes through interaction with PDV2 in the intermembrane space. *Plant Cell* 20:2460-2470
34. Gommers, C.M.M. and Monte, E. (2018). Seedling establishment: a dimmer switch-regulated process between dark and light signaling. *Plant Phys* 176:1061-1074
35. Guang-Long, W., Xiao-Ling, J., Zhi-Sheng, X., Feng, W. and Ai-Sheng, X. (2015). Sequencing, assembly, annotation, and gene expression: novel insights into hormonal control of carrot root development revealed by a high-throughput transcriptome. *Mol Genet Genom* 290:1379-1391
36. Grabherr, M.G., Hass, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N. and Regev, A. (2011), Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nature Biotech* 29:644-652
37. Gyula, P., Schafer, E. and Nagy, F. (2003). Light perception and signaling in higher plants. *Curr Opin Plant Bio* 6:446-452

38. Ha Kim, S., Ock Ahn, Y., Ahn, M.J., Cheol Jeong, J., Lee, H.S. And Kwak, S.S. (2013). Cloning and characterization of an Orange gene that increases carotenoid accumulation and salt stress tolerance in transgenic sweetpotato cultures. *Plant Phys and Bioch* 70: 445-454
39. Halliday, K.J. and Fankhauser, C. (2003). Phytochrome-hormonal signalling networks. *New Phyt* 157:449-463
40. Hannoufa, A. and Z. Hossain (2012). Regulation of carotenoid accumulation in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3:198-202
41. Hao, Y., Oh, E., Choi, G., Liang, Z. and Wang, Z-Y. (2012). Interactions between HLH and bHLH factors modulate light-regulated plant development. *Mol plant* 5:688-697
42. He, M., Wang, Y., Hua, W., Zhang, Y. and Wang, Z. (2012). De novo sequencing of *Hypericum perforatum* transcriptome to identify potential genes involved in the biosynthesis of active metabolites. *PLoS ONE* 7:e42081
43. Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B. and Bailey, P.C. (2003). The basic hélix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol Biol Evol* 5:735–747
44. Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opi Plant Bio* 4:210-216
45. Howitt, C. A. and B. J. Pogson (2006). Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment* 3:435-445
46. Huang, Y., M. Y. Li, F. Wang, Z. S. Xu, W. Huang, G. L. Wang, J. Ma and A. S. Xiong (2015). Heat shock factors in carrot: genome-wide identification, classification, and expression profiles response to abiotic stress. *Mol Biol Rep* 5:893-905
47. Huang, J., Lu, X., Yan, H., Chen, S., Zhang, W. and Huang, R. (2012). Transcriptome characterization and sequencing-based identification of salt-responsive genes in *Milletia pinnata*, a semi-mangrove plant. *DNA Res* 19:195-207
48. Iorizzo, M., Ellison, S., Senalik, D., Zeng, P., Satapoomin, P., Huang, J., Bowman, M., Iovene, M., Sanseverino, W., Cavagnaro, P., Yildiz, M., Macko-Podgórní, A., Moranska, E., Grzebelus, D., Ashrafi, H., Zheng, Z., Cheng, S., Spooner, D., Van Deynze, A. and Simon, P. (2016). A high-quality carrot genome assembly provides new insights into carotenoid accumulation and asterid genome evolution. *Nat Gen* 48:657-666
49. Iorizzo, M., D. A. Senalik, D. Grzebelus, M. Bowman, P. F. Cavagnaro, M. Matvienko, H. Ashrafi, A. Van Deynze and P. W. Simon (2011). De novo assembly and characterization of the carrot transcriptome reveals novel genes, new markers, and genetic diversity. *BMC Genomics* 12:389.
50. Just, B. J., C. A. Santos, M. E. Fonseca, L. S. Boiteux, B. B. Oloizia and P. W. Simon (2007). Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theor Appl Genet* 4:693-704
51. Kami, C., Lorrain, S., Horntschek, P. And Fankhauser, C. (2010). Light-regulated plant growth and development. *Curr Top Dev Biol.* 91:29-66
52. Kim, J.E., Rensing, K.H., Douglas, C.J. and Cheng, K.M. (2010). Chromoplasts ultrastructure and estimated carotene content in root secondary phloem of different carrot varieties. *Planta* 231:549–558
53. Kim, J. and DellaPenna, D. (2006). Defining the primary route for lutein synthesis in plants: the rol of *Arabidopsis* carotenoid b-ring hydroxylase CYP97A3. *PNAS* 103:3474-3479
54. Kodama, M., Brinch-Pedersen, H., Sharma, S., Baested H, I., Joernsgaard, B., Dzhanfezova, T., Buchvaldt A, D., Garret V, Filipe, Liu, S. and P Gilbert, M T. (2018). Identification of transcription factor genes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot (*Daucus carota* L.) using RNA-Seq. *BMC Genomics* 18:811
55. Lee, H.J., Ha, J.H., Kim, S.G., Choi, H.K., Kim, Z.H., Han, Y.J., Kim, J.I., Oh, Y., Fragosos, V., Shin, K., Hyeon, T., Choi, H.G., Oh, K.H., Baldwin, I.T. and Park, C.M. (2016). Stem-piped light activates phytochrome B to trigger light responses in *Arabidopsis thaliana* roots. *Sci Signal* 9:(452)ra106

56. Li, S-B., Xie, Z-Z., Hu, C-G. and Zhang, J-Z. (2016). A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Front Plant Sci* 7:47
57. Li, L., Lu, S., Cosman, KM., Earle, ED., Garvin, DF. and O'Neill, J. (2006). β -Carotene accumulation induced by the cauliflower Or gene is not due to an increased capacity of biosynthesis. *Phytochem* 67:1177-1184
58. Li, L., Paolillo, D.J., Parthasarathy, M.V., Di Muzio, E.M. and Garvin, D.F. (2001). A novel gene mutation that confers abnormal patterns of β -carotene accumulation in cauliflower (*Brassica oleracea var. botrytis*). *Plant J* 26:59-67
59. Lichtenthaler, H.K. and Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Curr Prot Food Analy Chem* F4.3-F4.3.8
60. Llorente, B., Martinez-Garcia, JF., Stange, C. And Rodriguez-Concepción, M. (2017). Illuminating colors: regulation of carotenoid biosynthesis and accumulation by light. *Curr Opi Plant Bio* 37:49-55
61. Lu, S. and L. Li (2008). Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *J Integr Plant Biol* 7:778-785
62. Lu, S., Van Eck, J., Zhou, X., Lopez, AB., O'Halloran, D., Cosman, KM., Conlin, BJ., Paolillo, DJ., Garvin, DF., Vrebalov, J., Kochian, LV., Kupper, H., Earle, ED., Cao, J., and Li, L. (2006). The cauliflower Or gene encodes a DnaJ Cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of β -carotene accumulation. *Plant Cell* 12:3594-3605
63. Ma, J., Li, J., Xu, Z., Wang, F. and Xiong, A. (2018). Transcriptome profiling of genes involving in carotenoid biosynthesis and accumulation between leaf and root of carrot (*Daucus carota* L.) *Acta Biochim Biophys Sin* 50:481-490
64. 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
65. Machaj, G., Bostan, H., Macko-Podgórní, A., Iorizzo, M. and Grzebelus, D. (2018). Comparative transcriptomics of root development in wild and cultivated carrots. *Genes* 9:431
66. Molineros, L. (2017). Transformación con los genes *DcPsy1* y *DcPsy2* de la ruta de biosíntesis de carotenoides en *Daucus carota* y la localización subcelular de la proteína DcPsy1. Seminario de título. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
67. Moreno, J. C., Cerda, A., Simpson, K., López-Díaz, I., Handford, M. and Stange, C. (2016). Increased *Nicotiana tabacum* fitness through positive regulation of carotenoid, gibberellin and chlorophyll pathways promoted by *Daucus carota* lycopene β -cyclase (*Dclcyb1*) expression. *J Exp Bot* 67:2325-2338
68. Moreno, J. C., L. Pizarro, P. Fuentes, M. Handford, V. Cifuentes and C. Stange (2013). Levels of lycopene β -cyclase 1 modulate carotenoid gene expression and accumulation in *Daucus carota*. *PLoS One* 8(3): e58144
69. Morey, M., A. Fernandez-Marmiesse, D. Castineiras, J. M. Fraga, M. L. Couce and J. A. Cocho (2013). A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Mol Genet Metab* 110: 3-24
70. Ocaez, N. (2010). Estudio funcional del gen de la licopeno β ciclase2 (LCYB2) mediante silenciamiento post- transcripcional en *Daucus.carota* (zanahoria). Seminario de título. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile
71. Oshlack, A., Robinson, M. D., and Young, M. D. (2010). From RNA-Seq reads to differential expression results. *Genome Biology* 11:220
72. Oyama, T., Shimura, Y. and Okada, K. (1997). The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev* 11:2983-2995
73. Park, S., Kim, H., Jung, Y., Kim, S., Ji, C., Wang, Z., Jeong, J., Lee, H-S., Lee, S. and Kwak, S-S. (2016). Orange protein has a role in phytoene synthase stabilization in sweet potato. *Sci Rep* 6:335-63

74. Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nuc Acid Res* 29:e45
75. Pizarro, L. (2008). Estudio de la importancia del gen licopeno β ciclasa (*Lcyb1*) en la biosíntesis de carotenoides en *Daucus carota*. Tesis de Magister. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile
76. Pizarro, L., and Stange, C. (2009). Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia e Investigación Agraria* 2:143-162.
77. Quail, P. H. (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Reviews*. 3:85-93
78. Raney, J.A., Reynolds, D.J., Elzinga, D.B., Page, J., Udall, J. A., Jellen, E. N., Bonfacio, A., Fairbanks, D.J. and Maughan, P.J. (2014). Transcriptome Analysis of drought induced stress in *Chenopodium quinoa*. *Amer Jour Plant Sci* 5:338-357
79. Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M. and Chory, J. (1993). Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 5:147-157
80. Ren, H. and Gray, W.M. (2015). SAUR proteins as effectors of hormonal and environmental signals in plant growth. *Mol Plant* 8:1153-1164
81. Rodríguez-Concepción, M. (2010). Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Arch Biochem Biophys* 1:118-122
82. Rodríguez-Concepción, M. and Stange, C. (2013). Biosynthesis of carotenoids in carrot: an underground story comes to light. *Arch Biochem Biophys* 2:110-116.
83. Roig-Villanova, I. and Martínez-García, J.F. (2016). Plant responses to vegetation proximity: a whole life avoiding shade. *Front Plant Sci* 7:236
84. Roig-Villanova, I., Bou, J., Sorin, C., Devlin, P.F. and Martínez-García, J.F. (2006). Identification of primary target genes of phytochrome signaling. Early transcriptional control during shade avoidance responses in *Arabidopsis*. *Plant Phys* 141:85-96
85. Roig-Villanova, I., Bou-Torrent, J., Galstyan, A., Carretero-Paulet, L., Portolés, S., Rodríguez-Concepción, M. and Martínez-García, J.F. (2007). Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. *EMBO Jour* 26:4756-4767
86. Romer, S. and P. D. Fraser (2005). Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta* 3:305-308
87. Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D. and Hirschberg, J. (2000). An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplast discovered by map-based cloning of beta and old gold color mutation in tomato. *Proc Natl Acad Sci* 97:11102-11107
88. Rong, J., Lammers, Y., Strasburg, J. L., Schidlo, N. S., Ariyurek, Y., de Yong, T. J., Klinkhamer, P. G. L., Smulders, M. J. M., and Vrieling, K. (2014). New insights into domestication of carrot from root transcriptome analyses. *BMC Genomics* 15:895
89. Rosas, C. (2015). Caracterización funcional del gen carotenogénico licopeno β -ciclasa 2 (*DcLcyb2*) de *Daucus carota* (zanahoria) mediante expresión en sistemas heterólogos. Tesis de Magister. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile
90. Ruiz-Sola, M.A., Rodríguez-Villalón, A. and Rodríguez-Concepción, M. (2014). Light-sensitive Phytochrome-Interacting Factors (PIFs) are not required to regulate phytoene synthase gene expression in the root. *Plant Sign Behav* 9:e29248
91. Ruppel, N.J., Hangarter, R.P. and Kiss, J.Z. (2001). Red-light-induced positive phototropism in *Arabidopsis* roots. *Planta* 212:424-430
92. Ruyter-Spira, C., S. Al-Babili, S. van der Krol and Bouwmeester, H. (2013). The biology of strigolactones. *Trends Plant Sci* 2:72-83
93. Salisbury, F.J., Hall, A., Grierson, C.S. and Halliday, K.J. (2007). Phytochrome coordinates *Arabidopsis* shoot and root development. *Plant Jour* 50:429-438
94. Sandmann, G. (2015). Carotenoids of biotechnological importance. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 148:449-467
95. Sandmann, G., Romer, S., and Fraser, P. D. (2006). Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metab Eng* 4:291-302

96. Shendure, J. and H. Ji (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 10:1135-1145
97. Simkin, A. J., C. Zhu, M. Kuntz and Sandmann, G. (2003). Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*) leaves. *J Plant Physiol* 5:439-443
98. Simpson, K., Fuentes, P., Quiroz-Iturra, L.F., Flores-Ortiz, C., Contreras, R., Handford, M., and Stange, C. (2018). Unraveling the induction of phytoene synthase 2 expression by salt stress and abscisic acid in *Daucus carota*. *J Exp Bot* 69:4113-4126
99. Simpson, K., Cerda, A. and Stange, C. (2016a). Carotenoid Biosynthesis in *Daucus carota*. *Carotenoids in Nature*, Chapter 7 DOI 10.1007/978-3-319-39126-7_7
100. Simpson, K., Quiroz, LF., Rodriguez-Concepción, M. and Stange, C. (2016b). Differential contribution of the first two enzymes of the MEP pathway to the supply of metabolic precursors for carotenoid and chlorophyll biosynthesis in carrot (*Daucus carota*). *Front Plant Sci* 7:1344
101. Sozzani, R. and Iyer-Pascuzzi, A. (2014). Postembryonic control of root meristem growth and development. *Curr Op Plant Bio* 17:7-12
102. Stange, C., and Flores, C. (2012). Carotenoids and Photosynthesis-Regulation of Carotenoid Biosynthesis by Photoreceptors. *Advances in Photosynthesis - Fundamental Aspects*, Chapter 4.
103. Stange, C., Fuentes, P., Handford, M., and Pizarro, L. (2008). *Daucus carota* as a novel model to evaluate the effect of light on carotenogenic gene expression. *Biol Res* 41:289-301
104. Surles R.L., Weng, N., Simon, P.W. and Tanumihardjo, S.A. (2004). Carotenoid profiles and consumer sensory evaluation of specialty carrots (*Daucus carota*, L.) of various colors. *J Agric Food Chem* 52:3417–3421
105. Suslow, T. V., Wu, J., and Peiser, G. (1999). Characterization of carotenoid composition of carrots affected by "light root syndrome". *Perishables Handling Quarterly* 100:11-14
106. Takatsuka, H. and Umeda, M. (2014). Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *J Exp Bot* 65:2633-2643
107. Tanaka, Y. and A. Ohmiya (2008). Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Curr Opi Biotechnol* 2:190-197
108. Tian, C., Q. Jiang, F. Wang, G. L. Wang, Z. S. Xu and A. S. Xiong (2015). Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves. *PLoS One* 2:e0117569
109. Toledo-Ortiz, G., Huq, E., and Rodriguez-Concepción, M. (2010). Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *PNAS* 25:11626-11631
110. Toledo-Ortiz, G., Huq, E. and Quail, P.H. (2003). The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 15:1749-1770
111. van Gelderen, K., Kang, C. and Pierik, R. (2018). Light signaling, root development, and plasticity. *Plant Phys* 176:1049-1060
112. Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Rev* 10:57-63
113. Wang, G. L., X. L. Jia, Z. S. Xu, F. Wang and A. S. Xiong (2015a). Sequencing, assembly, annotation, and gene expression: novel insights into the hormonal control of carrot root development revealed by a high-throughput transcriptome. *Mol Genet Genomics* 4:1379-1391
114. Wang, G. L., Z. S. Xu, F. Wang, M. Y. Li, G. F. Tan and A. S. Xiong (2015b). Regulation of ascorbic acid biosynthesis and recycling during root development in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Physiol Biochem* 94:10-18
115. Wang, G., Du, X., Ji, J., Guang, C., Li, Z. and Lontchi Josine, T. (2015c). De novo characterization of the *Lycium chinense* Mill. leaf transcriptome and analysis of candidate genes involved in carotenoid biosynthesis. *Gene* 555:458-463

116. Woitsch, S. (2003). Expression of Xanthophyll Biosynthetic Genes during Light-Dependent Chloroplast Differentiation. *Plant Physiology* 3:1508-1517
117. Wu, Q, Chen, Z., Sun, W, Deng, T. and Chen, M. (2016). *De novo* Sequencing of the Leaf Transcriptome reveals complex Light-Responsive regulatory networks in *Camellia sinensis* cv. Baijiguan. *Front Plant Sci* 7:332
118. Wu, S-H. (2014). Gene expression regulation in photomorphogenesis from the perspective of the central dogma. *Ann Rev Plant Biol* 65:311-333
119. Xu, X., Paik, I., Zhu, L. and Huq, E. (2015). Illuminating progress in phytochrome-mediated light signaling pathways. *Trends Plant Sci* 20:641-650
120. Xu, Z. S., Huang, Y., Wang, F., Song, X., Wang, G. L., and Xiong, A. S. (2014a). Transcript profiling of structural genes involved in cyanidin-based anthocyanin biosynthesis between purple and non-purple carrot (*Daucus carota* L.) cultivars reveals distinct patterns. *BMC Plant Biology* 14:262
121. Xu, Z. S., H. W. Tan, F. Wang, X. L. Hou and A. S. Xiong (2014b). CarrotDB: a genomic and transcriptomic database for carrot. *Database (Oxford)* 2014.
122. Zhou, X., Welsch, R., Yang, Y., Álvarez, D., Riediger, M., Yuan, H., Fish, T., Liu, J., Thannhauser, T. W. and Li, L. (2015). Arabidopsis OR proteins are the major posttranscriptional regulators of phytoene synthase in controlling carotenoid biosynthesis. *PNAS* 11:3558-3563.
123. Zhou, P., Song, M., Yang, Q., Su, L., Hou, P., Guo, L., Zheng, X., Xi, Y., Meng, F., Xiao, Y., Yang, L. and Yang, J. (2014). Both PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED1 (PAR1) and PAR2 promote seedling photomorphogenesis in multiple light signaling pathways. *Plant Phy* 164:841-852

8. Anexo

8.1. Tablas de Materiales y Métodos

Tabla 1: Composición de medios de cultivo para la transformación y embriogénesis somática de *Daucus carota*

Composición	Germinación	Co-cultivo	MI*	MII*	MIII*
MS**	4,43 g/L	4,43 g/L	4,43 g/L	4,43 g/L	4,43 g/L
Myo-Inositol	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L
Sacarosa	20 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L
Agar-Agar	7 g/L	7 g/L	7 g/L	7 g/L	7 g/L
2,4-D***	-	-	1 mg/L	0,5 mg/L	-
Higromicina	-	-	2 mg/L	4 mg/L	6 mg/L
Timentín	-	-	300 mg/L	300 mg/L	300 mg/L

*corresponden a los tres medios de cultivo *in vitro* para la embriogénesis somática de *Daucus carota*.

**Murashige and Skoog basal médium with vitamins. Medio de cultivo para plantas (Phytotechnology).

***Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Tabla 2: Partidores utilizados para amplificar y clonar el gen *DcPar1* en vectores de entrada PCR8 y vectores BifC

Partidor	Secuencia 5'--->3'	Características	Amplicón esperado
DcPar1.F	ATG AAA AAC ATA ACC ACC GGA ATG GC	Partidor que hibrida desde el ATG del CDS del gen	363 pb
DcPar1.R s/t	GCC TCC AAG CTT AGA TTT TTG CTT GT	Partidor que hibrida al final de la secuencia CDS del gen sin incluir el	

		codón de término	
2X35S	CTTCGCAAGACCCTTCC	Partidor que hibrida en promotor 35s de vectores BifC	

Tabla 3: Programas de PCR convencional, RT-PCR, PCR colonia y qRTPCR utilizados en este trabajo.

A. PCR convencional

Etapa	Condiciones (T°C/tiempo)	Número de ciclos
Denaturación inicial	94°C/ 5 minutos	1
Denaturación por ciclo	94°C/ 40 segundos	30-40
Alineamiento del partidor	TH°C*/ 20-30 segundos	
Extensión**	72°C/ 30 seg. -1 minuto	
Extensión final	72°C/ 10 minutos	1
Conservación	10°C/ 30-60 minutos	1

*TH°C: temperatura hibridación de partidores. Esta varía según partidor utilizado.

**Tiempo varía según fragmento a amplificar. Se calcula según $V_{Taq} = 1\text{Kb}/\text{min}$ y el largo del fragmento.

B. Transcripción Reversa (RT-PCR)

Etapas	Condiciones (T°C/tiempo)	Número de ciclos
1	70°C/ 5 minutos	1
2	25°C/ 5 minutos	
3	42°C/ 60 minutos	
4	70°C/ 15 minutos	
5	10°C/ 30-60 minutos	

C. PCR de colonias

Etapas	Condiciones (T°C/tiempo)	Número de ciclos
Denaturación inicial	94°C/ 5 minutos	1
Denaturación por ciclo	94°C/ 40 segundos	35
Alineamiento del partidor	TH°C*/ 20-30 segundos	
Extensión**	72°C/ 30 seg. -1 minuto	
Extensión final	72°C/ 10 minutos	1
Conservación	10°C/ 30-60 minutos	1

*TH°C: temperatura hibridación de partidores. Esta varía según partidador utilizado.

**Tiempo varía según fragmento a amplificar. Se calcula según $V_{Taq} = 1\text{Kb}/\text{min}$ y el largo del fragmento.

D. qRTPCR

Etapa	Condiciones (T°C/tiempo)	Número de ciclos
Denaturación inicial	94°C/ 5 minutos	1
Denaturación por ciclo	94°C/ 15segundos	50
Alineamiento del partidor	60°C/ 15 segundos	
Extención**	72°C/ 15 segundos	
Extención final	72°C/ 10 minutos	1

Tabla 4: Partidores para qRTPCR utilizados en este trabajo

Partidor	Secuencia 5'-3'	Usos
AtqPar1.F	CGC AGA ACC AAA CGG AGA TTG TCA G	Utilizados para la medición de los niveles de expresión del gen <i>AtPar1</i> en plantas de zanahorias transgénicas.
AtqPar1.R	GGG ATA ATC CTC TGC AAC GCC TCA A	
DcqPar1.F	AAT GCC AAG CCC TTG AGC CAC	Utilizados para la medición de los niveles de expresión del gen <i>DcPar1</i> en plantas de zanahorias transgénicas. Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqPar1.R	ATC CTC ATC CTC ATC AGC TCC AGT	
DcqOr.F	CAA CAG GAG CAG AAG CGA TGC AAG	Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqOr.R	TCC ATT CAC CAT TGC GAC TGG TTC A	
DcqPhyA.F	GCA GTT ACA AGT GAG ATG GTC AGG C	Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqPhyA.R	ATG GCT TTA TCC ACA GGA AGA CCG	
DcqPhyB.F	TTG AGT CAC CCA CGT ACT GCT GTT	Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqPhyB.R	CGC AGC GAA TTT AGG ATT GTC TGC C	

DcqPif4.F	GTG ACA ATT TCA GGA CAG CAG GTA	Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqPif4.R	CCA GCA TGG TTC ATT ACC CTC AAC	
DcqCop1.F	TTC AGC TCA CAC CCA CTA GAA CCA	Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqCop1.R	CAC CAG CCC AGA AGC TAA TTT CTC A	
DcqLcyb2.F	GCT TGC GAT GCT TAG CTT GTC ACT	Utilizados para le medición de los niveles de expresión del gen <i>DcLcyb2</i> en plantas de zanahorias transgénicas. Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqLcyb2.R	CAA TAC CAC CAT TCA CCA ACT CCC	
DcqLcyE.F	CCC AGA AAC TTC TAC ACA ATC TCC ACC	Utilizados para le medición de los niveles de expresión del gen <i>DcLcyE</i> en plantas de zanahorias transgénicas.
DcqLcyE.R	CCC ACA ACT CAC CTT CAC ATT ACT CC	
DcqCxbh1.F	CTC AAG CTC CAC CTC ATT CTC TCT GG	Utilizados para le medición de los niveles de expresión del gen <i>DcCxbh1</i> en plantas de zanahorias transgénicas.
DcqCxbh1.R	GAC GGG TTT AGT TTT CGG ACG GAT G	
DcqCxbh2.F	TGC CTT CTT GCA TCT CTC CCA ACA	Utilizados para le medición de los niveles de expresión del gen <i>DcCxbh2</i> en plantas de zanahorias transgénicas.
DcqCxbh2.R	TTT CCT ACA CGG AAC AAC CCG ACA G	
DcqFar1-5.F	TTT CAG CGG TCA TTT GTT TGT GCC	Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqFar1-5.R	TCG GGT TAT AGT GCG AGG ACG TTT G	
DcqDag.F	GGT TGA TAA GTG GGG TAC GTG CAA G	Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqDag.R	ACC TGG AGT TCT ATG GGT TCT TCC	
DcqAlf1.F	GTC TCC ACT GGG CTT CTC TTT CAC	Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqAlf1.R	ATT GCT GGA TGC TCT CTG TGG C	
DcqAlf5.F	TTA CCT GCG GAG GAA GTA CCC	Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqAlf5.R	CTT CTC TTG CAT CCC ATC TCT GGC	
DcqPds.F	TCTCCACCTCCTTCATTCAGTCTAA	Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqPds.R	GCAAAATGAAGTCGCTATGTGTCT	
DcqZds.F	GGCAAGCTTCTGCCTACATTTG	Utilizados para validación del transcriptoma.

DcqZds.R	TGATCACCTTCTAGTGGTCCGA	
DcqArc6.F	CCG AGG TGT TAG ATG GCC AGA TG	Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqArc6.R	TAA GTG AGT AGT CCC AGG ACC AAC C	
DcqDxs1.F	GCA TAC CCC TGG CAT ACT CAT CTA C	Utilizados para la medición de los niveles de expresión del gen <i>DcDxs1</i> en plantas de zanahorias transgénicas. Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqDxs1.R	GAG CCC TCA GTA GTG CCT TAA GC	
DcqArf6.F	TCA TGA GCT GCG TAG TGA ACT TGC	Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqArf6.R	AGC TGC CAG CCT GAT CTT AAA GGA	
DcqPa1p.F	CTC AAT GCT ACA ACA ACT GCC CC	Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqPa1p.R	TGA TTA GCT CGC TCA TTC CAC GTC	
DcqPsy2.F	TGG CTC AAG CAG GGC TTT CT	Utilizados para la medición de los niveles de expresión del gen <i>DcPsy2</i> en plantas de zanahorias transgénicas. Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqPsy2.R	ATG CCC ATA CCG GCC ATC TA	
DcqCrtiso.F	TGC CTC CAG ATA CGG ATT GCC A	Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqCrtiso.R	AGG ACA GTC GGA ATG CTC AGG AAT	
DcqMio.F	CAG AAC TGG ACA GAT TGG GGT GC	Utilizado como gen normalizador en los distintos ensayos de qRT-PCR. Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqMio.R	ATC ACC GCT GCT CGA TGT TGT C	
DcqUbi.F	GCT CGA GGA CGG CAG AAC	Utilizado como gen normalizador en los distintos ensayos de qRT-PCR. Utilizados para validación del transcriptoma.
DcqUbi.R	CTT GGG CTT GGT GTA GGT CTT C	

Tabla 5: Combinaciones de vectores utilizados para ensayo BifC

	pYFN empty	pYFC empty	pYFN: DcPar1	pYFC: DcPar1	pYFN: AtPif7	pYFC: AtPif7
pYFN empty		X		X		X
pYFC empty	X		X		X	
pYFN:DcPar1		X		X		X
pYFC:DcPar1	X		X		X	
pYFN:AtPif7		X		X		X
pYFC:AtPif7	X		X		X	

- BifC: Bimolecular fluorescence complementation.
- pYFN/pYFC empty: vectores BifC vacíos (controles negativos).
- pYFN:pYFC:DcPar1: vectores BifC con la secuencia que codifica la región N-terminal o C-terminal de la proteína fluorescente amarilla (YFP) fusionada a la secuencia codificante del gen *DcPar1*.
- pYFN:pYFC:AtPif7: vectores BifC con la secuencia que codifica la región N-terminal o C-terminal de la proteína fluorescente amarilla (YFP) fusionada a la secuencia codificante del gen *AtPif7*.

Tabla 6: Secuencias contigs utilizadas para la validación del transcriptoma de novo

Anotación	Contig ID	Número de reads en oscuridad	Número de reads en luz
<i>DcPar1</i>	Contig42760	17	0
<i>DcOr</i>	Contig15664	825	25,5
<i>DcPhyA</i>	Contig4845	28	0
<i>DcPhyB</i>	Contig1318	39	0,5
<i>DcPif4</i>	Contig3423	17	0
<i>DcCop1</i>	Contig9757	34	1
<i>DcLcyb2</i>	Contig29892	12,5	0
<i>DcFar1-5</i>	Contig28971	11	0

<i>DcDag</i>	Contig12990	22,5	1
<i>DcAlf1</i>	Contig1983	169	0
<i>DcAlf5</i>	Contig22603	74	0
<i>DcPds</i>	Contig6437	53	0
<i>DcZds</i>	Contig11017	34	0
<i>DcArc6</i>	Contig17614	12,5	0
<i>DcDxs1</i>	Contig2826	290	2,5
<i>DcArf6</i>	Contig20289	16,5	0,5
<i>DcPa1-p</i>	Contig10351	472	0
<i>DcPsy2</i>	Contig3840	12,5	11
<i>DcCrtiso</i>	Contig33224	24,5	83,5
<i>DcMio1</i>	Contig5184	-	-

8.2. Anexos resultados

8.2.1. Alineamiento nucleotídico entre secuencia DCAR_013315 y la secuencia PREDICTED: *Daucus carota* subsp. *sativus* transcription factor PAR1 (LOC108217806), mRNA (XM_017390696.1) (*DcPar1*)

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

DCAR_013315      ATGAAAAACATAACCACCGGAATGGCCAATGCCAAGCCCTTGAGCCACTCCTCATCTCTA      60
XM_017390696.1  ATGAAAAACATAACCACCGGAATGGCCAATGCCAAGCCCTTGAGCCACTCCTCATCTCTA      60
*****

DCAR_013315      GCCACCAAGGCATTAATGCCCCCTGCCACATCACTCTCAAGAGAAAAGAGATGTGGGC      120
XM_017390696.1  GCCACCAAGGCATTAATGCCCCCTGCCACATCACTCTCAAGAGAAAAGAGATGTGGGC      120
*****

DCAR_013315      TTAGCTGACAACACTGGAGCTGATGAGGATGAGGATGATGAAGAGGAGTGTAAAGAAGAG      180
XM_017390696.1  TTAGCTGACAACACTGGAGCTGATGAGGATGAGGATGATGAAGAGGAGTGTAAAGAAGAG      180
*****

DCAR_013315      GTGGAGAAGAAGATAGTTGAGCTGCAGAAGATAGTGCCAGGGGAGAGTCACTTGAGAAT      240
XM_017390696.1  GTGGAGAAGAAGATAGTTGAGCTGCAGAAGATAGTGCCAGGGGAGAGTCACTTGAGAAT      240
*****

DCAR_013315      GTAGACAATCTTTTTGAAGAAACAGCTGGCTACATTTTGGACTTGCAGAACCAATCAAA      300
XM_017390696.1  GTAGACAATCTTTTTGAAGAAACAGCTGGCTACATTTTGGACTTGCAGAACCAATCAAA      300
*****

DCAR_013315      GGTCTCAGAGTCTTGCTTCTTTTTTCAATTACTTGACAAGCAAAAATCTAAGCTTGGA      360
XM_017390696.1  GGTCTCAGAGTCTTGCTTCTTTTTTCAATTACTTGACAAGCAAAAATCTAAGCTTGGA      360
*****

DCAR_013315      GGCTGA      366
XM_017390696.1  GGCTGA      366
*****
```

Figura 1. Alineamiento de secuencias nucleotídicas entre la secuencia DCAR_013315 y la secuencia de *DcPar1* depositada en NCBI (XM_017390696.1). Los alineamientos fueron realizados utilizando la herramienta bioinformática *on line* Clustal Omega.

8.2.2. Alineamiento nucleotídico entre secuencia DCAR_013315 y la secuencia contig 42760 anotada en el transcriptoma de zanahoria como *DcPar1*

```

CLUSTAL O(1.2.3) multiple sequence alignment

DCAR_013315      ATGAAAAACATAACCACCGGAATGGCCAATGCCAAGCCCTTGAGCCACTCCTCATCTCTA
Contig42760      -----

DCAR_013315      GCCACCAAGGCATTAATGCCCCCTGCCCACATCACTCTCAAGAGAAAAAGAGATGTGGGC
Contig42760      -----

DCAR_013315      TTAGCTGACAACACTGGAGCTGATGAGGATGAGGATGATGAAGAGGAGTGTAAGAAGAG
Contig42760      -----

DCAR_013315      GTGGAGAAGAAGATAGTTGAGCTGCAGAAGATAGTCCAGGGGGAGAGTCACTTGAGAAT
Contig42760      -----CAGAAGATAGTCCAGGAGGAGAGTCACTGGAGAAT
                        *****  *****  *****  *****

DCAR_013315      GTAGACAATCTTTTTGAAGAAACAGCTGGCTACATTTTGGACTTGCAGAACCAAATCAAA
Contig42760      GTAGACAATCTTTTTGAAGAAACAGCTGGCTACATTTTGGACTTGCAGAACCAAATCAAA
                        *****

DCAR_013315      GGTCTCAGAGTTCTTGCTTCTTTTTTCAATTACTTGACAAGCAAAAATCTAAGCTTGGA
Contig42760      GGTCTCAGAGTTCTTGCTTCTTTTTT-CAATTACTTGACAAGCAAAAATAAGCTTGGA
                        *****

DCAR_013315      GGCTGA-----
Contig42760      GGCTGACAATCTCTGATTCACAACCACCATATTTCTCTTATTTAAATATAATTAATTAC
                        *****

DCAR_013315      -----
Contig42760      ATTTCTTTTACAGCTTTTCTCTATCTCTTTCTTTGCCTGTCTAGCTAGCTTAGCATGC

DCAR_013315      -----
Contig42760      TCAACAAGATCTAGATT

```

Figura 2. Alineamiento de secuencias nucleotídicas entre la secuencia DCAR_013315 y la secuencia del contig 42760. Los alineamientos fueron realizados utilizando la herramienta bioinformática *on line* Clustal Omega.

8.2.3. Plásmidos utilizados en este trabajo de tesis

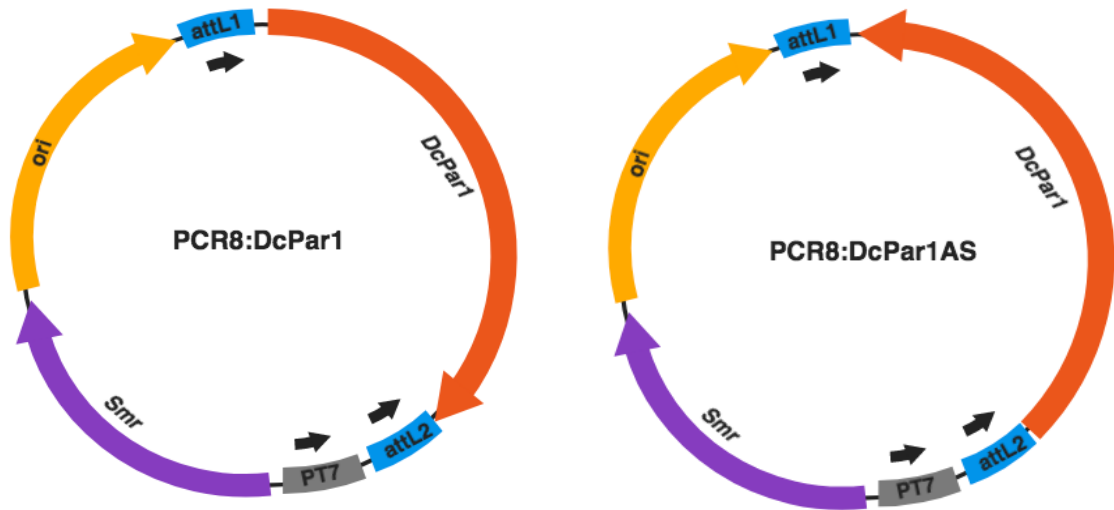


Figura 3. Modelo simplificado de los vectores de entrada en los que se clonó el gen *DcPar1*. En el panel izquierdo PCR8:DcPar1 con la secuencia clonada en sentido. En el panel derecho PCR8:DcPar1AS con la secuencia clonada en antisentido. Smr: gen que confiere resistencia al antibiótico espectinomicina y estreptomycin; Ori: origen de replicación; PT7: promotor T7 de la RNA polimerasa de bacteriófago T7; attL1 y attL2: sitios de recombinación LR (Gateway®)

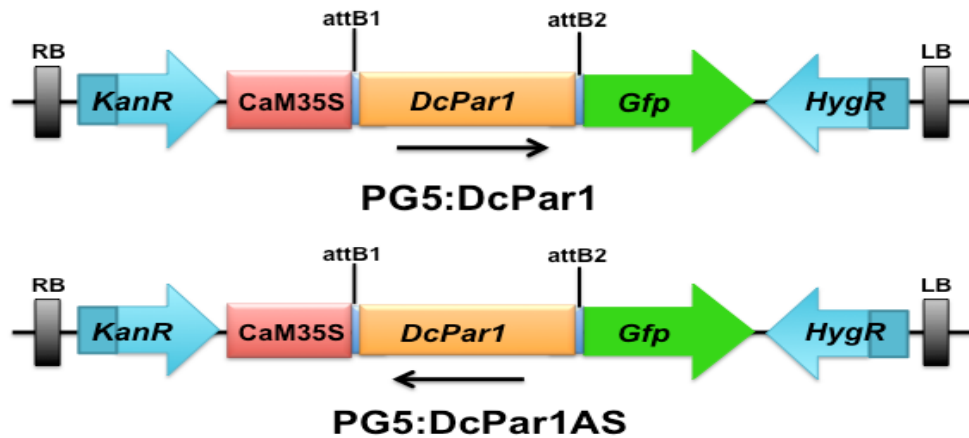


Figura 4. Modelo simplificado de los vectores de destino en los que se clonó el gen *DcPar1*. En el panel superior PG5:DcPar1 con la secuencia clonada en sentido (flecha negra inferior indica sentido). En el panel inferior PG5:DcPar1AS con la secuencia clonada en antisentido (flecha negra inferior indica el antisentido). *KanR*: gen que confiere resistencia a Kanamicina; *HygR*: gen que confiere resistencia a higromicina; CaM35S: promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor; *Gfp*: gen reportero que codifica para la proteína fluorescente verde GFP; attB1 y attB2: sitios de recombinación Gateway®; RB y LB: borde derecho y borde izquierdo, respectivamente, que limitan el cassette que se inserta en el genoma de la planta receptora.

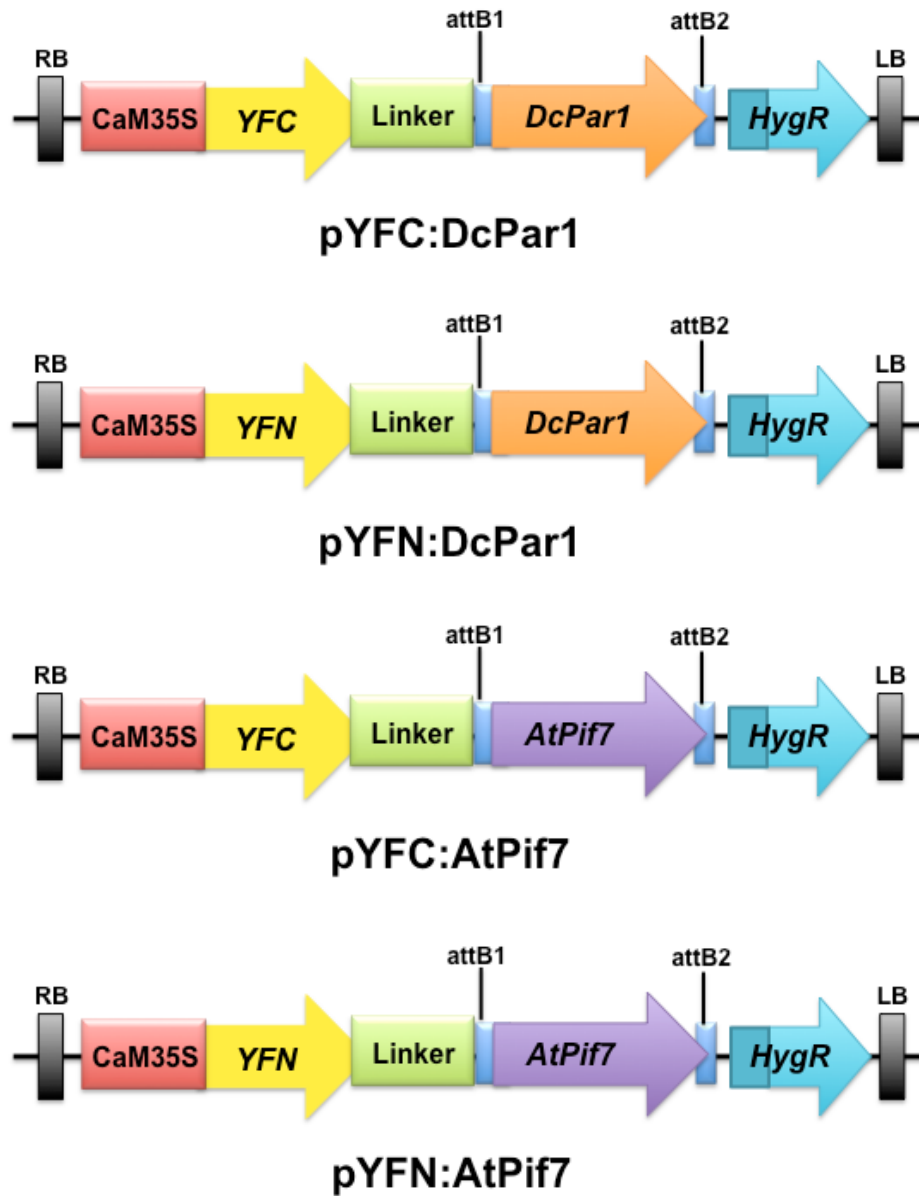


Figura 5. Modelo simplificado de los vectores de destinación para los ensayos de BifC (Bimolecular fluorescence complementation). *HygR*: gen que confiere resistencia a higromicina; CaM35S: promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor; *YFC* e *YFN*: secuencia que codifica para la región C-terminal y N-terminal de la proteína fluorescente amarilla YFP; Linker: secuencia flexible que permite la unión del gen de interés a la región N- o C-terminal de YFP. Además participa en la recomposición de YFP una vez establecida la interacción entre las proteínas estudiadas mediante BifC; attB1 y attB2: sitios de recombinación Gateway®; RB y LB: borde derecho y borde izquierdo, respectivamente, que limitan el cassette que se inserta en el genoma de la planta receptora.