



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Estudio de la funcionalidad del gen *DcPSY1* y su rol en la tolerancia a estrés abiótico mediante sobreexpresión en plantas de *Daucus carota*

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

Bioquímico

Agustín Eduardo Aguilera Banchero

Directora de la Memoria de Título

Dra. Claudia Stange

Enero 2018

Índice de contenidos

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Hipótesis y Objetivos	12
3.1 Hipótesis	12
3.2 Objetivo general	12
3.3 Objetivos específicos	12
Materiales y Métodos	13
4.1 Material biológico	13
4.2 Reactivos	14
4.3 Termociclador acoplado a un sistema óptico de detección	14
4.4 Partidores	14
4.5 Extracción y cuantificación de DNA genómico	16
4.6 Extracción de RNA	16
4.7 Electroforesis en geles de agarosa	17
4.8 PCR convencional	18
4.9 Transcripción reversa y PCR	19
4.10 RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR)	20
4.11 Determinación de la eficiencia de los partidores	21

4.12 Extracción de pigmentos	21
4.13 Cuantificación de pigmentos totales	22
4.14 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	23
4.15 Determinación de la composición de los carotenoides	23
4.16 Ensayo de fuga electrolítica	24
Resultados	25
5.1 Selección de plantas transgénicas de <i>Daucus carota</i> transformadas con el gen <i>DcPSY1</i>	25
5.2 Cuantificación de carotenoides totales mediante espectrofotometría	28
5.3 Determinación de la composición de pigmentos mediante HPLC	30
5.4 Expresión relativa de genes carotenogénicos mediante qRT-PCR	33
<u>5.4.1 Extracción de RNA y síntesis de cDNA mediante RT-PCR</u>	33
<u>5.4.2 PCR cuantitativo en tiempo real de la abundancia de transcrito de <i>DcPSY1</i> y genes carotenogénicos endógenos</u>	36
5.5 Ensayo de tolerancia a estrés salino	40
Discusión	42
Conclusión	50
Referencias	51

Índice de tablas

Tabla 1. Lista de los partidores utilizados	14
Tabla 2. Programa de amplificación para PCR a partir del DNA genómico de <i>Daucus carota</i>	18
Tabla 3. Programa de temperatura para RT-PCR	19
Tabla 4. Programa de temperatura para RT-PCR cuantitativo	21
Tabla 5. Concentración del DNA genómico extraído de cada línea transformante para <i>DcPSY1</i>	26
Tabla 6. Concentración del RNA total extraído a partir de las hojas de las líneas transgénicas <i>DcPSY1</i>	34
Tabla 7. Concentración del RNA total extraído a partir de las raíces de las líneas transgénicas <i>DcPSY1</i> seleccionadas	35

Índice de figuras

Figura 1. Biosíntesis de carotenoides y rutas metabólicas relacionadas	8
Figura 2. Esquema del vector pGWB2-PSY1	13
Figura 3. Espectro de absorción de clorofila a, clorofila b y carotenoides	23
Figura 4. Amplificación de un fragmento del gen <i>DcLCYB1</i> a partir de DNA genómico de las plantas transformantes	27
Figura 5. Amplificación de un fragmento del gen <i>hptII</i> a partir de DNA genómico de las plantas transformantes	27
Figura 6. Cuantificación de carotenoides totales en hojas de las líneas transgénicas <i>DcPSY1</i>	29
Figura 7. Cuantificación de carotenoides totales en hoja y raíz de reserva de las líneas seleccionadas	29
Figura 8. Cuantificación de carotenoides específicos en hojas de las líneas transgénicas <i>DcPSY1</i>	31
Figura 9. Cuantificación de las clorofilas presentes en hoja de las líneas transgénicas <i>DcPSY1</i>	32
Figura 10. Cuantificación de carotenoides específicos en raíz de reserva de las líneas transgénicas <i>DcPSY1</i>	33
Figura 11. Verificación de la integridad del RNA extraído mediante electroforesis	35
Figura 12. Amplificación de un fragmento del gen <i>DcLCYB1</i> a partir del cDNA sintetizado previamente mediante RT-PCR	36
Figura 13. Expresión de los genes <i>DcPSY1</i> y <i>DcPSY2</i> en hojas y raíces de reserva de líneas transgénicas de <i>D. carota</i>	37

Figura 14. Expresión de los genes <i>DcLCYB1</i> y <i>DcLCYB2</i> en hojas y raíces de reserva de líneas transgénicas de <i>D. carota</i>	38
Figura 15. Expresión de los genes <i>DcLCYE</i> y <i>DcNCED1</i> en hojas y raíces de reserva de líneas transgénicas de <i>D. carota</i>	39
Figura 16. Pérdida o fuga de electrolitos de las líneas seleccionadas por tratamientos agudos con sal	41
Figura 17. Fotografías de la regeneración de explantes de <i>D. carota</i>	43

Lista de abreviaturas

- ABA : Ácido abscísico
- BrEt : Bromuro de etidio
- CBMV : Centro de Biología Molecular Vegetal
- cDNA : Ácido desoxirribonucleico complementario
- CTAB : Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- DEPC : Dietilpirocarbonato
- DMAPP : Dimetilalil pirofosfato
- DNA : Ácido desoxirribonucleico
- dNTP : Desoxirribonucleótido trifosfato
- EDTA : Ácido etilendiaminotetraacético
- GGPP : Geranilgeranil pirofosfato
- HPLC : Cromatografía líquida de alta resolución
- hptII : Higromicina fosfotransferasa II
- IPP : Isopentenil pirofosfato
- LB : Borde izquierdo
- MEP : Metileritrol fosfato
- mRNA : Ácido ribonucleico mensajero
- MVA : Mevalonato
- NaCl : Cloruro de sodio
- pb : Pares de bases
- PCR : Reacción en cadena de la Polimerasa
- PMT : Tubo fotomultiplicador
- PSY : Fitoeno sintasa
- qRT-PCR : PCR cuantitativo en tiempo real
- RB : Borde derecho
- ROS : Especies reactivas de oxígeno
- RT-PCR : PCR de transcripción reversa

- TAE : Tris-acetato-EDTA
- Tm : Temperatura de fusión
- Tris : Tris(hidroximetil)aminometano
- UV : Ultravioleta
- VAD : Deficiencia de vitamina A
- Wt : Silvestre

Resumen

Los carotenoides son compuestos isoprenoides sintetizados por todos los organismos fotosintéticos y algunos no fotosintéticos. En plantas cumplen variadas funciones al participar durante el proceso de fotosíntesis como pigmentos accesorios, como agentes protectores contra el estrés fotooxidativo y como precursores del ácido abscísico. Los animales son incapaces de sintetizarlos y deben ingerirlos mediante la dieta. En ellos cumplen un rol fundamental para la formación de vitamina A y como agentes antioxidantes. Debido a esto es que la manipulación del contenido de carotenoides de diversas especies vegetales, se presenta como una atractiva herramienta para mejorar la calidad de los cultivos y/o aumentar su valor nutricional. La zanahoria (*Daucus carota*) destaca como candidata para estos estudios, ya que acumula enormes cantidades de carotenoides en su raíz de reserva que se desarrolla en oscuridad, además de no requerir de condiciones muy estrictas para su cultivo. La biosíntesis del primer carotenoide (y precursor de todos los demás), el fitoeno, es catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY). Este paso, se considera un punto clave dentro de la ruta de síntesis y está altamente regulado. En algunas plantas, se ha descrito como la expresión del gen *PSY* promueve un aumento en la acumulación de carotenoides totales en hojas y frutos. En *Daucus carota* se han descrito 2 genes parálogos de la enzima PSY, *DcPSY1* y *DcPSY2*, asociados principalmente a la carotenogénesis de hojas y raíces respectivamente. También en otras especies vegetales se han descrito más de un gen *PSY*, atribuyéndoles propiedades órgano específicas en cuanto a su función y la regulación de su expresión. En este trabajo, se analizaron plantas de zanahoria transformadas con un vector binario para sobreexpresar uno de estos genes parálogos, el gen *DcPSY1*.

Se observó que en plantas transgénicas de *DcPSY1*, los niveles de expresión del gen se correlacionan con un aumento en la acumulación de carotenoides totales en hojas y raíces de reserva. A pesar de esto, se observaron diferentes patrones en la composición de carotenoides específicos en estos dos órganos. Las hojas de plantas transgénicas que

presentaron mayor acumulación de luteína y β -caroteno no mostraron una variación en los niveles de clorofilas, ni una correlación directa con la expresión de otros genes carotenogénicos. En cambio, las raíces que vieron aumentados sus niveles de α y β -caroteno, presentaron un notorio incremento en la expresión de los genes carotenogénicos *DcPSY2*, *DcLCYB1*, *DcLCYB2*, *DcLCYE* y *DcNCED1*. Por último, los ensayos de resistencia a estrés abiótico no mostraron una mayor tolerancia a daños generados por elevadas concentraciones de sal en las líneas transgénicas. Estos resultados sugieren un rol diferencial para el gen *DcPSY1* respecto al tejido fotosintético rico en cloroplastos y las raíces, donde priman los cromoplastos, lo que ayudaría a comprender mejor la función de este gen en zanahorias.

Abstract

Study of the functionality of *DcPSY1* gene and its role in abiotic stress tolerance through overexpression in *Daucus carota*

Carotenoids are isoprenoid compounds synthesized by all photosynthetic and some non photosynthetic organisms. In plants, they fulfill a wide variety of functions by participating as accessory pigments during the photosynthetic process, protecting against photooxidative stress and as abscisic acid precursor. Animals are incapable of synthesizing them so they have to be incorporated through the diet, where they have a fundamental role in vitamin A formation and as antioxidant agents. These are some of the reasons why the carotenoid content manipulation of a variety of vegetal species presents as an attractive tool for the improvement of crop quality and increasing their nutritional value. Carrot stands out as a good candidate for these studies because its particular capability of accumulating huge amounts of carotenoids in its reservoir root, which is developed in darkness, and due to not requiring too demanding conditions for its cultivation. The biosynthesis of the first carotenoid (and precursor of the rest of them), phytoene, is catalyzed by the enzyme phytoene synthase (PSY). This step is considered as a key point in the synthetic pathway and is highly regulated. In some plants, it has been described how *PSY* gene expression promotes an increase in total carotenoid accumulation in fruits and leaves. In *Daucus carota* 2 paralogous genes of PSY enzyme have been described, *DcPSY1* and *DcPSY2*, mainly associated with carotenogenesis in leaves and roots respectively. More than one *PSY* gene has been described for other vegetal species too, conferring organ specific properties to their function and their expression regulation. In this study, carrot plants transformed to overexpress one of these paralogous genes, *DcPSY1*, will be analyzed.

DcPSY1 gene expression levels correlate with an increase in total carotenoid accumulation in leaves and roots of transgenic plants. Nevertheless, different patterns in

specific carotenoid composition were observed, which are altered between these organs. Leaves, that exhibited higher accumulation of lutein and β -carotene, didn't show any difference in their chlorophyll levels, nor a direct correlation with the expression of other carotenogenic genes. However, roots that had an increase in α and β -carotene levels showed an evident increase in the expression of their genes *DcPSY2*, *DcLCYB1*, *DcLCYB2*, *DcLCYE* y *DcNCED1*. Finally, abiotic stress resistance essays showed no increase in tolerance to damage generated by elevated salt concentrations in transgenic plants. These results suggest a differential role for *DcPSY1* gene in regards to photosynthetic tissue and roots, which helps to better understand the function of this gene in carrots.

Introducción

Los carotenoides son un grupo de pigmentos sintetizados en plantas, algas y algunos microorganismos (fotosintéticos y no fotosintéticos) que abarcan desde el color rojo al amarillo, cuya estructura química se encuentra generalmente formada por una cadena lipofílica acíclica de 40 átomos de carbono compuesta de 8 unidades de isopreno (de 5 carbonos cada una). Hasta la fecha se han reportado más de 750 carotenoides con estructura química diferente [1]. El esqueleto central de estos compuestos da forma a un sistema constituido por hasta 15 enlaces dobles conjugados que son capaces de absorber la luz visible dentro de un rango de 400nm a 600nm, además presentar distintas modificaciones como desaturaciones, ciclaciones en los extremos y la adición de uno o más grupos funcionales [2]. Todos estos pigmentos pueden dividirse en 2 grupos, los carotenos y las xantofilas, estos últimos además de una estructura hidrocarbonada presentan grupos funcionales formados por átomos de oxígeno [3].

En plantas, una de las principales funciones biológicas que cumplen los carotenoides es la de servir como pigmentos accesorios en la absorción de luz durante el proceso fotosintético. Los carotenoides transfieren la energía recolectada en un rango del espectro de luz que no cubren las clorofilas a los complejos cosechadores de la luz [4]. A nivel molecular, algunos carotenoides también pueden actuar como fotoprotectores al disipar el exceso de luz en condiciones de estrés lumínico y de esta manera prevenir la formación descontrolada de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido ($\cdot O_2^-$), y el anión hidroxilo (OH^-), que pueden ser dañinas para la célula. Un desbalance entre la producción de ROS y la capacidad de un sistema biológico para metabolizar estos intermediarios reactivos, o reparar el daño generado por ellos, se conoce en términos generales como estrés oxidativo. En plantas, gran parte de estos ROS son generados durante la fotosíntesis [5] y existen diversos factores como la sequedad del suelo, exceso de salinidad y alta exposición a la luz que pueden llevar a una acumulación excesiva de estos compuestos a nivel celular. Elevadas concentraciones de sal, a través de sus efectos iónicos sobre la membrana celular y la peroxidación de lípidos pueden dañar y afectar directamente a su permeabilidad [6].

También se han descrito mecanismos moleculares a través de los cuales un gran número de xantofilas pueden actuar directamente sobre los ROS o de forma indirecta facilitando la dispersión energética en los fotosistemas [7]. Otra de las funciones importantes que estos pigmentos confieren a las plantas es la de otorgarles en distintos órganos, como las flores, el color característico para estimular a los insectos polinizadores y facilitar su reproducción [8]. Colores reconocidos en gran cantidad de frutos como el amarillo (plátano), anaranjado (naranja) y rojo (tomate) se deben a una acumulación de carotenoides, y cumplen un rol fundamental para el consumo animal y la dispersión de semillas [9]. Finalmente, los carotenoides se han descrito como precursores de las fitohormonas estriogalactonas [10] y el ácido abscísico (ABA). Este último cumple un rol fundamental en el desarrollo y adaptación de la planta, entre los que se incluye la maduración de las semillas, germinación, crecimiento, regulación de los estomas, floración, senescencia y tolerancia a estrés abiótico [11].

Los animales son incapaces de sintetizar estos componentes de gran valor nutricional y por ello deben consumirlos de forma directa a partir de la dieta, donde cumplen funciones esenciales y otorgan muchos beneficios a la salud [12]. Como ejemplo, la síntesis de la vitamina A o retinol se produce a partir del β -caroteno (también conocido como provitamina A), el cual es un nutriente esencial cuya deficiencia puede llevar a producir degeneración macular y ceguera [13]. Además, por sus características antioxidantes, el consumo de estos compuestos se ha relacionado con una posible acción antiinflamatoria y un aumento de la respuesta inmune, junto a la prevención de enfermedades crónicas cardiovasculares, formación de cataratas y algunos tipos de cáncer [14].

En plantas, los carotenoides son sintetizados tanto en tejido expuesto a la luz como a oscuridad, como hojas y raíces respectivamente. La biosíntesis de éstos ocurre en plastidios, donde también son almacenados. La vía carotenogénica ha sido bien estudiada y hoy en día se han descrito prácticamente todos los genes involucrados [15]. Los genes que codifican las enzimas de síntesis de carotenoides se localizan en el genoma nuclear y una vez que las proteínas son sintetizadas, se dirigen a los plastidios como pre-proteínas, donde ocurre el corte proteolítico de su extremo amino-terminal que funciona como la señal de destinación [16]. Los carotenoides, así como otras biomoléculas (tocoferoles, clorofilas, filoquinonas, giberelinas, monoterpenos y

plastoquinonas), son sintetizados a partir de unidades de 5 carbonos de isopentenil difosfato (IPP) y un isómero de doble enlace llamado dimetilalil difosfato (DMAPP) [17]. La adición de 3 moléculas de IPP a DMAPP forman un intermediario de 20 carbonos llamado geranil geranil difosfato (GGPP), que es el precursor de diversos isoprenoides plastidiales incluyendo a los carotenoides [18] (Figura 1). El IPP y DMAPP son sintetizados por dos vías metabólicas presentes en plantas: la vía citosólica (vía del ácido mevalónico, MVA) y la vía plastidial (2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato, MEP) [9]. Sin embargo, la síntesis de carotenoides deriva únicamente de la vía MEP [19].

El primer paso propio de la biosíntesis de carotenoides corresponde a una condensación catalizada por la fitoeno sintasa (PSY) entre 2 moléculas de GGPP para formar el primer carotenoide de la ruta de 40 átomos de carbono llamado fitoeno, que es incoloro (Figura 1). A esta reacción se le conoce como el principal paso limitante [20]. El fitoeno va a ser el precursor de todos los demás carotenoides y se desatura para formar una cadena de doble enlaces conjugados que sirve como el esqueleto de éstos, determinando sus propiedades físicas y biológicas [3]. Las 4 reacciones de desaturación y 2 de isomerización del fitoeno dan como resultado la formación del licopeno, un carotenoide de color rojo con 11 doble enlaces conjugados. Esta serie de desaturaciones son catalizadas en 2 partes, la primera por la enzima fitoeno desaturasa (PDS) que convierte el fitoeno en 9,15,9'-tri-cis- ζ -caroteno, que luego de su isomerización por acción de la enzima ζ -caroteno isomerasa (Z-ISO) [21], sufre una segunda desaturación donde la enzima ζ -caroteno desaturasa (ZDS) forma el pro-licopeno (7,9,7',9-tetra-cis-licopeno) [15]. Finalmente, el prolicopeno es transformado en licopeno (trans-licopeno) por acción de la enzima caroteno isomerasa (CRTISO) [22].

A partir de este punto ocurre una ramificación en la ruta al ciclarse los extremos del licopeno. Si ambas ciclaciones son generadas por la enzima licopeno beta-ciclasa (LCYB) se dará origen al β -caroteno. Por otro lado, si actúan en conjunto la enzima licopeno ϵ -ciclasa (LCYE) con LCYB se dará origen al α -caroteno. Este último es hidroxilado en su anillo ϵ por la caroteno ϵ -hidroxilasa (CHYE) y en su anillo β por la caroteno β -hidroxilasa (CHYB), lo que generará la luteína, una xantófila que es comúnmente almacenada en hojas y flores amarillas [24]. El β -caroteno puede ingresar a la vía de síntesis de estriogalactonas por la acción de enzimas clivadoras de carotenoides (CCDs) [10], o ser hidroxilado por la enzima β -caroteno hidroxilasa (BCHx) para formar

zeaxantina [25]. Luego de una serie de epoxidaciones, llegará a formar diversas xantófilas como violaxantina y neoxantina, que juntas pueden ser utilizadas para la producción de ABA en el citoplasma por acción de la enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) [26] (Figura 1).

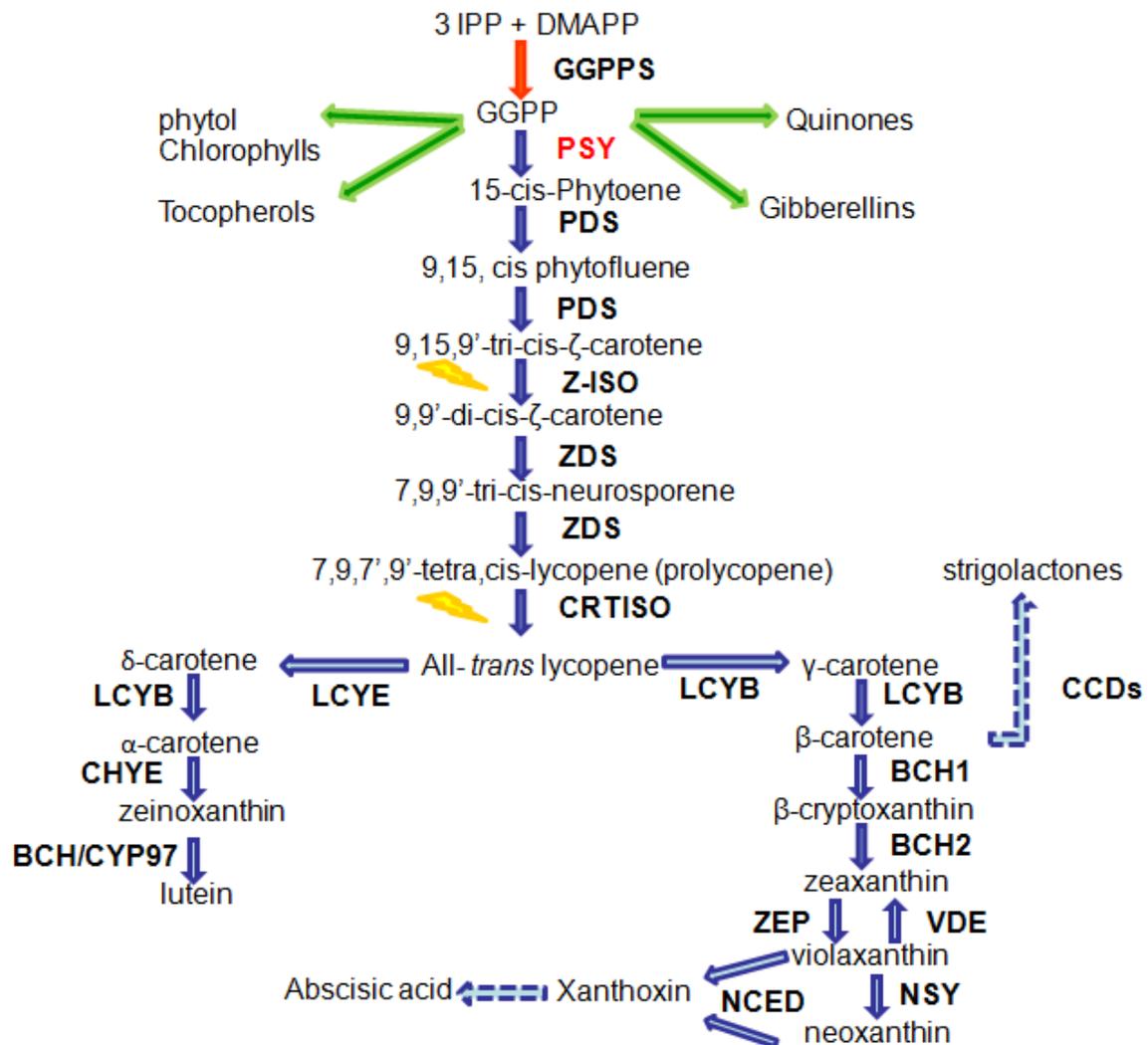


Figura 1. Biosíntesis de carotenoides y rutas metabólicas relacionadas. GGPPS, geranylgeranyl pirofosfato sintasa; PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; Z-ISO, ζ-caroteno isomerasa; ZDS, ζ-caroteno desaturasa; CRTISO, caroteno isomerasa; LCYB, licopeno β-ciclasa; LYCE, licopeno ε-ciclasa; BCHx (CHYB), carotenoide β-hidroxilasa; ZEP, zeaxantina epoxidasa; VDE, violaxantina de-epoxidasa; NSY, neoxantina sintasa; CHYE carotenoide ε-hidroxilasa; CCD, carotenoide dioxigenasa; NCED, epoxicarotenoide dioxigenasa. Figura adaptada de Rosas y Stange, 2016 [27].

Daucus carota es una planta dicotiledónea bianual, capaz de acumular grandes cantidades de carotenoides en su raíz modificada otorgándole el color anaranjado característico, aún en ausencia de luz [28]. Estas características poco comunes, y el hecho que no exista tanto conocimiento de la regulación carotenogénica en raíces, la hacen un modelo de estudio particularmente interesante. Hay una gran variedad de zanahorias que se encuentra representada por el color de sus raíces de reserva desde el amarillo, rojo, naranja, blanco y morado, y esto se debe a los distintos carotenoides que estas acumulan. En la variedad más común (naranja), aproximadamente el 95% de los carotenoides acumulados en la raíz de reserva corresponden a α y β -caroteno [29]. Las raíces de las zanahorias jóvenes son blancas hasta el primer mes de desarrollo, que es cuando empiezan a acumular grandes niveles de carotenoides hasta aproximadamente los 3 meses, lo que se correlaciona con un aumento en la expresión de genes de la ruta carotenogénica [30]. En el tejido fotosintético, los carotenoides (principalmente luteína y β -caroteno) se acumulan en los cloroplastos, donde participan como pigmentos accesorios para contribuir a la absorción de luz y para proteger contra el daño fotooxidativo. En los cromoplastos en cambio, que son plastidios especializados en el almacenamiento de grandes cantidades de carotenoides en tejidos no fotosintéticos como frutos y flores, podemos encontrar un perfil completamente diferente en cuanto a la composición de los carotenoides acumulados. Los cromoplastos se diferencian en la raíz modificada de las zanahorias maduras que crecen bajo tierra y en oscuridad, acumulando hasta 1000 $\mu\text{g/g}$ de tejido seco [31]. Si las raíces se mantienen iluminadas, el desarrollo de los cromoplastos se ve inhibido y se ve estimulada la diferenciación a cloroplastos [2].

La manipulación genética de la ruta carotenogénica ha sido ampliamente utilizada como una herramienta para la investigación y la industria. Debido a las características que los carotenoides representan, se ha mostrado un creciente interés en aprovecharlo para generar plantas capaces de resistir con mayor eficacia condiciones ambientales adversas (estrés salino, alta radiación UV, falta de irrigación, etc.). También se ha buscado aumentar las propiedades nutricionales de varias especies vegetales de consumo humano, como por ejemplo un incremento de los agentes antioxidantes y vitamínicos en plantas que acumulen más carotenoides de lo normal [32]. Hoy en día, los beneficios que representan los carotenoides para la salud son bien reconocidos, principalmente ya que

éstos son precursores de la vitamina A [33], componente esencial para el desarrollo de la visión y el mantenimiento del sistema inmune [34]. La deficiencia de vitamina A (VAD) se ha reconocido como un problema de salud pública en países que se encuentran aún en desarrollo [35], impulsando el estudio y el uso de la bioingeniería como una potencial estrategia para la fortificación de alimentos y la obtención de cultivos que acumulen más carotenoides.

Uno de los puntos a tener en cuenta al momento de manipular artificialmente una vía metabólica, es que existen otras rutas enzimáticas que pueden estar compartiendo uno o más metabolitos. Éste es el caso de los carotenoides, donde su precursor también puede ser destinado para la síntesis de otros compuestos isoprenoides (Figura 1). De esta manera, aumenta la complejidad de dicha manipulación ya que se debe tener en cuenta cómo se verá afectado el flujo metabólico de otras vías esenciales para el desarrollo debido a la biodisponibilidad de uno o más componentes. A pesar de esto, hasta la fecha se ha logrado la alteración exitosa de la ruta carotenogénica en varias plantas como el arroz dorado y la naranja dorada, permitiendo el incremento del valor nutricional de los cultivos y el de su resistencia a estrés abiótico [36] [37].

La sobreexpresión de alguna de las enzimas de esta vía de síntesis se encuentra entre las estrategias más utilizadas, principalmente la fitoeno sintasa (PSY). Debido a que esta enzima es la primera de la ruta y su sustrato es el mismo utilizado por otras vías metabólicas, su sobreexpresión va a permitir dirigir de forma irreversible la síntesis hacia los carotenoides [38]. Al sobreexpresar el gen *PSY* endógeno en *Arabidopsis thaliana*, se registró un aumento en los niveles de carotenoides de 10 veces en callos y de hasta 100 veces en raíz [39]. También el expresar dicho gen con un promotor específico para semilla, se obtuvieron plantas transgénicas productoras de semillas con elevados niveles de carotenoides [40]. Si bien sólo hay un gen para la enzima PSY en el organismo modelo *A. thaliana*, en otras especies se han reportado más de uno, como en tabaco, maíz, tomate y arroz [41] [42] [43]. Estos genes parálogos pueden presentar una función órgano-específica, como en el caso del tomate donde el gen *PSY1* se expresa sólo en los frutos, mientras que el gen *PSY2* se expresa y es responsable de la síntesis de carotenoides en hojas y flores [44], y el gen *PSY3* se expresa en la raíz [45]. Existen otros factores que pueden regular la expresión diferencial de estos genes parálogos. En el caso del arroz y maíz por ejemplo, donde también se han descrito tres genes *PSY*, la expresión

del gen *PSY1* y *PSY2* es inducida por luz en órganos fotosintéticos, mientras que *PSY3* aumenta su expresión bajo condiciones de estrés hídrico y tratamientos con ABA [46]. En *Daucus carota* existen 2 genes parálogos, *PSY1* y *PSY2*, los que codifican proteínas con localización plastidial y presentan una expresión diferencial en hojas respecto al estado de desarrollo en que se encuentren, viéndose un aumento de la expresión de *PSY1* en hojas maduras y de *PSY2* en hojas jóvenes de aproximadamente 4 semanas de edad. En raíz, ambos genes presentan un aumento de su expresión en plantas maduras, pero este aumento es mucho más pronunciado para el gen *PSY2* [31]. Esto sugiere, que en zanahorias estos genes no sólo responden a funciones biológicas para distintas etapas del desarrollo de la planta, sino que también cumplen una función órgano-específica.

Se ha reportado que en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* que sobreexpresan los genes *DcPSY1* y *DcPSY2* hay una mayor acumulación de carotenoides totales [47], lo que demuestra la funcionalidad de estos genes. También se ha visto en la misma especie que al sobreexpresar *DcPSY1* y *DcPSY2* se obtienen plantas con una mayor resistencia a estrés salino [48], y que la expresión del segundo pero no el primero se induce por ABA y elevadas concentraciones de sal. La caracterización funcional del promotor de *DcPSY2*, donde se encuentran elementos de respuesta a ABA (motivos ABRE), muestra que es activado por ABA y que factores de transcripción de la familia AREB, inducidos por ABA, se unen a él [49].

Este trabajo busca responder a la interrogante de cómo afecta la sobreexpresión de *DcPSY1* en la cantidad total y composición de carotenoides comparando hojas y raíces de reserva de zanahorias maduras, y cómo se ve regulada la expresión de los demás genes involucrados en la síntesis de carotenoides. Considerando que la expresión de este gen se asocia principalmente a órganos ricos en cloroplastos, se espera que su sobreexpresión al menos altere de forma positiva la acumulación de carotenoides en hojas, y posiblemente también la de la raíz de reserva. Adicionalmente, se estudiarán potenciales efectos generados en la resistencia a condiciones de estrés abiótico.

Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis

Plantas transgénicas de *Daucus carota* que sobreexpresan el gen *DcPSY1* acumulan mayores niveles de carotenoides totales en hojas y raíz de reserva. También presentan una alterada acumulación de transcritos de otros genes que codifican proteínas asociadas a la síntesis de carotenoides y mayor tolerancia a estrés salino.

3.2 Objetivo general

Determinar si la sobreexpresión del gen *DcPSY1* en *D. carota* aumenta la abundancia de carotenoides en hojas y raíz de reserva, modula la expresión relativa de otros genes carotenogénicos y propicia una mayor tolerancia a estrés salino.

3.3 Objetivos específicos

- 1) Seleccionar las líneas transgénicas de *D. carota* que sobreexpresen el gen *DcPSY1* mediante el análisis molecular de las plantas transformantes.
- 2) Determinar los niveles de los carotenoides totales y la composición de los carotenoides específicos en hojas y raíces de reserva de las líneas transgénicas *DcPSY1* adultas.
- 3) Evaluar la expresión del transgén y de los genes *DcPSY2*, *DcLCYB1*, *DcLCYB2*, *DcLCYE* y *DcNCED1* en hojas y raíces de reserva de las líneas transgénicas adultas.
- 4) Determinar la tolerancia a estrés abiótico en plantas transgénicas *DcPSY1*

Materiales y Métodos

4.1 Material biológico

Se utilizaron plantas de *Daucus carota* variedad Nantes (naranjas), cuyas semillas fueron obtenidas comercialmente y cultivadas *in vitro* y en tierra. Las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *DcPsy1* fueron generadas en el laboratorio en trabajos previos a partir de la transformación de explantes con *Agrobacterium tumefaciens* y el vector pGWB2-DcPSY1 [55] (Figura 2).

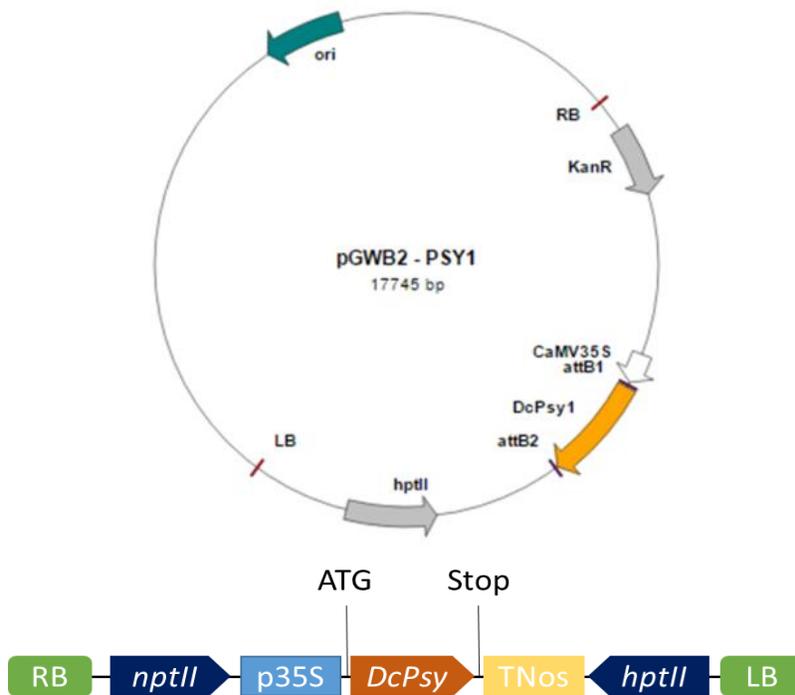


Figura 2. Esquema del vector pGWB2-PSY1. El vector de expresión presenta un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a higromicina (*hptII*), un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a kanamicina (*nptII*), el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (de expresión constitutiva) junto a la secuencia del gen *DcPsy1*, flanqueados por los sitios RB y LB reconocidos por *Agrobacterium tumefaciens* para la inserción en el genoma vegetal.

4.2 Reactivos

Los reactivos necesarios para desarrollar las distintas técnicas de biología molecular fueron obtenidas de entidades comerciales como Invitrogen, Fermentas, Promega, BioRad, Merck, Stratagene y Sigma-Aldrich.

4.3 Termociclador acoplado a un sistema óptico de detección

El equipo utilizado para hacer los experimentos de qRT-PCR corresponde a un termociclador Mx3005P™ (Stratagene), el cual posee un sistema óptico compuesto por una lámpara halógena de cuarzo-tungsteno y un único tubo fotomultiplicador (PMT), además de incluir cinco filtros que permiten una separación óptima entre las sondas. Este equipo entrega una alta resolución de datos al utilizar la sonda SYBR® Green. El software incorporado permite la visualización de los datos en múltiples formatos (gráficos de amplificación, intensidad de fluorescencia, reportes de texto y curvas de disociación, entre otros), lo cual facilita un análisis eficaz de la validez de los datos, así como de la amplificación específica.

4.4 Partidores

Los partidores utilizados en este trabajo fueron diseñados previamente por miembros del CBMV y sintetizados por ADT&IDT (Promega). Éstos fueron analizados mediante el programa OligoAnalyzer para verificar la temperatura de disociación y descartar la presencia de homo y heterodímeros. Las características de los partidores empleados se detallan a continuación (Tabla 1).

Tabla 1: Lista de los partidores utilizados. F = sentido (*forward*) y R = antisentido (*reverse*).

Partidor	Secuencia (5' -> 3')	Tm (°C)	Descripción
Lcyb1-F	GGGTTAGCGGTAGCACAAC	61	Fragmento del gen <i>DcLcyb1</i> usado como control de calidad del DNA y cDNA
Lcyb1-R	GAGGGAGTACAGGCAGAGG		

HptII-F	TTTGTGTACGCCCCGACAGTC	58	Fragmento del transgén <i>hptII</i> , marcador de selección
HptII-R	AAGACCTGCCTGAAACCGAAC		
qUbi-F	GCTCGAGGACGGCAGAAC	58	Fragmento del gen <i>DcUbiquitina</i> usado como normalizador para qPCR
qUbi-R	CTTGGGCTTGGTGTAGGTCTTC		
qPsy1-F	ATCGGTGTGGCGAAGTTTGT	57	Fragmento del gen <i>DcPSY1</i> usado para qPCR
qPsy1-R	CAAGAGCCTTGGGCGTGATA		
qPsy2-F	GCTAATAAACTTCCGTGGGTGTTC	56	Fragmento del gen <i>DcPSY2</i> usado para qPCR
qPsy2-R	GCTGGAGTTAGTGCTACCC		
qLcyb1-F	TGAGTGCAGCTTACACCTACTTGATTA	54	Fragmento del gen <i>DcLCYB1</i> usado para qPCR
qLcyb1-R	AACTGCAGAAGATATTGGAGA		
qLcyb2-F	GCTTGCGATGCTTAGCTTGCTCACT	59	Fragmento del gen <i>DcLCYB2</i> usado para qPCR
qLcyb2-R	CAATACCACCATTACCAACTCCC		
qLcye-F	CCCAGAACTTCTACACAATCTCCACC	59	Fragmento del gen <i>DcLCYE</i> usado para qPCR
qLcye-R	CCCACAACCTCACCTTCACATTACTCC		
qNced1-F	CTCCTCTCCTCACTTGCCTTCTCAC	60	Fragmento del gen <i>DcNCED1</i> usado para qPCR
qNced1-R	GTTGTGCTCGATTTGTTTGGGGAG		
Oligo AP	CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	61	Usado para la síntesis de cDNA en RT-PCR

4.5 Extracción y cuantificación de DNA genómico

Se extrajo tejido vegetal de las hojas de plantas transformantes de *D. carota* que llevaban 3 meses de crecimiento en tierra. Se utilizó un protocolo modificado de otro descrito previamente [51]. Se molieron aproximadamente 100 mg de hoja en presencia de nitrógeno líquido en morteros previamente esterilizados y enfriados. Se agregaron 700 μ L de *buffer* CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) 2%, NaCl 1,4M, EDTA 20mM y Tris 100mM pH 8) previamente calentado a 60°C, se homogenizó con el tejido vegetal y se traspasó la mezcla obtenida a un tubo Eppendorf de 2 mL. Luego, se adicionaron 5 μ L de β -mercaptoetanol y se incubó durante 15 min a 60°C con agitación cada 5 min. Se agregó 1 volumen de una solución enfriada a -20°C de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló en vórtex brevemente y se centrifugó a 10.000 g durante 10 min. La fase acuosa superior donde se encuentra el DNA se traspasó a un nuevo tubo y se precipitó con un volumen de isopropanol frío durante 30 min a -20°C. Se centrifugó a 10.000 g durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol 75% hasta hacerlo flotar. Se volvió a centrifugar a 10.000 g durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, el DNA se secó a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 min y se resuspendió en 30 μ L de agua libre de nucleasas. Por último, se determinó la concentración del DNA y la razón de absorbancia a distintas longitudes de onda (260/280 y 260/230) en un espectrofotómetro *NanoDrop*. El índice 260/280 se utiliza para determinar una posible contaminación con proteínas en una muestra de DNA, cuyo valor debiese encontrarse entre 1,8 y 2,1. El índice 260/230 se utiliza para determinar contaminación con compuestos fenólicos y algunas sales, y para un DNA puro su valor debería encontrarse entre 2,0 y 2,2.

4.6 Extracción de RNA

Se recolectó el tejido (hojas y raíz de reserva) de las plantas transformantes de aproximadamente 6 meses de edad crecidas en condiciones de invernadero (fotoperíodo de 16 horas de luz y a 22°C). Cada réplica biológica se obtuvo a partir de un pool de hojas o raíces de reserva provenientes de la misma línea. La extracción de RNA vegetal se realizó utilizando un protocolo a base de CTAB modificado [50]. Alrededor de 150 mg de tejido fueron pulverizados en morteros estériles y fríos, en presencia de nitrógeno

líquido. Luego, se agregó 800 μ L de *buffer* CTAB (CTAB al 2%, polivinipirrolidona al 2%, NaCl 2M, EDTA 25mM, Tris-HCl 100mM pH 8 y trihidroclorato de espermidina al 0,05%) + 25 μ L de β -mercaptoetanol previamente calentado a 65°C. La solución se mezcló en el mortero junto al tejido y se traspasó el homogenizado a un tubo Eppendorf de 2 mL para posteriormente incubar la mezcla durante 15-20 min a 65°C con agitación en *thermoblock*. Se agregó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) enfriado a -20°C y se mezcló por inversión, tras lo cual se centrifugó a 12.000 g por 15 min a 4°C. Se recuperó todo el sobrenadante correspondiente a la fase acuosa en un nuevo tubo de 2 mL, cuidando de no tomar parte de la fase orgánica, y se agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) frío equivalente al volumen rescatado, mezclando por inversión para facilitar la homogenización. Se centrifugó nuevamente a 12.000 g durante 15 min a 4°C. Una vez terminada la centrifugación, se recuperó el sobrenadante en un tubo de 1,5 mL y se mezcló suavemente con 1/4 de volumen de LiCl 10M frío para precipitar el RNA durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado obtenido con 1 mL de etanol 70% v/v frío en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Se agitó suavemente hasta hacer flotar el precipitado y luego se centrifugó a 12.000 g por 10 min a 4°C. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el precipitado de RNA fue secado con el tubo invertido a temperatura ambiente y resuspendido en 30 μ L de agua tratada con DEPC precalentada a 65°C. Después de finalizar con la extracción del RNA se verificó su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa, donde se observó la presencia de las bandas generadas por el RNA ribosomal, comprobándose que éste no estuviera degradado. También se determinó su concentración en un espectrofotómetro *NanoDrop* y las razones de absorbancia a 260/280 y 260/230, indicadoras de la pureza del RNA con respecto a la posible contaminación con proteínas y a la presencia de distintas sales o solventes, respectivamente.

4.7 Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis se realizó a 90V para muestras de DNA y a 70V para muestras de RNA durante aproximadamente 60 min. Los geles fueron preparados al 1-2% p/v (según el tamaño esperado de las bandas) con una solución de TAE (Tris-acetato 40mM y EDTA

1mM, pH 8), y las muestras fueron cargadas junto a un *buffer* de carga (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xylen cyanol, 15% glicerol), en proporción 5:1. Posteriormente, los geles de agarosa se tiñeron durante 20-40 min con una solución de bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz UV en un transiluminador (SYNGENE).

4.8 PCR convencional

Se realizó PCR utilizando las extracciones de DNA genómico como templado para verificar la transformación de las plantas de *D. carota* con el vector pGWB2-PSY1. Primero, se amplificó una región de 764 pb del gen endógeno *DcLCYB1*, para así corroborar la integridad de cada extracción. Luego, se amplificó un fragmento de 624 pb del gen que codifica la proteína que otorga resistencia a higromicina (*hptII*), que es el marcador de selección de las plantas transformantes. Cada una de las reacciones se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL, compuesto por 1 µL de DNA genómico (100 mg), 1 U de enzima Taq DNA polimerasa (New England Biolabs), 2,5 µL de PCR *buffer* 10x, 0,5 µL de dNTPs 10mM, 0,5 µL de partidor forward 10mM, 0,5 µL de partidor reverse 10mM y 19,8 µL de agua libre de nucleasas. Para cada reacción se realizó un control negativo sin DNA. Como control positivo se utilizó una muestra de cDNA previamente verificada. Finalmente, el tamaño de cada uno de los productos de PCR obtenidos fue verificado en geles de agarosa. Las secuencias de los partidores y los programas de PCR empleados se detallan en la tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 2. Programa de amplificación para PCR a partir del DNA genómico de *Daucus carota*. Los programas fueron utilizados para la amplificación de un fragmento del gen endógeno *DcLCYB1* y del gen *hptII*.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	94	3 min	1
Denaturación	94	40 seg	34
Hibridación	53/54 (<i>DcLCYB1/hptII</i>)	50 seg	
Extensión	72	50 seg	
Extensión final	72	10 min	1

4.9 Transcripción reversa y PCR

Para generar el cDNA a partir del mRNA, se llevó a cabo una reacción de transcripción reversa utilizando la enzima RT-Impron II (Promega). Primero, para eliminar posibles restos de DNA genómico que se obtuvieron durante el proceso de extracción, se realizó un tratamiento con la enzima DNasa I. Para esto, 7 µg de RNA de alta pureza fueron mezclados con 50 U (1 µL) de DNasa I (Fermentas), 40 U (1 µL) del inhibidor de RNasa Ribolock (Fermentas) y 2 µL de *buffer* de DNasa I 10x, completando un volumen total de 20 µL en agua libre de nucleasas. La reacción se incubó durante 35 min a 37°C en un termociclador, para luego ponerla en hielo y agregar 2 µL de EDTA 25µM para detener la reacción. Finalmente, se incubó a 65°C durante 10 min para inactivar a la enzima. Para sintetizar el cDNA, se tomaron 9,5 µL del RNA tratado con DNasa I (3,17 µg) y se incubaron con 3 µL de oligo AP 10mM (Tabla 1) en tubos de 0,2 mL durante 5 min a 70°C, como se muestra en el programa de RT-PCR (Tabla 3). Luego, se detuvo el programa y las muestras fueron incubadas en hielo durante 5 min, agregando a cada uno de los tubos 37,5 µL del mix RT previamente preparado (10 µL de *buffer* 5x de la RT Improm II (Promega), 3 µL de la enzima RT Improm II (Promega), 1,2 µL (40 U) de Inhibidor de RNasa Ribolock (Fermentas), 2,5 µL (0,5mM) dNTPs 10mM , 13,2 µL (6,6mM) de MgCl₂ 25mM y 7,6 µL de agua libre de nucleasas/DEPC). Finalmente, se continuó con el programa de RT-PCR obteniendo 50 µL de cDNA. Para verificar la correcta síntesis de cDNA, se realizó un PCR convencional a cada muestra utilizando partidores de un gen endógeno y se incluyó un control negativo para cada una, en el que se utilizó como templado 1 µL de RNA proveniente del tratamiento con DNasa I. Con esto se aseguró que no hubiera contaminación con DNA genómico en las muestras a las cuales se les realizó el RT-PCR.

Tabla 3. Programa de temperatura para RT-PCR.

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

4.10 RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR)

La cuantificación de los niveles de expresión de los genes estudiados se realizó mediante qRT-PCR, utilizando la sonda fluorescente SYBR green. Los distintos partidores utilizados fueron diseñados y en su mayoría validados (incluidos los cálculos de eficiencia) en trabajos previos (Tabla 1). Cada reacción del qRT-PCR estaba compuesta por 10 µL de un *Master Mix* (que contiene la Taq DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y la sonda SYBR green), 0,5 µL del partidor *forward*, 0,5 µL del partidor *reverse*, 0,3 µL de una dilución 1:500 de la sonda ROX, 4 µL de cDNA (10 µg) previamente diluido y 4,7 µL de agua libre de nucleasas para completar 20 µL de reacción. El programa de temperaturas para la realización del qRT-PCR se detalla en la Tabla 4, el cual fue el mismo para cada par de partidores utilizado. Se incluyó un control negativo con agua libre de nucleasas en vez de cDNA para cada pareja de partidores empleado y todas las reacciones se llevaron a cabo en tres réplicas biológicas y al menos en duplicado técnico. Luego de cada programa de amplificación se realizó una curva de disociación, consistente en la medición de la fluorescencia durante la denaturación y renaturación del producto de PCR (Tabla 4). La presencia de un único *peak* (único producto) al graficar una curva de fluorescencia v/s temperatura es indicativo de la especificidad de la reacción y los partidores utilizados. Todas las cuantificaciones realizadas en este estudio fueron calculadas de forma relativa a un “control” o calibrador, que corresponde a una condición de expresión basal, como en el caso de las plantas silvestres (*wild type*). También se normalizaron los datos frente a los niveles de expresión de un gen de expresión constitutiva en las plantas (*housekeeping*) como el que codifica la ubiquitina, con el fin de eliminar posibles diferencias en los valores obtenidos debido a una variación en la concentración o calidad del cDNA de las distintas muestras. Para determinar la expresión relativa de cada gen se utilizó la siguiente fórmula [52]:

$$Razón = \frac{(E \text{ gen objetivo}) * e^{-(Ct \text{ gen objetivo} - Ct \text{ calibrador gen objetivo})}}{(E \text{ gen normalizador}) * e^{-(Ct \text{ gen normalizador} - Ct \text{ calibrador gen normalizador})}}$$

* E = eficiencia ; Ct = ciclo umbral

Tabla 4. Programa de temperatura para RT-PCR cuantitativo.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación	25	5 seg	1
	95	10 min	
Amplificación	95	15 seg	50
	60	15 seg	
	72	15 seg	
Disociación	95	1 min	1
	60	30 seg	
	95	30 seg	

4.11 Determinación de la eficiencia de los partidores

Para determinar la eficiencia de los partidores para amplificar *DcNCED1*, el producto obtenido de la amplificación del gen *DcNCED1* mediante PCR convencional fue usado para realizar cinco diluciones seriadas (1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000), utilizando agua libre de nucleasas. Con estas diluciones, se realizaron los ensayos de qRT-PCR utilizando el protocolo antes mencionado. La eficiencia (E) de los partidores se obtuvo a partir de la pendiente de la recta obtenida al graficar el ciclo umbral (Ct) de cada dilución v/s el número de dilución. La siguiente ecuación explica cómo se obtiene la eficiencia de cada par de partidores:

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

4.12 Extracción de pigmentos

Por cada una de las líneas analizadas se tomaron 100 mg de tejido de hojas de similar tamaño y edad, así como de la región superior de la raíz de reserva. El tejido recolectado fue macerado en un mortero previamente esterilizado y frío en presencia de nitrógeno líquido. Posteriormente, se agregó 4 mL de una solución de hexano/acetona/etanol (2/1/1 v/v) para homogeneizar y arrastrar todo el tejido. El homogeneizado se traspasó a tubos Falcon de 15 mL, se agitó en vórtex durante 2 min y se mantuvo en hielo y oscuridad por otros 2 min. Luego, se centrifugó a 10.000 rpm por

10 min a 4°C. Los carotenoides se recuperaron de la fase líquida superior, recolectándolos en otro tubo Falcon de 15 mL. Finalmente, la solución que contenía los pigmentos extraídos fue secada con nitrógeno gaseoso y resuspendida en 2 mL de acetona para su posterior análisis mediante espectrofotometría y HPLC. Todo el proceso de extracción se realizó en oscuridad y hielo para evitar la degradación de los carotenoides, realizándolo por triplicado para cada una de las líneas.

4.13 Cuantificación de pigmentos totales

Las muestras resuspendidas en 2 mL de acetona y agitadas hasta homogeneizar fueron usadas para medir por espectrofotometría la absorbancia utilizando una cubeta de cuarzo. Para determinar la dilución adecuada de la muestra en la que deben hacerse las mediciones, los valores de absorbancia deben registrarse entre 0,3 y 0,9 (rango lineal de la curva). La medición de absorbancias a 470, 645 y 662 nm permite cuantificar los niveles de los carotenoides totales, clorofila b y clorofila a respectivamente al presentarse en estos valores el *peak* de su absorbancia (Figura 3). Para determinar la turbidez de la muestra se midió a una longitud de onda de 750 nm. La absorbancia a 750 nm debe ser cero, puesto que ni los carotenoides ni las clorofilas absorben en esta región. A partir de estas mediciones se determinó la concentración de cada uno de los pigmentos mencionados, mediante las ecuaciones descritas por Lichtenthaler y Buschmann [53]:

$$Ca(ug/mL) = 11,24 * A662 - 2,04 * A645$$

$$Cb(ug/mL) = 20,13 * A645 - 4,19 * A662$$

$$Ct(ug/mL) = (1000 * A470 - 1,9 * Ca - 63,14 * Cb)/214$$

* Ca = Clorofila a ; Cb = Clorofila b ; Ct = carotenoides totales ; A = absorbancia

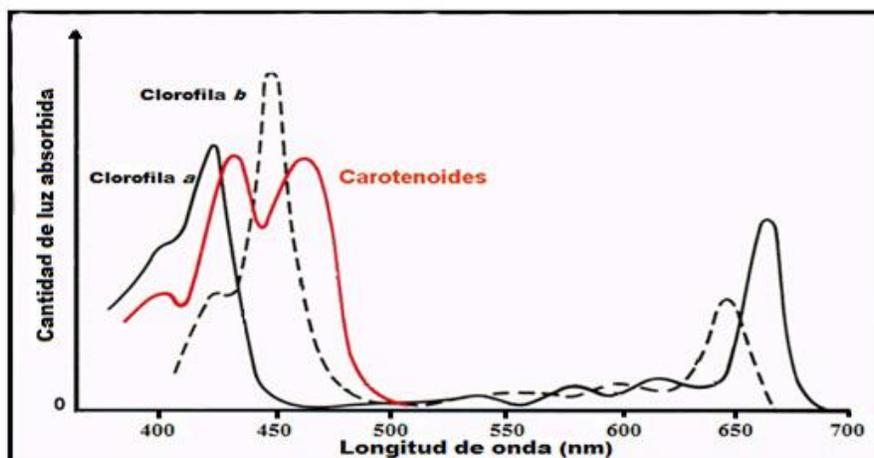


Figura 3. Espectro de absorción de clorofila a, clorofila b y carotenoides. Se observa la longitud de onda en la que se encuentran los *peaks* de absorción de los pigmentos analizados en este estudio. Se logra ver cómo contribuye parcialmente la absorción de las clorofilas en la cuantificación de los carotenoides totales a 470 nm.

4.14 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Para determinar el perfil de los carotenoides presentes en las muestras de pigmentos extraídos de hojas y raíces de *D. carota*, se utilizaron 20 μL de cada una de las muestras resuspendidas en acetona para su análisis mediante HPLC en fase reversa. La separación de pigmentos se realizó en un equipo HPLC Shimadzu (LC-10AT) con detector de arreglo de diodos, equipado con una columna Lichrocart RP-18 (Merck), y utilizando como fase móvil una solución de acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5 v/v/v). Las muestras se corrieron a un flujo isocrático de 1,5 mL/min a temperatura ambiente durante 30 minutos y se visualizaron en el espectro de los 470 nm.

4.15 Determinación de la composición de los carotenoides

Cada uno de los carotenoides fue identificado según su tiempo de retención y espectro de absorción, luego de comparar los valores obtenidos con estándares específicos descritos previamente en un *handbook* de carotenoides [54]. Los resultados fueron analizados utilizando el programa computacional LC-Solutions, con el cual se

determinó la cantidad relativa de cada carotenoide como el área bajo la curva de cada *peak*. Mediante el análisis de los cromatogramas obtenidos a una longitud de onda de 470 nm, se determinó la concentración de los principales compuestos carotenoides y clorofilas presentes en las muestras. Se consideró que la suma de las áreas bajo la curva generada por los *peaks* de luteína, α -caroteno, β -caroteno y otros carotenoides observados en los cromatogramas, corresponde a la concentración de carotenoides totales calculada anteriormente por espectrofotometría. De esta forma, la concentración de cada carotenoide se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Cx = Ct \cdot Ax / At$$

* Cx = concentración del pigmento ; Ct = concentración de carotenoides totales ;
Ax = área del *peak* del pigmento ; At = suma de las áreas de todos los *peaks*

4.16 Ensayo de fuga electrolítica

Para evaluar el daño en la membrana celular generado por el estrés salino, 100 mg de hojas de las líneas de *D. carota* fueron sometidas a un tratamiento agudo con una solución de NaCl 250mM durante 20 horas, incluyendo un control sólo con agua destilada por cada muestra. Las hojas fueron lavadas con agua desionizada a temperatura ambiente para quitar impurezas antes del tratamiento, y una vez finalizado se lavaron con agua desionizada nuevamente para eliminar remanentes de sal. Después, se secaron con papel absorbente antes de traspasarlas a un vaso precipitado con agua desionizada, donde se midió la conductividad eléctrica con un conductímetro. Las mediciones se realizaron antes de traspasar las hojas (C_i) y a los 60 minutos (C_t) posteriores al traspaso. Finalmente, el vaso precipitado fue autoclavado y se midió la conductividad total (C_t) una vez que las muestras alcanzaron la temperatura ambiente. La fuga de electrolitos, que es directamente proporcional al daño en la membrana celular y su permeabilidad, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$Fuga\ electrolítica = \frac{(C_f - C_i)}{(C_t - C_i)} \times 100$$

Resultados

5.1 Selección de plantas transgénicas de *Daucus carota* transformadas con el gen *DcPSY1*

Una vez obtenidas las plantas transformadas con el vector pGWB2-PSY1, fue necesario comprobar que éstas fueran transgénicas para continuar con los experimentos propuestos. A pesar que las líneas fueron crecidas *in vitro* en presencia de higromicina, el agente de selección cuyo determinante de resistencia estaba codificado en el *cassette* de expresión, existe la posibilidad de tener falsos positivos, plantas que aún sin tener el inserto logren desarrollarse bajo estas condiciones. Se extrajo el DNA genómico de las 17 líneas transformantes y una línea *wild type* para analizar mediante PCR la presencia del gen *hptII* (confiere resistencia a higromicina). Una vez extraído el DNA, se cuantificó cada una de las muestras usando un espectrofotómetro *NanoDrop* y se verificó la pureza de cada extracción. Se evidenció así que el material genético obtenido tenía calidad óptima (Tabla 5) para ser usado en las amplificaciones por PCR. Las muestras fueron diluidas entre 10 y 50 veces para trabajar con aproximadamente 100ng de DNA por reacción de PCR, con el fin de evitar la inhibición de la enzima a causa de altas concentraciones de templado. Para verificar la integridad del DNA extraído, se amplificó un fragmento relativamente largo (764 pb) del gen endógeno *DcLCYB1* que codifica la enzima licopeno β -ciclase, involucrada en la biosíntesis del α y β -caroteno. Finalmente, para verificar la transgenie de las líneas, se amplificó un fragmento de 624 pb del gen *hptII* que codifica la proteína que confiere resistencia a higromicina, presente en el *cassette* junto al gen *DcPSY1* que se insertó dentro del genoma. De las 17 plantas analizadas, 16 dieron positivo para la amplificación del gen *DcLCYB1* (Figura 4) y estas mismas 16 líneas también dieron positivo para la amplificación del gen *hptII* (Figura 5). Es decir que las 16 plantas son transgénicas, lo que fue confirmado con el análisis de la línea *wild type* (control negativo) en la que solo logró amplificarse el gen *DcLCYB1* y no el gen *hptII*. La línea que no amplificó el segmento del gen *hptII* tampoco amplificó el de *DcLCYB1*, por lo que no se puede descartar como una línea transgénica y se concluye que los resultados

negativos se deben a una falla durante el proceso de extracción o de las condiciones del PCR.

Tabla 5. Concentración del DNA genómico extraído de cada línea transformante para *DcPSY1*. El índice de absorbancia a una longitud de onda de 260/280 indica la pureza respecto a contaminación con proteínas y de 260/230 es indicador de la pureza respecto a contaminación con compuestos fenólicos. Las líneas 1-17 corresponden a las plantas transformadas con el vector pGWB2-PSY1 y la Wt corresponde a una planta silvestre como control negativo.

Línea	Concentración (µg/µl)	Absorbancia λ260/λ280	Absorbancia λ260/λ230
L1	5,5	1,5	1,5
L2	2,0	2,2	2,0
L3	3,3	2,1	2,1
L4	2,8	2,1	2,1
L5	3,3	2,0	2,1
L6	2,3	2,1	2,1
L7	2,7	2,1	2,1
L8	2,1	2,1	2,1
L9	2,9	2,1	2,1
L10	1,9	2,2	2,2
L11	1,4	2,1	2,0
L12	1,1	2,0	1,8
L13	5,0	1,5	1,5
L14	2,3	2,0	1,9
L15	1,9	2,2	2,2
L16	2,8	2,1	2,1
L17	1,3	2,1	1,8
Wt	2,2	2,1	2,1

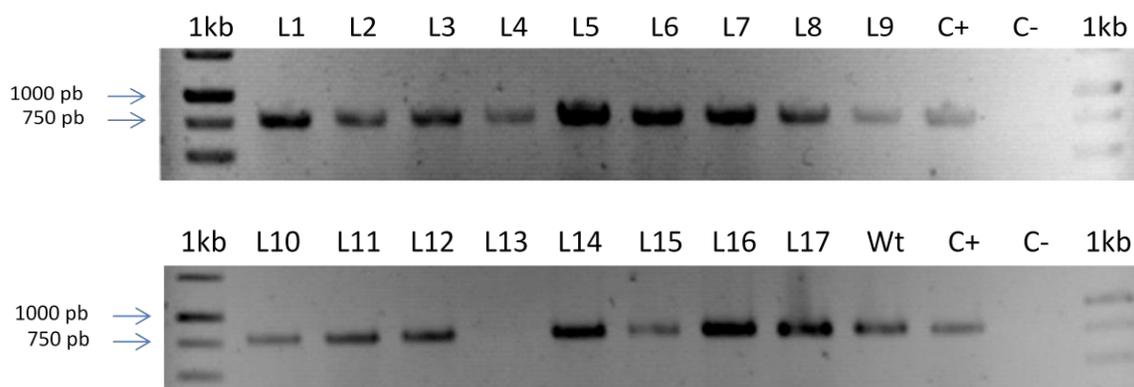


Figura 4. Amplificación de un fragmento del gen *DcLCYB1* a partir de DNA genómico de las plantas transformantes. Los carriles marcados desde L1 hasta L17 corresponden a las líneas transformadas con el vector pGWB2-PSY1 y el carril Wt a una planta silvestre. El control positivo (C+) corresponde al cDNA previamente verificado de *D. carota wild type*. El tamaño del fragmento amplificado debe ser de 764 pb. El control negativo (C-) corresponde a una reacción de PCR en ausencia de templado. El estándar de peso molecular (1kb) corresponde al marcador GeneRuler™ 1kb DNA Ladder.

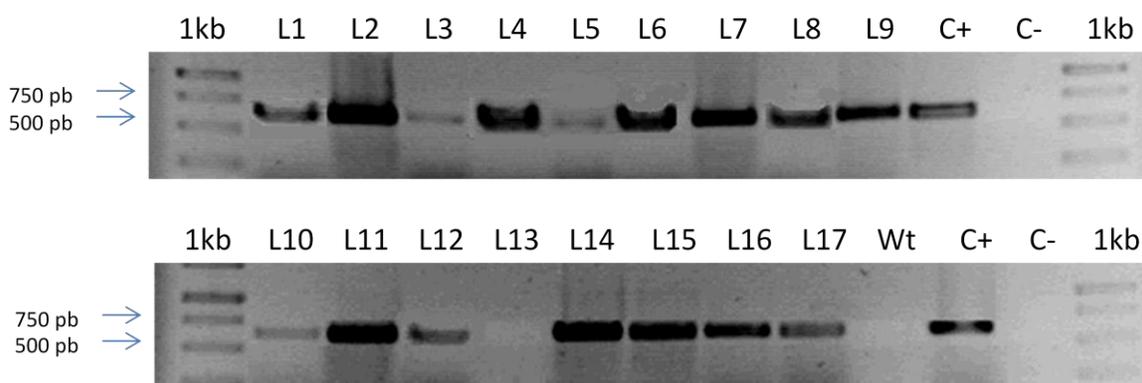


Figura 5. Amplificación de un fragmento del gen *hptII* a partir de DNA genómico de las plantas transformantes. Los carriles marcados desde L1 hasta L17 corresponden a las líneas transformadas con el vector pGWB2-PSY1, y el carril Wt a una planta silvestre. El control positivo (C+) corresponde al vector pGWB2 que posee el marcador de selección *hptII*. El tamaño del fragmento amplificado debe ser de 624 pb. El control negativo (C-) corresponde a una reacción de PCR en ausencia de templado. El marcador de peso molecular (1kb) corresponde al marcador GeneRuler™ 1kb DNA Ladder.

5.2 Cuantificación de carotenoides totales mediante espectrofotometría

Se cuantificó y determinó la composición de carotenoides en las líneas transgénicas para evaluar el efecto producido al sobreexpresar el gen *PSY1* de *D. carota*. Para ello, se extrajo los pigmentos a partir de las hojas de 14 de las líneas y los carotenoides totales fueron cuantificados mediante espectrofotometría (Figura 6). Todas las líneas transgénicas analizadas presentaron una mayor o igual acumulación de carotenoides respecto a la línea *wild type*, por lo que se seleccionaron 6 líneas (L1, L5, L7, L9, L11 y L12) representativas que presentaran los niveles más elevados para hacer las mediciones posteriores. A estas líneas transgénicas seleccionadas se les extrajeron sus pigmentos desde las raíces y se midió la concentración de carotenoides totales. Se obtuvo como resultado que las 6 líneas seleccionadas presentaron una mayor acumulación de carotenoides totales en raíces, al igual que lo que se había observado en las hojas de las mismas líneas (Figura 7). A partir de estos experimentos, se obtuvieron aproximadamente entre 1,5 y 1,8 veces los niveles de carotenoides totales en las hojas y entre 1,3 y 1,7 veces en las raíces de reserva respecto a las plantas *wild type*, que presentan en promedio 220 µg/g de tejido seco en hojas y de 1500 µg/g de tejido seco en raíz de reserva. En el grupo de las líneas seleccionadas se destaca la L12, que presentó 2,5 veces la cantidad de carotenoides totales en raíz de reserva.

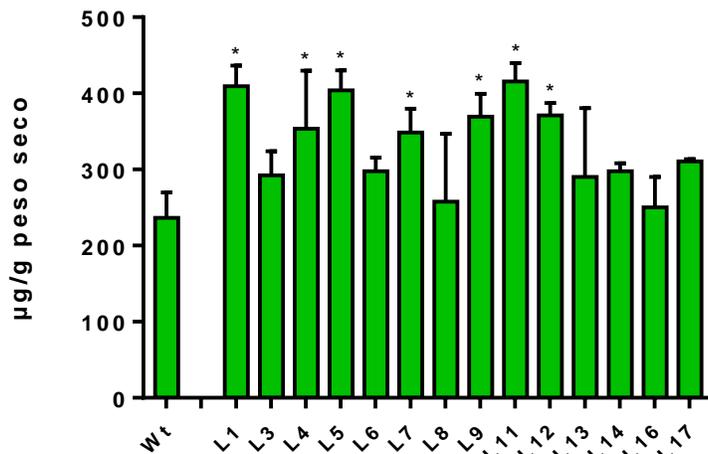


Figura 6. Cuantificación de carotenoides totales en hojas de las líneas transgénicas *DcPSY1*. Los resultados se expresan en $\mu\text{g/g}$ de peso seco, obtenidos a partir de la extracción de pigmentos en hojas y medidos por espectrofotometría. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de tres mediciones independientes. Los asteriscos representan diferencias significativas entre cada valor comparado con la línea *wild type* (Wt), determinadas por un test ANOVA de una vía y un post-test de Dunnet, * $p < 0,05$.

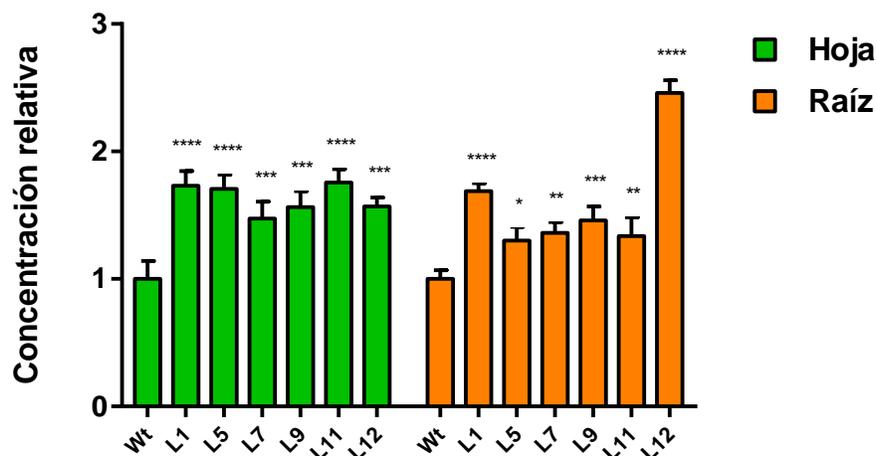


Figura 7. Cuantificación de carotenoides totales en hoja y raíz de reserva de las líneas seleccionadas. Los pigmentos extraídos fueron medidos mediante espectrofotometría a 470 nm por triplicado. Los valores representados en cada columna corresponden a las veces de aumento de cada línea normalizadas con la concentración de la línea *wild type*, y las barras representan la desviación estándar. Los asteriscos representan diferencias significativas entre cada valor comparado con la línea *wild type* (Wt), determinadas por un test ANOVA de una vía y un post-test de Dunnet, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

5.3 Determinación de la composición de pigmentos mediante HPLC

Posteriormente, se determinó mediante HPLC la composición de los carotenoides y clorofilas de las líneas seleccionadas. En el tejido fotosintético, los pigmentos detectados fueron α y β -caroteno, luteína y clorofilas a y b. En raíces, también se lograron identificar los mismos carotenoides pero no las clorofilas. En hojas, todas las líneas transgénicas presentaron una mayor acumulación de luteína (entre 1,8 y 2,2 veces) observándose diferencias significativas en cada una comparadas a la línea *wild type* (Figura 8). En cambio, los niveles de α -caroteno presentaron valores poco consistentes, ya que sólo la mitad de las líneas mostraron diferencias significativas en forma de una mayor acumulación en la L5 (1,7 veces) y L12, (1,3 veces), y una menor acumulación en la L7 (0,7 veces). Los resultados del β -caroteno son similares a los de luteína, mostrando una mayor acumulación de este carotenoide en todas las líneas (entre 1,3 y 1,8 veces), pero sin haber una diferencia significativa para la L12 (Figura 8). Los carotenoides totales obtenidos previamente se incluyen como referencia comparativa con los pigmentos específicos.

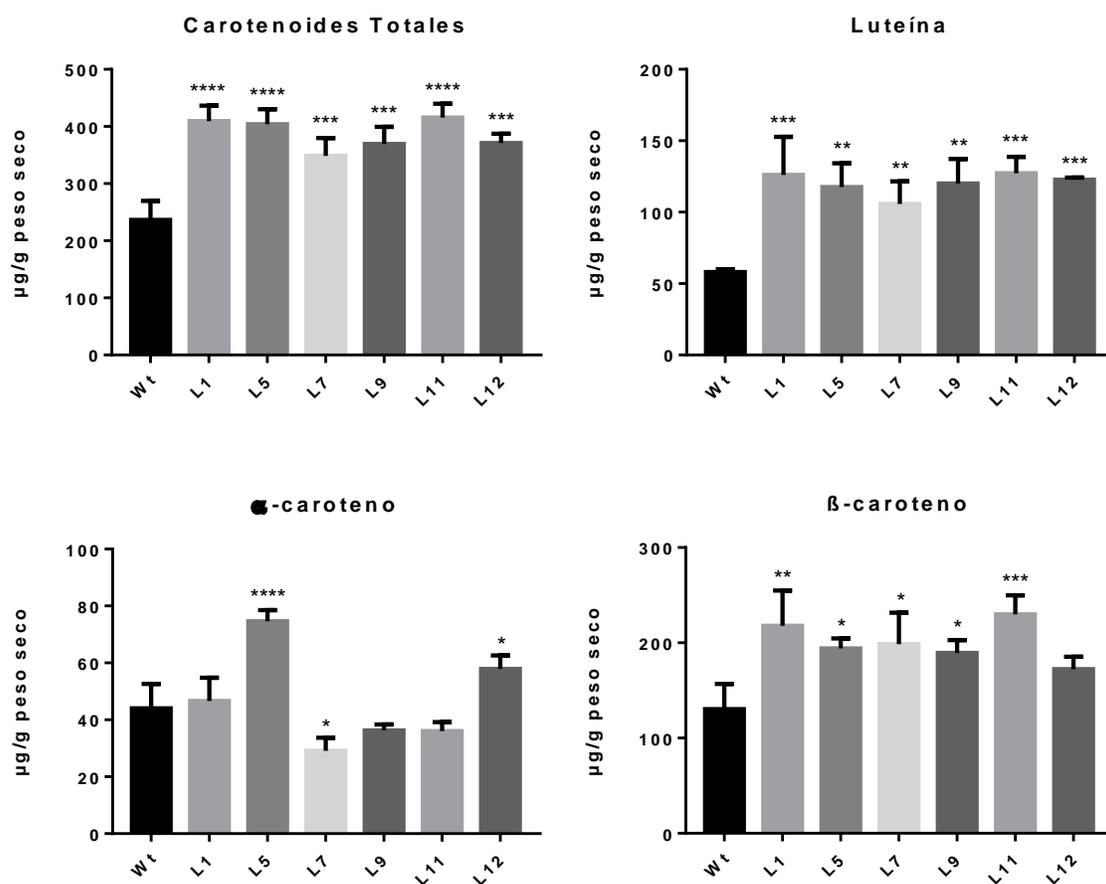


Figura 8. Cuantificación de carotenoides específicos en hojas de las líneas transgénicas *DcPSY1*. Los carotenoides totales se determinaron mediante espectrofotometría (Figura 7) y la composición de carotenoides específicos se determinó mediante HPLC. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de tres mediciones independientes. Los resultados se expresan en $\mu\text{g/g}$ de peso seco. Los asteriscos representan diferencias significativas entre cada valor comparado con la línea *wild type* (Wt), determinadas por un test ANOVA de una vía y un post-test de Dunnet, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Al analizar la composición de las clorofilas en las hojas de las plantas transgénicas, se obtiene que la sobreexpresión de este gen carotenogénico no afecta a la acumulación de estos pigmentos fotosintéticos. Esto se comprueba al no haber diferencias significativas en la acumulación de clorofila a o b de las plantas transgénicas y la *wild type* (Figura 9).

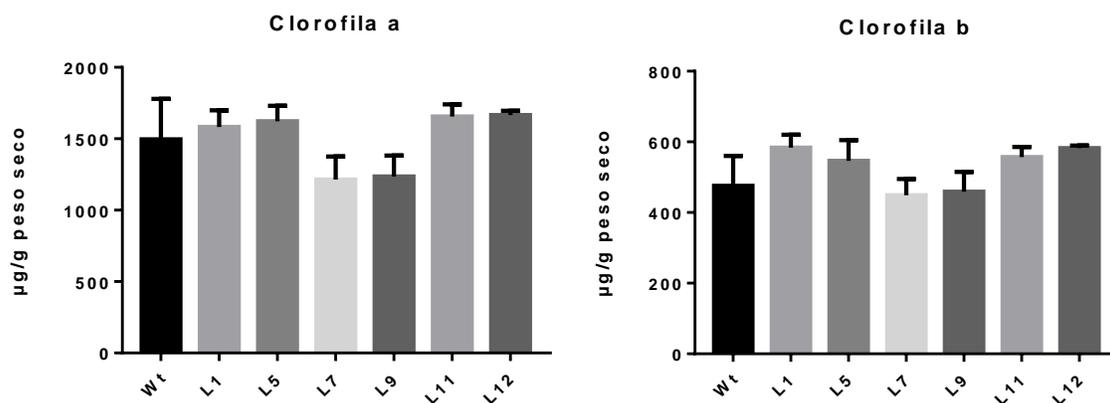


Figura 9. Cuantificación de las clorofilas presentes en hoja de las líneas transgénicas *DcPSY1*. Los resultados obtenidos mediante espectrofotometría y HPLC se expresan en $\mu\text{g/g}$ de peso seco. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de tres mediciones independientes. Las diferencias significativas fueron determinadas por un test ANOVA de una vía y un post-test de Dunnet.

En las raíces de reserva, las líneas transgénicas no presentaron mayor acumulación de luteína que la línea *wild type*, a excepción de la L12 que presenta 1,6 veces su cantidad, llegando a los $100 \mu\text{g/g}$ de peso seco. Para el α y β -caroteno, las líneas transgénicas acumulan mayor cantidad de estos carotenoides, presentando en cada una de ellas diferencias significativas. La L12 presenta la concentración de pigmentos más elevada alcanzando aproximadamente el triple y el doble de α y β -caroteno, respectivamente, en comparación a la línea control (Figura 10). Los carotenoides totales obtenidos previamente se incluyen como referencia comparativa con los pigmentos específicos.

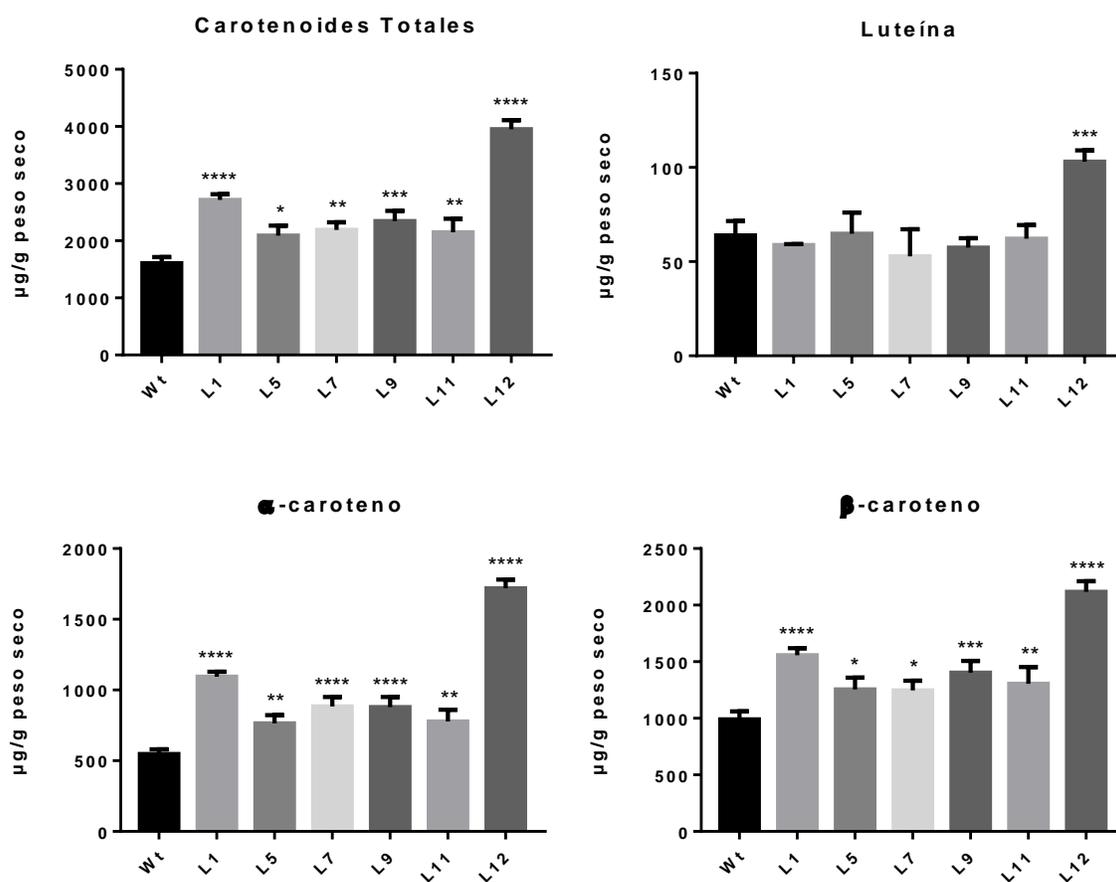


Figura 10. Cuantificación de carotenoides específicos en raíz de reserva de las líneas transgénicas *DcPSY1*. Los carotenoides totales se determinaron mediante espectrofotometría (Figura 7) y la composición de carotenoides específicos se determinó mediante HPLC. Los resultados se expresan en µg/g de peso seco. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de tres mediciones independientes. Los asteriscos en las barras representan diferencias significativas entre cada valor comparado con la línea *wild type* (Wt), determinadas por un test ANOVA de una vía y un post-test de Dunnet, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

5.4 Expresión relativa de genes carotenogénicos mediante qRT-PCR

5.4.1 Extracción de RNA y síntesis de cDNA mediante RT-PCR

Para analizar posibles efectos de la sobreexpresión del primer gen carotenogénico, se midieron los niveles de expresión de varios genes río abajo dentro de la ruta. Para

esto, se extrajo el RNA total de 4 líneas transgénicas representativas, para luego sintetizar el cDNA necesario para el qRT-PCR.

Una vez realizada la extracción del RNA a partir del tejido vegetal (hoja y raíz de reserva), se verificó que su pureza fuera la adecuada y tuviera una concentración suficiente ($>437,5$ ng/ μ l) para la síntesis del cDNA (Tabla 6 y 7). También se cargaron cada una de las muestras en un gel de agarosa para poder verificar con mayor detalle que el RNA no estuviera degradado al observar las bandas características formadas por los RNA ribosomales (Figura 11). Al ser capaces de observar nítidamente 2 bandas en cada uno de los carriles donde se cargó el RNA se concluye que este tiene una calidad suficiente para ser utilizado en los siguientes experimentos.

Tabla 6. Concentración del RNA total extraído a partir de las hojas de las líneas transgénicas *DcPSY1* seleccionadas. Los índices de absorbancia a una longitud de onda de 260/280 y 260/230 son indicadores de la pureza de cada extracción. Las líneas 1, 5, 7, y 9 corresponden a las plantas transgénicas y la Wt corresponde a una planta silvestre usada como control negativo. Para cada línea la extracción de RNA se realizó por triplicado (a, b y c).

Línea	Concentración (ng/ μ l)	Absorbancia λ 260/ λ 280	Absorbancia λ 260/ λ 230
L1 a	533,6	2,1	2,0
L1 b	611,6	2,1	2,3
L1 c	786,0	2,1	2,1
L5 a	540,8	1,9	2,3
L5 b	2117	2,1	2,4
L5 c	486,4	2,0	2,2
L7 a	466,0	2,0	2,2
L7 b	584,0	2,2	2,2
L7 c	512,4	2,2	2,3
L9 a	454,0	2,2	2,5
L9 b	612,4	2,2	2,4
L9 c	455,6	2,2	2,5
Wt a	1046	2,0	2,3
Wt b	637,2	2,1	2,4
Wt c	774,8	2,0	2,4

Tabla 7. Concentración del RNA total extraído a partir de las raíces de las líneas transgénicas *DcPSY1* seleccionadas. Los índices de absorbancia a una longitud de onda de 260/280 y 260/230 son indicadores de la pureza de cada extracción. Las líneas 1, 5, 7, y 9 corresponden a las plantas transgénicas y la Wt corresponde a una planta silvestre usada como control negativo. Para cada línea la extracción de RNA se realizó por triplicado (a, b y c).

Línea	Concentración (ng/μl)	Absorbancia λ260/λ280	Absorbancia λ260/λ230
L1 a	747,6	2,2	2,4
L1 b	936,8	2,1	2,6
L1 c	476,4	2,0	2,6
L5 a	757,2	2,1	2,5
L5 b	590,4	1,9	2,1
L5 c	855,2	1,9	2,2
L7 a	852,8	2,0	2,5
L7 b	798,0	2,0	2,7
L7 c	720,8	2,1	2,7
L9 a	1368	2,1	2,5
L9 b	1344	2,1	2,5
L9 c	1208	2,1	2,5
Wt a	504,8	2,1	2,2
Wt b	708,4	2,1	2,3
Wt c	1358	2,1	2,4

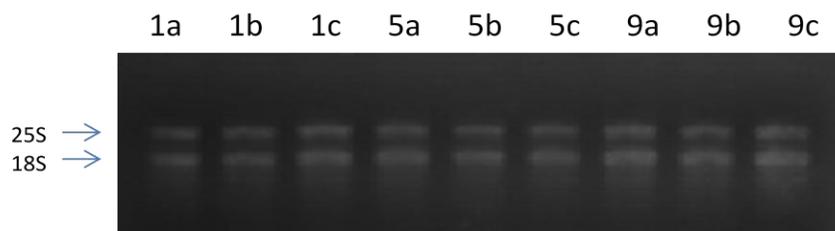


Figura 11. Verificación de la integridad del RNA extraído mediante electroforesis. Muestra representativa de RNAs obtenidos a partir de la raíz de reserva de distintas líneas transgénicas (líneas 1, 5 y 9) por triplicado (a, b y c). En cada carril se observan dos bandas correspondientes a los RNA ribosomales 25S y 18S. Tinción con BrEt.

Luego, se sintetizó el cDNA mediante una reacción de RT-PCR. Para cada una de las muestras se realizó como control la amplificación por PCR de un gen endógeno de *D. carota* para comprobar la integridad del cDNA recién sintetizado. Se amplificó un fragmento del gen *DcLCYB1* y se obtuvo para cada muestra la banda esperada de 764 pb

que incluye una región codificante del gen (Figura 12). A su vez, se realizó un control negativo para cada reacción que consistió en utilizar como templado el RNA proveniente del tratamiento con DNasa I, donde como era de esperarse no hubo amplificación (no mostrado).

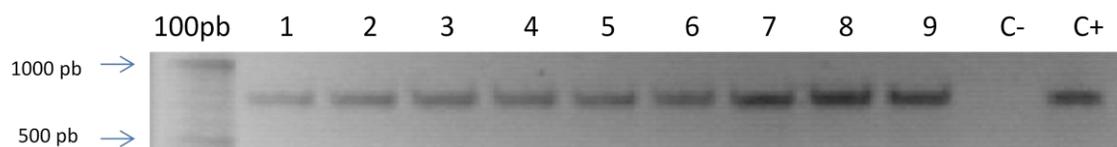


Figura 12. Amplificación de un fragmento del gen *DcLCYB1* a partir del cDNA sintetizado previamente mediante RT-PCR. Muestra representativa del cDNA obtenido a partir de las raíces (carriles 1-9) de líneas transgénicas. El control positivo (C+) corresponde al cDNA previamente verificado de *D. carota wild type*. El control negativo (C-) corresponde a una reacción de PCR en ausencia de templado. El estándar de peso molecular (100pb) corresponde al marcador GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder.

5.4.2 PCR cuantitativo en tiempo real de la abundancia de transcrito de *DcPSY1* y genes carotenogénicos endógenos

Primero se analizó la abundancia del transcrito del gen *DcPSY1*, que se debería encontrar sobreexpresado en las líneas transgénicas debido al promotor constitutivo que dirige la expresión del transgén. Se puede ver que para las 4 líneas transgénicas este gen se encuentra mayormente expresado con respecto a la expresión de la planta *wild type* (Figura 13) y este comportamiento se aplica tanto para las hojas como para las raíces (Figura 13A y 12B). Cada una de las líneas presenta diferencias significativas en sus resultados y se obtiene un aumento de aproximadamente 3 a 6 veces en hojas, y de 3 a 4,5 veces en raíz.

Para determinar posibles alteraciones en la ruta endógena de síntesis de carotenoides como respuesta a la sobreexpresión de *DcPSY1*, se evaluó la expresión de varios genes que se encuentran dentro de la ruta carotenogénica mediante qRT-PCR en las 4 líneas seleccionadas. Todos los ensayos fueron normalizados contra la expresión de un gen constitutivo (*DcUbiquitina*) y comparados con la línea control *wild type* (calibrador).

Al analizar los niveles de expresión del gen parálogo *DcPSY2*, se obtiene que las líneas transgénicas muestran una disminución en la expresión de este gen en las hojas,

aunque esta sea significativamente menor sólo en 2 de las líneas analizadas, la L1 y L7 (Figura 13C). Al contrario que en las hojas, en raíces observamos que la expresión del gen *DcPSY2* es mayor que la del control, mostrando diferencias significativas en 3 de ellas, la L1, L7 y L9 (Figura 13D).

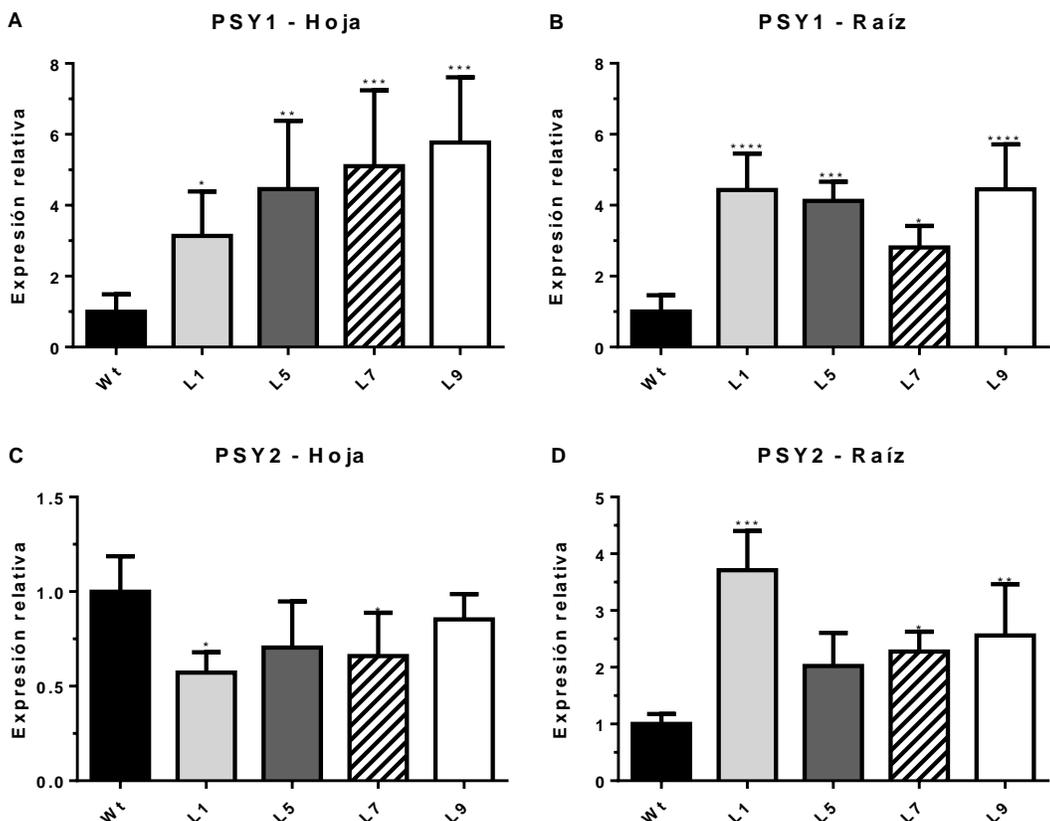


Figura 13. Expresión de los genes *DcPSY1* y *DcPSY2* en hojas y raíces de reserva de líneas transgénicas de *D. carota*. Se analizaron los niveles de expresión de A) *PSY1* en hoja, B) *PSY1* en raíz, C) *PSY2* en hoja y D) *PSY2* en raíz de las 4 líneas transgénicas seleccionadas. Para cada medición se utilizó el gen de ubiquitina como normalizador y los datos de las plantas silvestres como calibrador. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas analizadas por duplicado técnico. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas silvestres, determinadas por un test ANOVA de una vía y un post-test de Dunnet, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Los niveles de transcrito del gen *DcLCYB1* en hojas aumentan significativamente sólo en una de las 4 líneas analizadas (L5), alcanzando un poco más del doble de expresión respecto a la línea control (Figura 14A). En raíz, también se obtiene que este

mismo gen aumenta su expresión en más de 2 veces para todas las líneas (Figura 14B). La expresión del gen *DcLCYB2* también se vio alterada en las líneas transgénicas. En hoja, 2 de ellas (L5 y L7) presentaron un aumento significativo de alrededor de 2 veces (Figura 14C), mientras que en raíz de reserva las 4 líneas aumentaron significativamente la expresión del gen entre 3 y 6 veces, aproximadamente (Figura 14D).

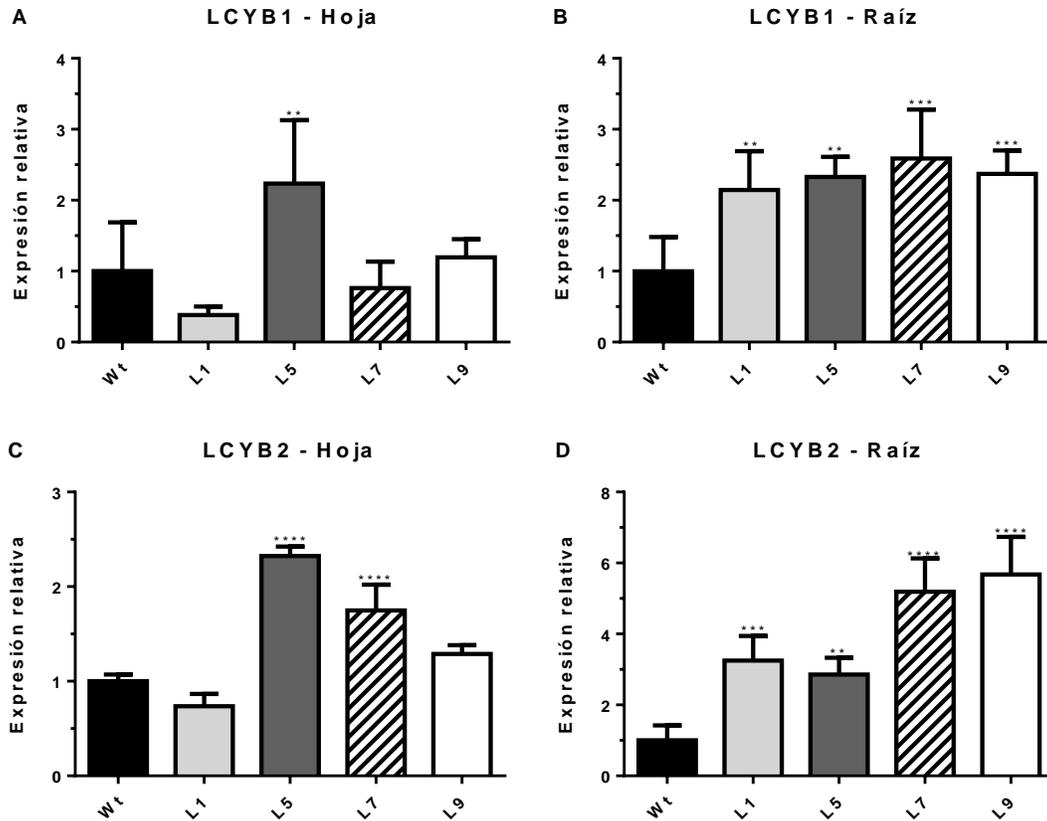


Figura 14. Expresión de los genes *DcLCYB1* y *DcLCYB2* en hojas y raíces de reserva de líneas transgénicas de *D. carota*. Se analizaron los niveles de expresión de A) *LCYB1* en hoja, B) *LCYB1* en raíz, C) *LCYB2* en hoja y D) *LCYB2* en raíz de las 4 líneas transgénicas seleccionadas. Para cada medición se utilizó el gen de ubiquitina como normalizador y los datos de las plantas silvestres como calibrador. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas analizadas por duplicado técnico. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas silvestres, determinadas por un test ANOVA de una vía y un post-test de Dunnet, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Solamente 2 de las líneas presentaron un aumento significativo en los niveles de transcrito para el gen *DcLCYE* (L7 y L9) en las hojas (Figura 15A) y aunque las demás

líneas mostraron una menor expresión, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En raíz, todas las líneas presentaron un aumento significativo en la expresión del gen, llegando a estar más de 30 veces sobreexpresado en la L7 (Figura 15B). Por último, tenemos como resultado dos patrones de expresión completamente contrarios para el gen *DcNCED1*. En hojas, se puede ver que las 4 líneas muestran una expresión de este gen menor a la mitad que la de la línea control (Figura 15C). En contraste, para las raíces de reserva las 4 líneas muestran un aumento significativo para dicho gen (Figura 15D), siendo la L9 la que muestra la mayor expresión con aproximadamente 7,5 veces más que la línea *wild type*.

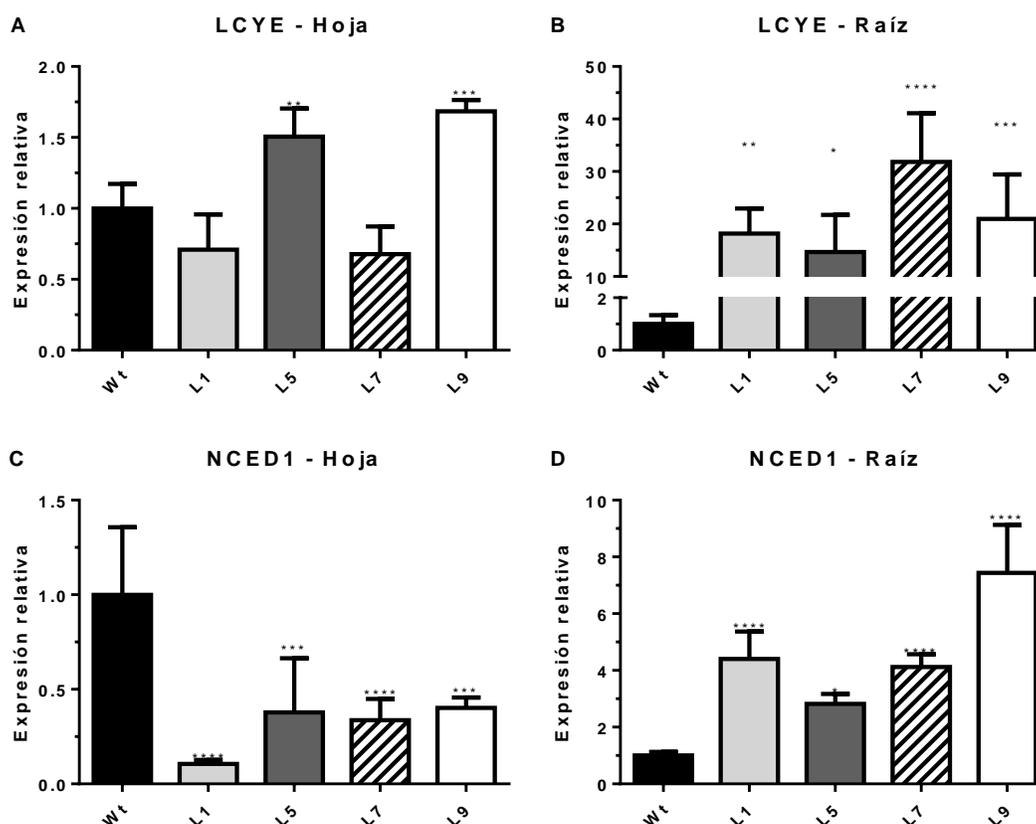


Figura 15. Expresión de los genes *DcLCYE* y *DcNCED1* en hojas y raíces de reserva de líneas transgénicas de *D. carota*. Se analizaron los niveles de expresión de A) *LCYE* en hoja, B) *LCYE* en raíz, C) *NCED1* en hoja y D) *NCED1* en raíz de las 4 líneas transgénicas seleccionadas. Para cada medición se utilizó el gen de ubiquitina como normalizador y los datos de las plantas silvestres como calibrador. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación

estándar de tres réplicas biológicas analizadas por duplicado técnico. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas silvestres, determinadas por un test ANOVA de una vía y un post-test de Dunnet, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

5.5 Ensayo de tolerancia a estrés salino

Para determinar si la sobreexpresión del gen *DcPSY1*, y por consecuencia un aumento en la acumulación de carotenoides, es capaz de generar un efecto positivo en la tolerancia a condiciones abióticas como el estrés salino, se analizaron cuantitativamente las 4 líneas transgénicas seleccionadas. El ensayo de fuga electrolítica sirve para cuantificar la tasa de salida de iones desde el tejido, después de un estrés agudo generado por altas concentraciones de sal, lo que es directamente proporcional al daño generado en la membrana celular. Como se ve en la Figura 16, en la condición control sin tratamiento, no se observan diferencias significativas en la pérdida de iones entre las plantas transgénicas y la planta *wild type*, y el porcentaje de la salida de iones es inferior al 1% para todas las líneas analizadas. Al someter las líneas a elevadas concentraciones de sal (250mM), nuevamente obtenemos que éstas no presentan diferencias significativas si se comparan con la condición control sin tratamiento, a excepción de la L9 en la que hay un aumento significativo en la salida de electrolitos.

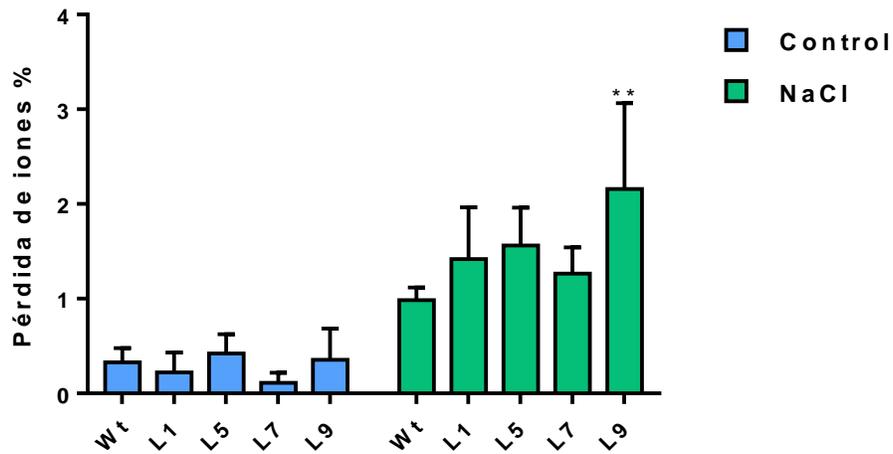


Figura 16. Pérdida o fuga de electrolitos de las líneas seleccionadas por tratamientos agudos con sal. Los resultados se expresan como el porcentaje de pérdida de iones para las líneas transgénicas y la línea *wild type* como control. Los experimentos se llevaron a cabo en 3 réplicas biológicas, en una condición control sin tratamiento y otra con un tratamiento de NaCl (250mM durante 20 hrs). Los asteriscos indican diferencias significativas existentes entre cada línea transgénica comparada con la línea *wild type*, determinadas por un test ANOVA de dos vías y un post-test de Dunnet, ** p<0,01.

Discusión

El trabajo realizado durante esta memoria de título, se enmarcó en la caracterización a nivel molecular y bioquímico de plantas transformantes de zanahoria con el gen *DcPSY1* generadas por el alumno Leonardo Molineros durante su seminario de título [55]. Teniendo en consideración que los genes *DcPSY1* y *DcPSY2* se expresan de forma diferencial durante el desarrollo de las plantas de zanahoria en hojas y raíces de reserva [31], es que se decidió transformar zanahorias para sobreexpresar estos genes y así caracterizar la función de ambos durante el desarrollo de la planta hasta su madurez.

Durante el cultivo *in vitro* de las plantas transformadas con el gen *DcPSY1* se pudo ver una tonalidad levemente anaranjado de los embriones y plántulas de 2 semanas de edad en comparación a las líneas silvestres (Figura 17). Estas alteraciones en la pigmentación son el primer indicador de que este gen, en etapas iniciales del desarrollo, participa en promover la síntesis de carotenoides. A los 3 meses de cultivo en tierra ya no se pueden ver diferencias de color y tamaño ya que las hojas presentan de manera abundante las clorofilas, pigmentos que enmascaran a los carotenoides [55].

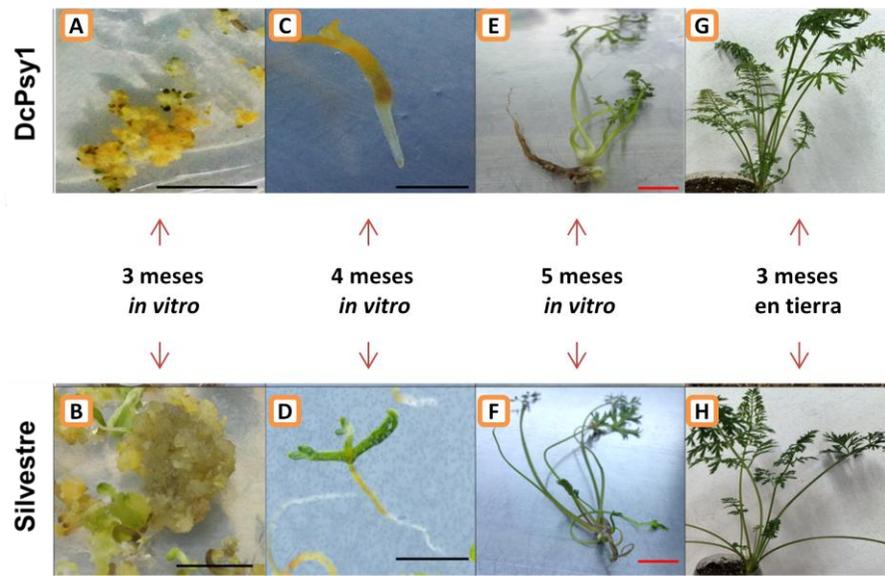


Figura 17. Fotografías de la regeneración de explantes de *D. carota*. (A) y (B) son embriones provenientes de explantes transformados con el gen *DcPsy1* y embriones silvestres (control), respectivamente, a los 3 meses de cultivo *in vitro*. (C) y (D) son plántulas provenientes de los eventos de transformación con el gen *DcPsy1* y plántulas silvestres, respectivamente, a los 4 meses de cultivo *in vitro*. (E) y (F) son plantas provenientes de explantes transformados con el gen *DcPsy1* y plantas silvestres, respectivamente, a los 5 meses de cultivo *in vitro* listas para traspasar a cultivo en tierra. (G) y (H) son plantas de 3 meses en tierra. Las barras negras indican el tamaño de 0,5 cm y las barras rojas 1,5 cm.

Cuando se analizó la transgenie de las 17 plantas que se obtuvieron luego del proceso de transformación, se comprobó que al menos 16 de ellas contenían dentro de su genoma el transgén *hptII*, gen marcador de selección que forma parte del *cassette* para sobreexpresar *DcPSY1*. La transgenie de una de las líneas (L13) no pudo ser determinada, pero al no obtenerse un resultado positivo para la presencia de un gen endógeno a partir de la extracción de DNA genómico, ésta no se puede descartar como transgénica. Aún así, al contar con una cantidad suficiente de plantas transgénicas para los estudios posteriores, se decidió continuar con las líneas que dieron positivo para la presencia del gen *hptII*. Se concluye entonces, que la transformación presentó una alta eficiencia, ya que la gran mayoría de las plantas que sobrevivieron al agente de selección (resistencia a higromicina) durante el cultivo *in vitro* y que luego fueron traspasadas a tierra resultaron ser transgénicas.

La sobreexpresión del gen *PSY1* es capaz de generar una mayor acumulación de carotenoides en plantas como *Arabidopsis thaliana* [39] [40]. Previamente, mediante expresión heteróloga en *E. coli* se determinó que el gen *DcPSY1* posee actividad fitoeno sintasa [46]. En este trabajo, se quiso determinar si esa función está asociada a un órgano en particular, como hoja o raíz de reserva. Para ello, se siguió el procedimiento de sobreexpresión, metodología que ha sido ampliamente utilizada, permitiendo observar que la expresión de otros genes *PSY* generan una mayor acumulación de carotenoides, comprobando su funcionalidad *in planta* [39] [40].

Con el fin de seleccionar las plantas transgénicas que presentaran los niveles más elevados en carotenoides totales, se extrajeron los pigmentos desde las hojas y se cuantificaron los carotenoides totales mediante espectrofotometría. Como suele ocurrir en este tipo de ensayos donde se sobreexpresa algún gen que afecta directamente al metabolismo, se consideró la posibilidad de encontrar líneas que por un efecto compensatorio terminaran silenciando la expresión del gen *DcPSY1* y que esto llevara por consecuencia a una menor acumulación de carotenoides respecto a los controles. A pesar de contar con un número elevado de líneas, entre las cuales se podría observar este comportamiento, el efecto descrito no se vio en ninguna de ellas. Por el contrario, todas las líneas presentaron niveles similares o significativamente superiores de sus carotenoides. De esto se puede concluir *a priori* que ninguna de las líneas transgénicas se encontraba silenciada para el gen que se propuso sobreexpresar.

De las 6 líneas que fueron seleccionadas (L1, L5, L7, L9, L11 y L12) también se extrajeron los pigmentos a partir de las raíces de reserva para ver si el mismo comportamiento visto en hojas se mantenía. Todas estas líneas mostraron niveles de carotenoides significativamente superiores a los de la línea control, al igual que lo que se vio en hojas, lo cual se correlaciona directamente con el nivel de transcrito de *DcPSY1*. Es decir, que la sobreexpresión del gen *DcPSY1* es capaz de generar un incremento en la acumulación de los carotenoides totales, tanto en hojas como en raíz de reserva. Estudios previos realizados en nuestro grupo de trabajo [31] proponen que de los 2 genes parálogos de *PSY*, *DcPSY1* estaría mayormente asociado a la expresión en hojas y *DcPSY2* sería el principal responsable de la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva, al presentar un mayor aumento en su expresión durante el desarrollo en comparación al gen *DcPSY1*. Pero como se observa en los resultados obtenidos, es

posible que el gen *DcPSY1* también cumpla una función importante en las raíces. Incluso, el mayor aumento en los niveles de carotenoides totales se presentó en la raíz de una de las líneas (L12) y no en las hojas. Sin embargo, este comportamiento debe considerarse más como una excepción, ya que no fue consistente para el resto de las líneas que en general mostraron un aumento menor en las raíces (entre 1,3 y 1,7 veces) que en las hojas (entre 1,5 y 1,8 veces). Se puede deducir entonces que como era de esperarse, el aumento en los carotenoides generado por la sobreexpresión del gen *DcPSY1* es más pronunciado en las hojas que en las raíces.

La composición de los distintos carotenoides que pueden ser identificados mediante HPLC nos brinda una visión más detallada de cómo se ve alterada la ruta carotenogénica al sobreexpresar el gen que codifica la primera de sus enzimas. En cuanto a la concentración de luteína, tenemos que ésta presenta una notoria diferencia al analizar la acumulación en hojas y raíces. La mayor acumulación que se ve en las hojas de todas las líneas transgénicas, donde llegan a duplicar la cantidad de este carotenoide respecto a la línea *wild type*, contrasta con lo obtenido en las raíces de las mismas. Sólo una de las líneas presenta una mayor acumulación de luteína en las raíces, mientras que el resto no muestra diferencias significativas, y este valor elevado se debe únicamente a que fue esta línea la que tenía más carotenoides totales. Se concluye que la sobreexpresión del gen *DcPSY1* genera un aumento en la acumulación de carotenoides totales en hojas que se debe en parte a una mayor acumulación de luteína. En cambio, en la mayor acumulación de carotenoides que se observa en las raíces no participa este pigmento. Sin embargo, no se logra obtener un resultado muy consistente al analizar la concentración de α -caroteno en las hojas, ya que la mitad de las líneas no ve afectada su acumulación. De hecho, en 2 de ellas aumenta e incluso en una se ve disminuida. Por otro lado, las raíces de todas las líneas acumulan más α -caroteno al sobreexpresar *DcPSY1*, siendo este carotenoide entonces uno de los responsables de la mayor acumulación de carotenoides totales. Como ya se sabe, el α -caroteno se convierte finalmente en luteína en una de las ramificaciones de la ruta, por lo que no resulta tan extraño ver que en hojas la luteína aumenta sin alterar significativamente la cantidad de α -caroteno y que en las raíces ocurra lo contrario. Esto puede deberse a la preferencia de cada órgano y su capacidad para almacenar ciertos carotenoides específicos y el rol que cumple la luteína durante la fotosíntesis. Por último, el β -caroteno claramente es uno de los pigmentos que aporta a la

mayor acumulación de carotenoides totales tanto en las hojas como en las raíces, mostrando un aumento significativo en todas las líneas.

La enzima fitoeno sintasa que se encuentra sobreexpresada utiliza como sustrato el GGPP, que es el precursor de muchos isoprenoides plastidiales, como las clorofilas. La sobreexpresión del gen *PSY* y un aumento en la síntesis de carotenoides podría estar limitando la formación de las clorofilas, ya que ambos comparten el mismo precursor. A pesar de esto, en estudios donde se sobreexpresó el gen *DcPSY1* en plantas de tabaco [56], los niveles de clorofilas aumentaron en vez de disminuir, posiblemente debido a la regulación de otros genes involucrados en la síntesis de éstos. En un estudio en el que se sobreexpresó en tabaco otro de los genes carotenogénico, el gen *DcLCYB1*, también se obtuvieron niveles elevados de clorofilas [60]. Al cuantificar los niveles de clorofila a y b presentes en las hojas de nuestras líneas transgénicas, se obtiene que los valores son muy similares a los de la línea control y en ninguno de ellos hay diferencias significativas. Se infiere a partir de estos resultados que la sobreexpresión del gen *DcPSY1* en zanahorias no afecta de manera significativa al flujo metabólico hasta el punto de limitar la formación de las clorofilas y que la capacidad fotosintética en estas plantas, por ejemplo, no debiese verse afectada

La sobreexpresión de *DcPSY1* genera una regulación en la expresión de genes carotenogénicos diferencial para las hojas y raíces de las plantas transgénicas. De las 4 líneas seleccionadas para los análisis de expresión, todas mostraron mayores niveles de transcrito del gen *DcPSY1*, como era de esperarse. Al encontrarse el ge bajo el control de un promotor de expresión constitutiva, éste se sobreexpresará sin discriminar si se encuentra en hojas o en las raíces, y a pesar que las líneas presentan diferencias en los niveles de transcrito en ambos órganos dentro de una misma línea y entre ellas, los valores se encuentran dentro de un rango razonable, lo que sugiere que las diferencias no generarán efectos biológicos importantes. Otro factor que afectará a la expresión relativa del transgén es el número de copias presentes en el genoma, que debido a la naturaleza del proceso de transformación podría ser más de uno. Ya que se generan inserciones al azar, no se puede saber con exactitud en que regiones quedará inserto, que tan expuesto o regulado se encontrará a nivel de la cromatina, y como esto puede afectar finalmente a su expresión en cada una de las plantas.

El aumento de los carotenoides acumulados en hojas se correlaciona parcialmente con el aumento en la expresión de algunos genes carotenogénicos endógenos. El aumento en la expresión de *DcPSY1* se ve contrarrestado en algunas de las líneas por una disminución en la abundancia del transcrito del gen *DcPSY2* en hojas, lo que refuerza la idea de su capacidad para regular diferencialmente la biosíntesis de carotenoides en hojas. Según lo obtenido en los análisis de expresión, el gen *DcPSY1* estaría liderando la síntesis de carotenoides en las hojas por sobre su gen parálogo, cuya expresión está siendo negativamente regulada dentro de este contexto. Los genes *DcLCYB1*, *DcLCYB2* y *DcLCYE* ven aumentada su expresión sólo en algunas de las líneas transgénicas en hojas (L5 y L9), en correlación con un aumento de luteína y α -caroteno. Sin embargo, en la mayoría de las líneas no existe una correlación con la luteína, por lo que no se les puede atribuir de forma directa su regulación con el aumento de los carotenoides y habría que determinar la expresión de *DcCBHx*, gen que codifica la enzima que participa directamente en la síntesis de luteína desde α -caroteno. En cambio, *DcNCED1* disminuyó su expresión en la totalidad de las líneas, por lo que habría que investigar más a fondo si esto genera efectos importantes en la producción de ABA o qué factores actúan regulando su expresión en hojas. La mayor acumulación de luteína y β -caroteno concuerdan con el hecho que estos compuestos se asocian formando complejos con las clorofilas dentro de las células del tejido fotosintético [57], lo que se explica en parte por una sobreexpresión de *DcPSY1* y su rol en este tejido. Al parecer, el incremento de *DcPSY1* es el principal responsable para explicar el mayor contenido de carotenoides en tejido fotosintético, pero no se puede descartar que se esté regulando la ruta carotenogénica por otras vías, como la regulación post transcripcional de las proteínas involucradas o la actividad de estas enzimas.

En las raíces de reserva de las líneas transgénicas, el aumento de los carotenoides se correlaciona directamente con el aumento en la expresión de varios genes endógenos que forman parte de la ruta carotenogénica. El incremento de los niveles de α y β -caroteno se explica por una mayor abundancia relativa en los transcritos de los genes *DcPSY1*, *DcPSY2*, *DcLCYB1*, *DcLCYB2* y *DcLCYE* (siendo este último el más inducido). También se induce la expresión del gen *DcNCED1* relacionado con la síntesis de ABA, contrario a lo observado en hojas. Esto quiere decir que, de cierta manera, la expresión del gen *DcPSY1* se encuentra comunicada con la expresión de gran parte de los genes

río abajo dentro de la ruta carotenogénica y de la síntesis de ABA. Se puede sugerir entonces que en las raíces, a diferencia de las hojas, la expresión de varios de los genes dentro de la ruta caortenogénica se encuentran regulados positivamente y de forma coordinada, regulando a su vez la cantidad de los carotenoides acumulados. Ya se había descrito que *AtPSY1*, el gen clave de esta vía metabólica en *A. thaliana* era regulado transcripcionalmente [26], y en este estudio se muestra que al sobreexpresar dicho gen la expresión de otros también se ve afectada. Esto puede explicarse de cierta manera a través de señales intracelulares que actúan a nivel nuclear regulando la expresión génica, lo que provocará la alteración de la cantidad de los pigmentos acumulados en plastidios. Existen varios apocarotenoides dentro de la ruta que pueden ser considerados responsables de realizar esta señalización retrógrada, como algunos derivados de los mismos carotenoides [59] [60]. Se ha descrito que en las raíces de *A. thaliana* el ABA es capaz de regular positivamente la expresión de *AtPSY1* [58], lo que propone a esta hormona como un buen candidato, pero no se pueden descartar otros compuestos generados a partir de la clivación y oxidación de los carotenoides que también se han reportado capaces de generar una señalización retrógrada [59]. Esto también serviría para explicar cómo es que el gen *DcNCED1*, que se encuentra directamente relacionado con la síntesis de ABA, se regula de forma negativa y positiva en hojas y raíces respectivamente, sugiriendo una regulación diferencial en dichos órganos. Aún queda por determinar varios de los mecanismos a través de los cuales la sobreexpresión de *DcPSY1* puede generar este aumento en los carotenoides en hojas y raíces, pero la evidencia sugiere que el aumento de la expresión génica de otros genes carotenogénicos sería uno de los principales mecanismos para ello en la raíz de reserva.

Los ensayos de resistencia a estrés salino no arrojaron resultados satisfactorios como se había propuesto según los resultados obtenidos en trabajos previos dentro de nuestro laboratorio. En ellos se analizaron plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* que expresan *DcPSY1* para estudiar su funcionalidad. Experimentos en los que se utilizaron plántulas jóvenes y completas de tabaco, obtenidas directamente del cultivo *in vitro*, las líneas en condición de estrés mostraron un porcentaje de fuga de iones del 40% y 60% para las plantas transgénicas y la *wild type* respectivamente [56]. Por ello, se esperaba ver una potenciación de la tolerancia a estrés salino en las líneas que acumularan una mayor cantidad de carotenoides. Los resultados obtenidos pueden deberse a que la

cantidad de carotenoides presentes no es suficiente o no protegen frente al daño causado por NaCl en la membrana de hojas de zanahoria maduras (>3 meses de edad). El tratamiento aplicado quizás no fue el adecuado para estudiar el proceso en el cual los carotenoides pueden estar protegiendo. Puede ser que otro tipo de ensayo ayude a comprender mejor el rol antioxidante de los carotenoides, como la determinación de los niveles de ROS (que ya se ha descrito que los carotenoides disminuyen), o ensayos de sobrevivencia de plantas sometidas a altas concentraciones de sal.

Conclusión

Todas las líneas transgénicas que sobreexpresan el gen *DcPSY1* presentaron una igual o mayor acumulación de carotenoides totales en hojas y raíces de reserva, lo que comprueba su funcionalidad en ambos órganos de *D. carota*.

Se propone que el gen *DcPSY1* tiene un rol directo en la acumulación de carotenoides en órganos fotosintéticos, mientras que indirecto en la raíz de reserva considerando que:

a) En hojas, las líneas transgénicas analizadas que sobreexpresan el gen presentaron una mayor acumulación de luteína y β -caroteno en sus hojas, sin mostrar una correlación directa en cuanto a la expresión de los genes *DcPSY2*, *DcLCYB1*, *DcLCYB2* y *DcLCYE*.

b) En la raíz de reserva, las líneas transgénicas analizadas que sobreexpresan el gen presentaron una mayor acumulación de α -caroteno y β -caroteno, lo cual se correlaciona con una mayor expresión de los genes endógenos *DcPSY2*, *DcLCYB1*, *DcLCYB2*, *DcLCYE* y *DcNCED1*.

Esto sugiere que cada tipo de tejido no solamente acumula pigmentos específicos de forma preferencial, sino que los mecanismos de regulación que aún no son del todo claros (regulación transcripcional, post-traducciona, niveles de proteína u otros metabolitos) también difieren para cada órgano

Plantas *DcPSY1* transgénicas adultas no presentaron una menor fuga de electrolitos luego de someterlas a un estrés salino agudo respecto a plantas silvestres controles, por lo que no se logra demostrar con esta metodología que presenten mayor resistencia a factores abióticos.

Referencias

- [1] Mercadante, A. Z., Egeland, E. S., Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2004). Carotenoids handbook. *Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds.*
- [2] Rodriguez-Concepcion, M., & Stange, C. (2013). Biosynthesis of carotenoids in carrot: an underground story comes to light. *Archives of biochemistry and biophysics*, 539(2), 110-116.
- [3] Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9(15), 1551-1558.
- [4] Bartley, G. E., & Scolnik, P. A. (1995). Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell*, 7(7), 1027–1038.
- [5] Ahmad, P., Sarwat, M., & Sharma, S. (2008). Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 51(3), 167-173.
- [6] Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., & Miszalski, Z. (2007). The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION*, 54(1), 39.
- [7] Latowski, D., Kuczyńska, P., & Strzałka, K. (2011). Xanthophyll cycle—a mechanism protecting plants against oxidative stress. *Redox Report*, 16(2), 78-90.
- [8] Zhu, C., Bai, C., Sanahuja, G., Yuan, D., Farré, G., Naqvi, S. & Christou, P. (2010). The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 504(1), 132-141.
- [9] Rodríguez-Concepción, M. (2010). Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Archives of biochemistry and biophysics*, 504(1), 118-122.
- [10] Ruyter-Spira, C., Al-Babili, S., Van Der Krol, S., & Bouwmeester, H. (2013). The biology of strigolactones. *Trends in plant science*, 18(2), 72-83.
- [11] Finkelstein, R. (2013). Abscisic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 11, e0166. <http://doi.org/10.1199/tab.0166>
- [12] Goodwin, T. W. (1986). Metabolism, nutrition, and function of carotenoids. *Annual review of nutrition*, 6(1), 273-297.
- [13] Cazzonelli, C. I., Nisar, N., Hussain, D., Carmody, M. E., & Pogson, B. J. (2010). Biosynthesis and Regulation of Carotenoids in Plants—micronutrients, vitamins and health benefits. In *Plant developmental biology-Biotechnological perspectives* (pp. 117-137). Springer Berlin Heidelberg.
- [14] Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological research*, 55(3), 207-216.
- [15] Cunningham Jr, F. X., & Gantt, E. (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology*, 49(1), 557-583.

- [16] Soll, J., & Schleiff, E. (2004). Protein import into chloroplasts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(3):198-208.
- [17] Cuttriss, A. J., Mimica, J. L., Pogson, B. J., Howitt, C. A. (2007). Carotenoids in The structure and function of plastids. *Advances in Photosynthesis and Respiration* 23, cap.16: 315-334
- [18] Lichtenthaler, H. K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology*, 50(1), 47-65.
- [19] Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C., & Pogson, B. J. (2015). Carotenoid metabolism in plants. *Molecular plant*, 8(1), 68-82.
- [20] Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current opinion in plant biology*, 4(3), 210-218.
- [21] Chen, Y., Li, F., & Wurtzel, E. T. (2010). Isolation and Characterization of the *Z-ISO* Gene Encoding a Missing Component of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Plant Physiology*, 153(1), 66–79.
- [22] Yu, Q., Ghisla, S., Hirschberg, J., Mann, V., & Beyer, P. (2011). Plant carotene cis-trans isomerase CRTISO A new member of the FADred-dependent flavoproteins catalyzing non-redox reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 286(10), 8666-8676.
- [23] Farré, G., Bai, C., Twyman, R. M., Capell, T., Christou, P., & Zhu, C. (2011). Nutritious crops producing multiple carotenoids—a metabolic balancing act. *Trends in plant science*, 16(10), 532-540.
- [24] Cunningham, F. X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K. A., DellaPenna, D., & Gantt, E. (1996). Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of Arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *The Plant Cell*, 8(9), 1613-1626.
- [25] Armstrong, G. A., & Hearst, J. E. (1996). Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB Journal*, 10(2), 228-237.
- [26] Ruiz-Sola, M. Á., & Rodríguez-Concepción, M. (2012). Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis: A Colorful Pathway. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 10, e0158.
- [27] Rosas-Saavedra, C., & Stange, C. (2016). Biosynthesis of Carotenoids in Plants: Enzymes and Color. In *Carotenoids in Nature* (pp. 35-69). Springer International Publishing.
- [28] Stange, C., Fuentes, P., Handford, M., & Pizarro, L. (2008). *Daucus carota* as a novel model to evaluate the effect of light on carotenogenic gene expression. *Biological research*, 41(3), 289-301.
- [29] Baranska, M., Baranski, R., Schulz, H., & Nothnagel, T. (2006). Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta*, 224(5), 1028-1037.
- [30] Clotault, J., Peltier, D., Berruyer, R., Thomas, M., Briard, M., & Geoffriau, E. (2008). Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *Journal of Experimental Botany*, 59(13), 3563-3573.
- [31] Fuentes, P., Pizarro, L., Moreno, J. C., Handford, M., Rodríguez-Concepción, M., & Stange, C. (2012). Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant molecular biology*, 79(1-2), 47-59.

- [32] Sandmann, G., Römer, S., & Fraser, P. D. (2006). Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metabolic engineering*, 8(4), 291-302.
- [33] Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research*, 43(3), 228-265.
- [34] Pérez-Massot, E., Banakar, R., Gómez-Galera, S., Zorrilla-López, U., Sanahuja, G., Arjó, G., ... & Dashevskaya, S. (2013). The contribution of transgenic plants to better health through improved nutrition: opportunities and constraints. *Genes & nutrition*, 8(1), 29-41.
- [35] Akhtar, S., Ahmed, A., Randhawa, M. A., Atukorala, S., Arlappa, N., Ismail, T., & Ali, Z. (2013). Prevalence of Vitamin A Deficiency in South Asia: Causes, Outcomes, and Possible Remedies. *Journal of Health, Population, and Nutrition*, 31(4), 413–423.
- [36] Giuliano, G., Tavazza, R., Diretto, G., Beyer, P., & Taylor, M. A. (2008). Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in biotechnology*, 26(3), 139-145.
- [37] Alós, E., Rodrigo, M. J., & Zacarias, L. (2016). Manipulation of carotenoid content in plants to improve human health. In *Carotenoids in Nature* (pp. 311-343). Springer I
- [38] Naik, P. S., Chanemougasoundharam, A., Khurana, S. P., & Kalloo, G. (2003). Genetic manipulation of carotenoid pathway in higher plants. *Current Science*, 1423-1430.
- [39] Maass, D., Arango, J., Wüst, F., Beyer, P., & Welsch, R. (2009). Carotenoid crystal formation in Arabidopsis and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS One*, 4(7), e6373.
- [40] Lindgren, L. O., Stålberg, K. G., & Höglund, A. S. (2003). Seed-specific overexpression of an endogenous Arabidopsis phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll, and abscisic acid. *Plant physiology*, 132(2), 779-785.
- [41] Busch, M., Seuter, A., & Hain, R. (2002). Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, 128(2), 439-453.
- [42] Li, F., Vallabhaneni, R., & Wurtzel, E. T. (2008). PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiology*, 146(3), 1333-1345.
- [43] Welsch R, Wust F, Bar C, Al-Babili S, Beyer P. (2008). A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiology* 147:367-380.
- [44] Fraser Welsch, R., Wüst, F., Bär, C., Al-Babili, S., & Beyer, P. (2008). A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiology*, 147(1), 367-380.
- [45] Fantini, E., Falcone, G., Frusciante, S., Giliberto, L., & Giuliano, G. (2013). Dissection of tomato lycopene biosynthesis through virus-induced gene silencing. *Plant physiology*, 163(2), 986-998.
- [46] 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). *Seminario de título de Bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso*.

- [47] Acevedo, O. (2011). Evaluación de la funcionalidad de los genes fitoeno sintasa (Psy1 y Psy2) de *Daucus carota* en el modelo vegetal *Nicotiana tabacum*. *Seminario de título de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.*
- [48] Acevedo, O. (2013). Evaluación de la funcionalidad del gen de la fitoeno sintasa 2 (DcPsy2) de *Daucus carota* y su participación en la tolerancia al estrés salino en el modelo vegetal *Nicotiana tabacum*". *Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.*
- [49] Simpson, K. (2015). *Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.*
- [50] Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant molecular biology reporter*, 11(2), 113-116.
- [51] Doyle, J. J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- [52] Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- [53] Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*.
- [54] Mercadante, A. Z., Egeland, E. S., Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2004). Carotenoids handbook. *Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds.*
- [55] Molineros, L. (2017). Transformación estable de *Daucus carota* con los genes carotenogénicos *DcPsy1* y *DcPsy2* y la localización subcelular de *DcPSY1*. *Seminario de título de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile*
- [56] Barraza, H. (2015). Evaluación de la tolerancia a estrés abiótico en plantas de tabaco que expresan genes de síntesis de carotenoides. *Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile*
- [57] Morosinotto, T., Caffarri, S., Dall'Osto, L., & Bassi, R. (2003). Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Physiologia Plantarum*, 119(3), 347-354.
- [58] Ruiz-Sola, M. Á., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., Rodríguez-Concepción, M., & Rodríguez-Villalón, A. (2014). A root specific induction of carotenoid biosynthesis contributes to ABA production upon salt stress in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 9(3), e90765.
- [59] Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylidès, C., & Havaux, M. (2012). Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14), 5535-5540.
- [60] Moreno, J.C., Cerda A., Simpson K., Lopez-Diaz I, Carrera E, 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. *Journal of Experimental Botany*. 67(8) 2325-38 DOI:10.1093/jxb/erw037