



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Estudio funcional de los genes *DcPAR1* y *DcPIF3* en raíz de zanahoria (*Daucus carota*).

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

Felipe Andrés Durán Silva

Directora

Claudia Stange Klein, PhD
Departamento de Ciencias,
Centro de Biología Molecular
Vegetal, Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Patrocinante

Lorena García Nannig, PhD
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, septiembre, 2019

Índice de contenidos

Abreviaturas.....	I
Índice de tablas.....	II
Índice de figuras.....	III
1 Introducción.....	1
1.1 Carotenoides: estructura, función y biosíntesis.....	1
1.2 Regulación de la biosíntesis de carotenoides en plantas.....	4
1.3 <i>Daucus carota</i> y carotenoides.....	5
1.4 Funciones descritas de PAR1 y PIF3.....	8
2 Hipótesis	10
3 Objetivos	10
3.1 Objetivo general.....	10
3.2 Objetivos específicos	10
4 Materiales y métodos.	11
4.1 Materiales.....	11
4.1.1 Material biológico.....	11
4.1.2 Partidores utilizados.....	11
4.1.3 Soluciones.....	11
4.1.4 Softwares.....	12
4.2 Metodos.....	14
4.2.1 Extracción de ARN.....	14
4.2.2 Electroforesis en gel de agarosa.....	15
4.2.3 Reacción de Retrotranscripción (RT).....	15
4.2.4 RT-PCR cuantitativo.....	16
4.2.5 Preparación de células de <i>Escherichia coli</i> cepas DH5 α quimiocompetentes.....	18
4.2.6 Preparación de células <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 quimiocompetentes.....	18
4.2.7 Transformación de <i>E. coli</i>	19
4.2.8 PCR de colonias.....	19
4.2.9 Extracción de ADN plasmidial.....	21
4.2.10 Obtención de los vectores PIF3-N y PIF3-C.....	21
4.2.11 Verificación de la recombinación mediante digestión enzimática.....	23
4.2.12 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
4.2.13 Ensayo de Complementación Bimolecular Fluorescente.....	24
4.2.14 Tratamiento de las imágenes.....	25

4.2.15 Análisis estadístico.....	25
5 Resultados	26
5.1 Determinar la interacción directa entre las proteínas	
DcPIF3 y DcPAR1.....	26
5.1.1 Generación de los vectores de expresión.....	26
5.1.2 Transformación de bacterias <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con	
vectores generados.....	29
5.1.3 Evaluación de la interacción entre las proteínas DcPIF3 y	
DcPAR1 mediante ensayo BiFC en hojas de <i>Nicotiana</i>	
<i>benthamiana</i>.....	30
5.2 Evaluación de la expresión diferencial de <i>DcPIF3</i> y <i>DcPAR1</i> en la	
raíz de reserva de zanahoria crecida en oscuridad y luz a las 4, 8 y 12	
semanas mediante qRT-PCR.....	32
6 Discusión.....	37
6.1 Generación de vectores.....	37
6.2 Verificación de la interacción entre DcPAR1 y DcPIF3 mediante	
ensayo BiFC.....	38
6.3 Expresión relativa de los transcritos <i>DcPAR1</i> y <i>DcPIF3</i> en el	
desarrollo de la raíz de zanahoria.....	39
7 Conclusiones.....	42
8 Referencias.....	43
9 Anexos.....	45

Abreviaturas

EROs: especies reactivas de oxígeno.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario.

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato.

g: gravedad

mL: Mililitro

M: Molar

mM: milimolar

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

PSY: Fitoeno sintasa

μL: Microlitro

μm: Micrometro

ms: milisegundos

V: Voltios

P/V: Peso/Volumen

LRE: elementos de respuesta a luz.

PIF: Factor de interacción con fitocromos.

PAR1: Fitocromo rápidamente regulado 1

bHLH: basic hélix-loop-helix

Ft: Factor de transcripción

R/O: Raíz crecida en oscuridad

R/L: Raíz crecida en presencia de luz

cFt: co-Factor transcripcional

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa.

Índice de tablas

Tabla 1. Partidores utilizados en este trabajo.....	13
Tabla 2. Perfil térmico empleado en la amplificación de DcActina4.	16
Tabla 3. Reactivos y cantidades utilizadas en la reacción RT.....	16
Tabla 4. Perfil térmico de la reacción de RT.....	17
Tabla 5. Lista de partidores utilizados para la amplificación mediante PCR de colonias de los distintos vectores y el tamaño del fragmento amplificado.....	20
Tabla 6. Perfil térmico utilizado en la reacción de PCR para corroborar las bacterias de <i>E.coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> transformadas con PDA1, PDA2, pYFN, pYFC, PIF3-N y PIF3-C.....	20
Tabla 7. Perfil térmico de la reacción de PCR con los partidores 35s F y nosT R para las colonias de <i>A. tumefaciens</i> transformadas con PDA1 y PDA2.....	21
Tabla 8. Vectores utilizados en esta memoria de título.....	22

Índice de figuras

Figura 1. Vía de síntesis de carotenoides en plantas.....	5
Figura 2. Activación de la transducción de señales en el proceso de fotomorfogenesis inducida por luz.....	5
Figura 3. Desarrollo de la raíz de reserva de zanahoria a las 4, 8 y 12 semanas.....	7
Figura 4. Acumulación de carotenoides durante el desarrollo de la raíz de zanahorias de la variedad <i>Nantesse</i>	8
Figura 5. Esquema de los vectores de expresión utilizados en este trabajo.....	23
Figura 6. Análisis de las colonias de <i>E. coli</i> transformadas con los vectores pYFN, pYFC, PDA1 y PDA2 mediante PCR.....	26
Figura 7. Correcta recombinación del vector PIF3-C corroborada mediante digestión enzimática del ADN plasmidial de las colonias transformadas con PIF3-N y PIF3-C.....	28
Figura 8. Corroboración de la recombinación de los vectores PIF3-N mediante amplificación de DcPIF3-NOST a partir de colonias transformadas con vectores PIF3-N.....	29
Figura 9. Análisis de la transformación de bacterias <i>A. tumefaciens</i> con pYFN, pYFC, PIF3-N, PIF3-C, PDA1, PDA2.....	30
Figura 10. Interacción entre las proteínas DcPIF3 y DcPAR1	31

Figura 11. Integridad de las muestras de ARN mediante electroforesis en gel de agarosa.....	33
Figura 12. Análisis de la calidad del ADNc de raíz de <i>D.carota</i> de 8 semanas.....	34
Figura 13. Niveles de expresión relativa del gen <i>DcPARI</i> durante el desarrollo de la raíz de reserva de <i>D. carota</i> y en condición luz y oscuridad.....	35
Figura 14. Niveles de expresión del gen <i>DcPIF3</i> durante el desarrollo de la raíz de reserva de <i>D. carota</i>	36
Figura 15. Modelo del mecanismo de regulación de la síntesis de carotenoides en raíz de zanahoria.....	41

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, proteger contra el estrés fotooxidativo y como precursores del ácido abscísico (ABA).

La carotenogénesis ocurre en los tejidos fotosintéticos, donde la activación de los fotoreceptores por la luz promueve la degradación de los factores de transcripción (Ft) PIF los cuales tienen un efecto negativo en la fotomorfogénesis y la expresión de genes carotenogénico como el gen *PSY*.

Daucus carota (zanahoria), se caracteriza por acumular grandes cantidades de carotenoides en su raíz de reserva y tener relevancia agronómica en nuestro país. Contrario a lo reportado en otros modelos vegetales, en la raíz de zanahoria, la luz inhibe la síntesis y acumulación de carotenoides.

Con el fin de dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen a este fenómeno, es que se realizó un transcriptoma *de novo* (RNA-seq) entre la raíz de reserva de zanahorias crecida en oscuridad y en presencia de luz. Distinto a lo esperado y sorprendentemente, se encontraron sobreexpresados genes regulados por luz en la condición de oscuridad y no en presencia de luz. Entre los que se encontraron a *DcPIF3* y *DcPAR1*. Como ya se mencionó, PIF son una familia de Ft que se han relacionado de manera negativa a la síntesis de carotenoides en otros otras plantas modelo, mientras que el segundo (PAR1) es un co factor transcripcional (cFt) involucrado en el proceso de *Shade Avoidance Syndrome* (SAS) y que tiene un efecto positivo tanto en la fotomorfogénesis como en la síntesis de carotenoides al bloquear la función de PIFs mediante la unión directa.

En este trabajo se determinó que la proteína DcPIF3 se localiza en el núcleo donde homodimeriza y heterodimeriza con DcPAR1. También se evaluaron los niveles de expresión de ambos genes a las 4, 8 y 12 semanas de desarrollo en presencia raíz luz y raíz crecida en

oscuridad. Ambos genes presentaron mayores niveles de transcrito en la raíz crecida en oscuridad respecto a la crecida en presencia de luz a las 8 semanas de desarrollo validando los resultados obtenidos en el transcriptoma. Además, se observó que la expresión relativa de *DcPARI* es mayor a las 4 semanas donde no se acumulan carotenoides y luego baja durante el desarrollo en R/O, pero siempre es mayor la expresión relativa que en R/L. Para el gen *DcPIF3* se encontró mayor nivel de transcrito en R/O a 4 y 8 semanas donde la acumulación de carotenoides es nula o baja, mientras que a las 12 semanas donde hay una mayor acumulación de carotenoides, la expresión relativa de *DcPIF3* es menor que a las 8 semanas, existiendo por tanto una correlación favorable entre la expresión del regulador negativo y la abundancia de carotenoides.

Abstract

Functional study of the DcPAR1 and DcPIF3 genes in *Daucus carota* root.

Carotenoids are isoprenoid compounds synthesized by all photosynthetic organisms and some that are not photosynthetic. In plants they fulfill various functions by participating during the process of photosynthesis as accessory pigments, protecting against photooxidative stress and as precursors of abscisic acid (ABA).

Carotenogenesis occurs in photosynthetic tissues, where the activation of photoreceptors by light promotes the degradation of transcription factors (Ft) PIF which have a negative effect on photomorphogenesis and the expression of carotenogenic genes such as the *PSY* gene.

Daucus carota (carrot) is characterized by accumulating large amounts of carotenoids in its reserve root and having agronomic relevance in our country. Contrary to that reported in other vegetable models, in carrot root, light inhibits the synthesis and accumulation of carotenoids.

In order to elucidate the molecular mechanisms underlying this phenomenon, a *de novo transcriptome* (RNA-seq) was performed between the reserve root of carrots grown in darkness and in the presence of light. Unexpected and surprisingly, genes regulated by light were found to be overexpressed in the dark condition and not in light. Among those overexpressed in the dark were found *DcPIF3* and *DcPAR1*. As already mentioned, PIF are Ft that have been negatively related to the synthesis of carotenoids in other model plants, while the second (PAR1) is a co-transcriptional factor (cFt) involved in the process of Shade Avoidance Syndrome (SAS) and which has a positive effect both in photomorphogenesis and in the synthesis of carotenoid by blocking the function of PIFs through direct binding.

In this work it was determined that the protein DcPIF3 is located in the nucleus where it homodimerizes and heterodimerizes with DcPAR1. The expression levels of both genes at 4, 8 and 12 weeks of development root growth in light and dark condition were also

evaluated. Both genes presented higher transcript levels of in the root grown in darkness compared to the flood in the presence of light at 8 weeks of development validating the results obtained in the transcriptome. In addition, it was observed that the relative expression of *DcPAR1* is higher at 4 weeks where carotenoids do not accumulate and then decreases during development in R/O, but relative expression is always higher than in R/L. For the *DcPIF3* gene, a higher level of transcript was found in R/O at 4 and 8 weeks where the accumulation of carotenoids is zero or low, while at 12 weeks where there is a greater accumulation of carotenoids, the relative expression of *DcPIF3* is lower than at 8 weeks, there is therefore a favorable correlation between the expression of the negative regulator and the abundance of carotenoids.

1. Introducción

1.1 Carotenoides: estructura, función y biosíntesis.

Los carotenoides son un grupo de pigmentos naturales liposolubles que pueden ser sintetizados por todos los organismos fotosintéticos como algas, plantas y bacterias además; son sintetizados por otros organismos no fotosintéticos entre ellos algunos hongos y bacterias (Lu y Li, 2008). Éstos presentan una alta distribución en la naturaleza y a la fecha se han descrito más de 700 carotenoides (Britton, 2012).

Desde el punto de vista químico, estas moléculas se clasifican como hidrocarburos compuestos por 8 unidades de isoprenos, con un centro de simetría, en donde se forma una cadena con un patrón de doble enlaces y enlaces simples que les otorga las características de absorber algunas longitudes de onda y su capacidad antioxidativa. La mayoría de los carotenoides derivan de la cadena de polieno con 40 carbonos la cual puede presentar ciclaciones en sus extremos o la adición de diversos grupos funcionales oxigenados que les otorga distintas propiedades físicas y químicas (Namitha, 2010). Es por esto que los carotenoides se clasifican en dos grandes grupos: los carotenos, compuestos únicamente por átomos de carbono e hidrógeno y las xantofilas que además, presentan oxígeno en su estructura (Namitha, 2010).

En plantas, los carotenoides son encargados de conferirle la coloración característica a flores y frutos lo cual atrae a animales e insectos polinizadores para la reproducción y distribución de semillas (Howitt y Pogson, 2006). Por otro lado, funcionan como moléculas estabilizadoras de la membrana celular y tienen la función de pigmentos accesorios cosechadores de luz durante la fotosíntesis debido a que son capaces de absorber en un espectro más amplio de la luz que la clorofila, (Britton, 2012). Además, gracias a su cadena poliénica, protegen a la planta del daño oxidativo causado por el exceso de energía lumínica captada por las clorofilas durante la fotosíntesis y eliminan de manera indirecta especies reactivas de oxígeno (EROs) mediante el ciclo de formación de las xantofilas (Latowski y cols., 2011)

Los animales por su parte no son capaces de sintetizar carotenoides por lo que deben adquirirlo a través de la dieta. Entre las diversas funciones que tienen los carotenoides en animales podemos destacar que son precursores de la vitamina A, fundamental para la salud de la visión (su deficiencia se ha relacionado con la nictalopía y deficiencia macular) y actuando como potenciadores de la respuesta inmune (Hughes, 2001). Por otro lado, su capacidad antioxidante se ha relacionado con la disminución de enfermedades cardiovasculares y de ciertos tipos de cáncer como el de mama, próstata y pulmón (Fraser y Bramley, 2004). Finalmente, los carotenoides son encargados de otorgarles la coloración característica a mamíferos, aves, insectos e invertebrados marinos necesaria para llevar a cabo procesos biológicos como la reproducción (Landrum, 2009).

La biosíntesis de los carotenoides ocurre en casi todos los tipos de plastidios exceptuando a los proplastidios, y se acumulan en grandes cantidades en los cloroplastos de tejidos verdes y en cromoplastos de distintas frutas, raíces y flores (Li y Yuan, 2013). Los carotenoides se sintetizan desde las moléculas de cinco carbonos isopentil difosfato (IPP) y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) obtenidos a través de la vía metil-eritrol-fosfato (MEP) (Rodríguez-Concepción, 2010). Luego, ocurre la condensación de tres moléculas de IPP con una de DMAPP para formar una molécula de veinte carbonos denominada geranyl geranyl difosfato (GGPP), la que es un precursor de la síntesis de clorofilas, tocoferoles, giberelinas, plastoquinonas y carotenoides en la planta (Rodríguez-Concepción y Stange, 2010). El siguiente paso corresponde a la condensación de dos moléculas de GGPP para la formación del fitoeno, el primer carotenoide de la vía carotenogénica (Figura 1). Esta reacción catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY), paso considerado el limitante en la síntesis de carotenoides (Rosas-Saavedra y Stange 2016). El fitoeno sufre una serie de desaturaciones por parte de la fitoeno desaturasa (PDS) y la ζ -caroteno desaturasa para formar el licopeno, un carotenoide de color rojo con once doble enlaces conjugados. Este pigmento puede ser ciclado en los extremos de su cadena poliénica por la enzima licopeno β -ciclase (LCYB), generando el β -caroteno. En el caso de que la ciclación sea realizada en un extremo por la enzima LCYB y en el otro extremo por la enzima ϵ -ciclase (LCYE) se da origen a el α -caroteno.

En este momento el α -caroteno puede ser hidroxilado en sus anillos extremos para producir la luteína, de color amarillo. El β -caroteno por su parte puede sufrir rupturas en sus dobles enlaces, para la formación de estrigolactonas que son fitohormonas encargadas de regular la interacción con micorrizas y la relación con parásitos de plantas (Akiyama y Hayashi, 2006). Además, el β -caroteno luego de una serie de hidroxilaciones y epoxidaciones puede dar origen a las xantofilas y finalmente al ácido abscísico (ABA) (Cunningham y Gantt, 1998). Esta hormona juega un rol esencial en varios procesos de la planta, desde la resistencia al estrés abiótico, la dormancia de semillas y el cierre de los estomas (Vishwakarma y cols., 2017).

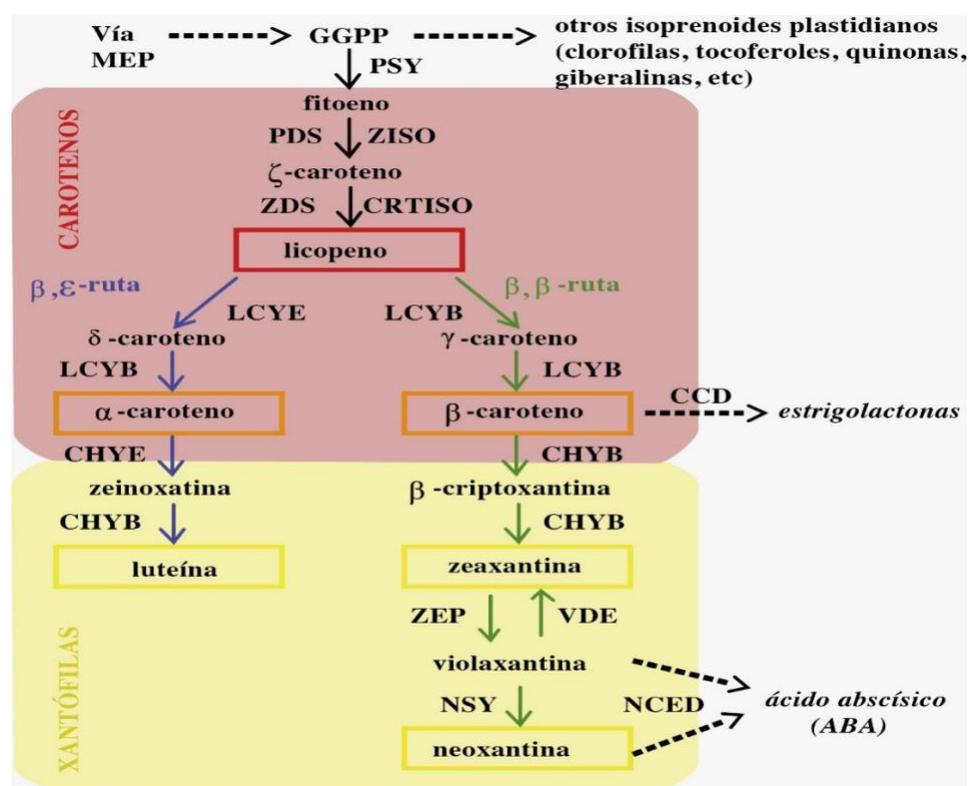


Figura 1. Vía de síntesis de carotenoides en plantas. La biosíntesis de los carotenoides ocurre en los plastidios y comienza con la condensación de dos moléculas de geranyl geranyl difosfato **GGPP** obtenidos de la vía metileritritol 4-fosfato **MEP**. Las flechas discontinuas representan múltiples pasos. En las cajas de colores se encuentran los principales carotenoides de los tejidos de las plantas. Las enzimas se indican en negrita donde: **PSY**, fitoeno sintasa; **PDS**, fitoeno desaturasa; **ZISO**, 15-cis- ζ - caroteno isomerasa; **ZDS**, ζ -caroteno desaturasa; **CRTISO**, carotenoide (pro-licopeno) isomerasa; **LCYB**, licopeno β ciclasa; **LCYE**, licopeno ϵ ciclasa; **CHYE**, carotenoide ϵ hidroxilasa; **CHYB**, carotenoide β hidroxilasa; **ZEP**, zeaxantina epoxidasa; **VDE**, violaxantina deepoxidasa; **NSY**, neoxantina sintasa; **CCD**, cortadora de carotenoides dioxigenasa; **NCED**, 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa. Figura extraída y adaptada de Rodríguez-Concepción y Stange, 2013.

1.2 Regulación de la biosíntesis de carotenoides en plantas.

Debido a la relevancia de los carotenoides en plantas y en animales, es que se ha estudiado la regulación de su vía de síntesis tanto en órganos fotosintéticos (hojas) como en no fotosintéticos (flores, semillas, raíces) de distintas plantas modelos como *Arabidopsis thaliana* (Römer and Fraser, 2005; Howitt and Pogson, 2006). De estos estudios se ha descrito que la luz tiene un efecto positivo en la síntesis de carotenoides durante la transición de etioplastos a cloroplastos (detiolación).

A nivel fenotípico una semilla luego de germinar en oscuridad (escotomorfogénesis) produce una planta etiolada si crece en oscuridad desarrollando un hipocotilo alargado, pálido y sin hojas capaces de realizar fotosíntesis; este fenómeno se le conoce como etiolación. Si la planta se transfiere a la luz, revierte el fenotipo etiolado (detiolación), inhibiendo el crecimiento del hipocótilo, promoviendo la diferenciación de etioplastos a cloroplastos, sintetizando clorofila y carotenoides para el proceso de fotosíntesis. Al proceso de desarrollo de una planta en presencia de luz se le llama fotomorfogénesis (Llorente y cols., 2017). Durante este proceso los fotoreceptores juegan un papel protagónico están involucrados en este proceso (Simkin y cols., 2003). Los fotoreceptores de las plantas incluye a la familia de los fitocromos (PHYA-PHYE) que absorben la luz en longitudes roja y roja lejana, mientras que los criptocromos (CRY) y las fototropinas absorben en el rango entre el azul y el ultravioleta. Los fitocromos son los fotoreceptores más estudiados y se ha demostrado que fluctúa entre dos isoformas: una activa (Pr) luego de absorber luz roja (660 nm) y otra inactiva (Pfr) luego de absorber la luz roja lejana (720 nm). Una vez activos los fitocromos son traslocados al núcleo en forma de homodímeros o heterodímeros (Franklin y cols., 2004) donde ejercen su acción sobre la expresión de genes fotomorfogénicos, entre ellos los genes de síntesis de carotenoides.

En una planta etiolada los factores de transcripción *Phytochrome Interaction Factor* (PIF) se encuentran unidos a los elementos de respuesta a luz (LRE) en los promotores de genes que participan en fotomorfogénesis como los genes carotenogénicos inhibiendo su expresión (Figura 2; Pizarro y Stange, 2009; Stange y Flores, 2012). Luego del estímulo de

luz, se activan los fotoreceptores PHYA y CRY y se traslocan al núcleo en donde interactúan con las proteínas PIF, induciendo su degradación vía proteosoma. Al degradarse las proteínas PIF, factores de transcripción positivos como HY5 se unen a los LRE promoviendo la transcripción de genes involucrados en procesos fotomorfológico y síntesis de carotenoides.

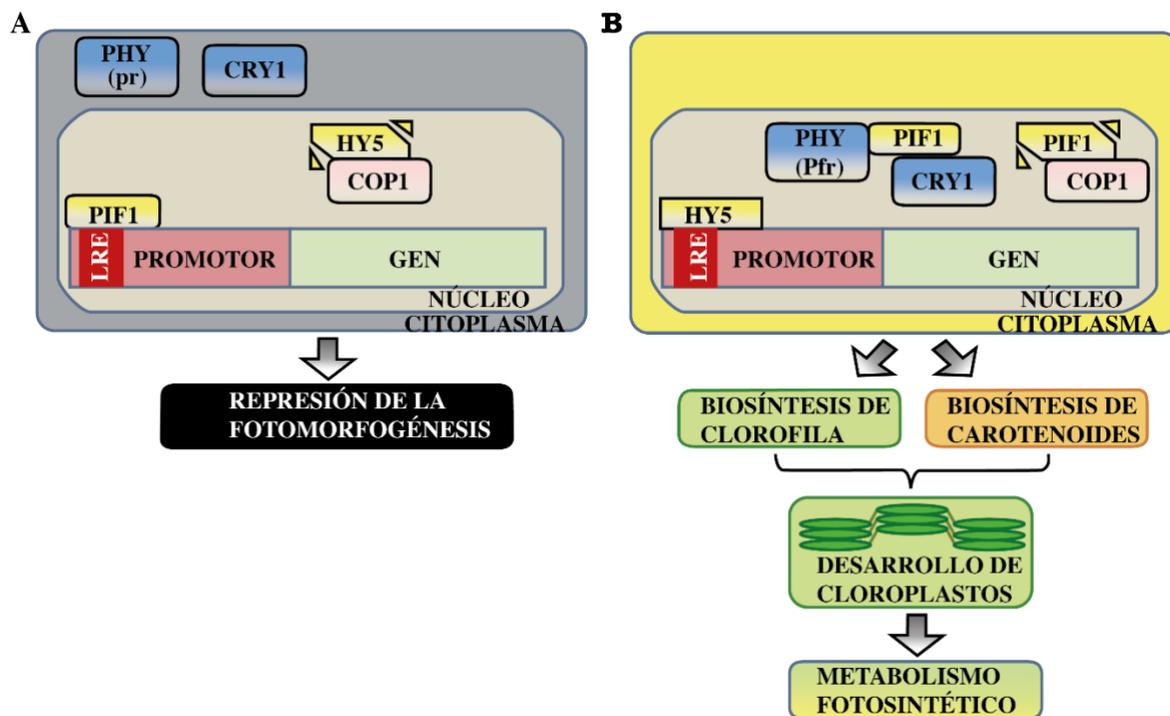


Figura 2. Activación de la transducción de señales en el proceso de fotomorfologesis inducida por luz. En la condición de oscuridad (A) PIF1 se encuentra unido a los elementos LRE de los promotores de los genes reprimiendo la transcripción de estos e inhibiendo la fotomorfologesis. Luego del estímulo lumínico censado por PHY y CRY1 estos traslocan al núcleo (B) donde secuestran a PIF1 el que libera a LRE dejándolo libre para que se una otros FT como HY5 y comience la transcripción de genes de la síntesis de carotenoides y del metabolismo fotosintético. Figura extraída y adaptada desde Stange y Flores, 2012.

1.3 *Daucus carota* y carotenoides.

En nuestro laboratorio se utiliza como modelo de estudio a la zanahoria (*Daucus carota* L.) debido a su relevancia como producto agrícola en nuestro país. Según la encuesta intercensal realizada entre el 2015 y 2016, la zanahoria fluctúa entre la octava y séptima hortaliza más cultivada en Chile (www.ine.cl). Por otro lado, la zanahoria es una de las principales fuentes de carotenoides, logrando acumular hasta 1 mg/g de peso fresco en su raíz de reserva, siendo los principales el α y β -caroteno (Simpson y cols., 2016). *Daucus*

carota es una planta dicotiledónea, de floración bianual, con distintas variedades en donde lo que las distingue es la coloración de su raíz de reserva, debido al perfil de carotenoides que acumulan. Por ejemplo, la zanahoria blanca no acumula carotenoides en su raíz a diferencia de la zanahoria naranja en donde predominan el α y β -caroteno; la zanahoria morada por su parte, acumula antocianinas además de carotenoides y la zanahoria roja acumula cantidades elevadas de licopeno (Stange y Rodríguez-Concepción, 2015).

Se ha reportado que la luz inhibe el desarrollo normal de la raíz de zanahoria. Por un lado, la raíz no logra engrosar y a diferencia de la crecida en oscuridad, tiene un color verde (Figura 3). En cortes transversales de raíz de zanahoria de 12 semanas crecida en oscuridad (R/O) o en presencia de luz (R/L), mediante microscopía óptica, se vio que en la segunda condición pese a tener un aspecto de tallo ésta conservaba la estructura típica de una raíz (Baranska y cols., 2006). Sin embargo, a diferencia de R/O que muestra una gran cantidad de cristales de carotenoides, R/L no los presenta. Por el contrario, R/L exhibe elevada composición la clorofila (Fuentes y cols., 2012).

Al cuantificar los carotenoides de R/O y R/L, se observó que el perfil carotenogénico para la condición de luz es similar al de una hoja (con altos niveles de luteína), disminuyendo durante el desarrollo de la raíz. En R/O, por el contrario, hay un incremento en la acumulación de carotenoides desde las 8 semanas hasta alcanzar un máximo de 1 mg/g de peso fresco de carotenoides a las 12 semanas (Figura 4), siendo los principales el α y β -caroteno (Rodríguez-Concepcion y Stange, 2013).

Junto a ello, se determinó que los niveles de transcrito de algunos genes de la vía carotenogénica como *PSY 1 y 2*, *LCYB1*, *ZDS*, *PDS*, disminuyen en R/L y aumentan en R/O en correlación con el perfil de carotenoides, concluyendo que en la raíz de *Daucus carota* la luz promueve la acumulación de clorofila y afecta negativamente la síntesis de carotenoides y la abundancia de transcritos de genes clave (Fuentes y cols., 2012).

Para comprender los mecanismos moleculares que participan en el proceso de síntesis de carotenoides y la inhibición por luz en zanahorias, se realizó una secuenciación del

transcriptoma a las raíces de zanahoria de 8 semanas crecidas en R/O y R/L. Se obtuvo así un transcriptoma *de novo* (ya que no estaba disponible el genoma de *Daucus carota* como referencia). Este transcriptoma contaba con 63124 contings de los que aproximadamente 15427 estaban sobreexpresados en R/O mientras que 3022 se encontraban sobreexpresados en R/L. De los genes sobreexpresados en R/O se encontraron genes relacionados a la síntesis de fitohormonas, acumulación de azúcares, desarrollo de plastidios, acumulación de carotenoides, entre otros. Sorprendentemente se encontraron sobreexpresados genes relacionados a la señalización y fotomorfogénesis inducida por luz dentro de los cuales se encontraban los genes que codifican para fotorreceptores como CRY2, PHYA y PHYB; los factores de transcripción *Far Red Impaired Response 1* (FAR1), *Far Red Elongated Hypocotyls 3* (FHY3), *Phytocrome Rapidly Regulated 1* (PAR1) y *PIF3* (Arias, 2019). En nuestro grupo, se están estudiando algunos de estos genes y en esta memoria de título se aportará el estudio de los genes *DcPAR1* y *DcPIF3*.

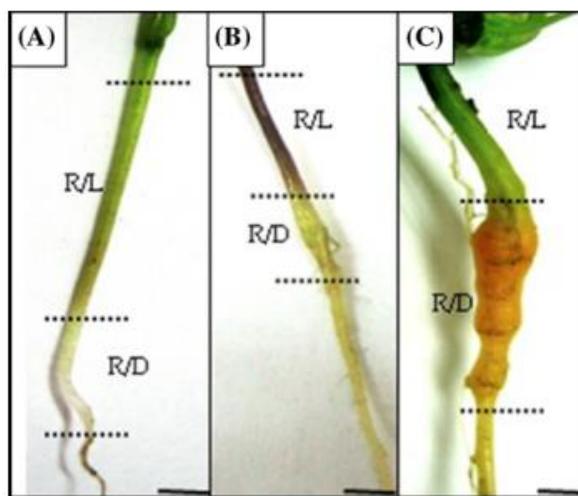


Figura 3. Desarrollo de la raíz de reserva de zanahoria a las 4, 8 y 12 semanas. Raíces de (A) 4 semanas, (B) 8 semanas (C) 12 semanas, de crecimiento. En todas las imágenes **R/L** es la porción de la raíz que creció expuesta a luz. **R/D** segmento que creció bajo la tierra en oscuridad y se desarrollará en una raíz de reserva. Imagen extraída de Fuentes y cols., 2012.

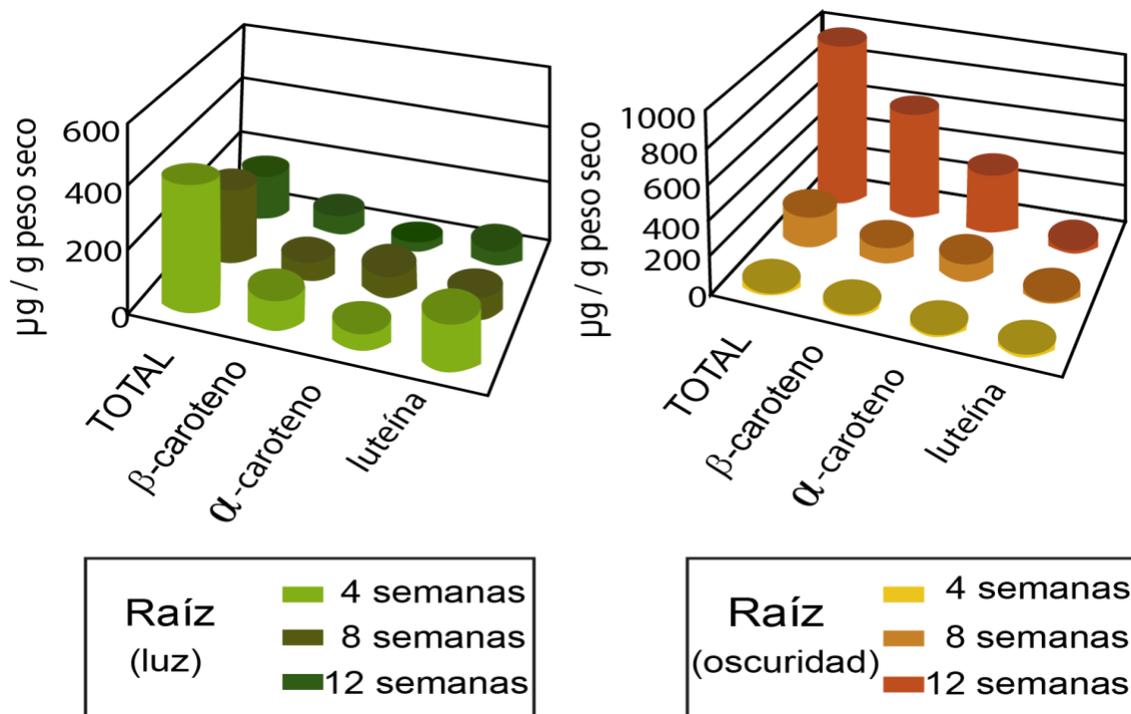


Figura 4. Acumulación de carotenoides durante el desarrollo de la raíz de zanahorias de la variedad *Nantesse*. Contenido y composición de carotenoides durante el desarrollo de segmentos radiculares expuestos a la luz (izquierda) o crecidos en oscuridad (derecha). Imagen extraída y adaptada de Rodríguez-Concepcion y Stange, 2013.

1.4 Funciones descritas de PAR1 y PIF3.

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* PAR1, ha sido descrito como un co-factor transcripcional perteneciente a la familia bHLH (*basic helix-loop-helix*) el cual es un dominio aminoacídico altamente conservado en eucariontes, en donde los factores que los poseen, participan en las vías de metabolismo secundario, diferenciación epidérmica y respuestas a factores ambientales en plantas (Pires y Dolan, 2009). Este dominio de 50-60 aminoácidos se compone de un segmento básico para la unión a ADN (10-15 aminoácidos) y de dos alfa hélices anfipáticas encargadas de la homo y hetero dimerización (Jones, 2004). PAR1 carece del segmento básico para la unión al ADN y por tanto se une a diversos factores que modulan procesos metabólicos de fotomorfogénesis, entre otros. En particular, se le ha asignado un efecto negativo en el síndrome de huida a la sombra (SAS), el cual se refiere al conjunto de respuestas destinadas a adaptar el crecimiento y desarrollo de las plantas en zonas de alta

densidad de plantas cuando hay una disminución en la razón de luz roja (R): roja lejana (FR) (Galstyan y cols., 2011). También se le ha relacionado con un efecto positivo a la fotomorfogénesis debido a que plantas que sobreexpresan este gen presentan una menor elongación del hipocótilo y una mayor apertura del gancho apical respecto a las silvestres, crecidas en oscuridad (Hao y cols., 2012).

Por su parte, PIF3 es un factor transcripcional que presenta el dominio bHLH hacia el extremo carboxilo terminal y hacia el extremo amino terminal presenta secuencias llamadas *Active Phytochrome B-binding* (APB) y *Active Phytochrome B-binding* (APA) que le confieren la capacidad de unirse a los fotorreceptores PHYA y PHYB en el núcleo (Leivar y Quail, 2011). En la literatura, se ha relacionado a este factor transcripcional con diversas funciones biológicas, como ser regulador negativo de la fotomorfogénesis, el desarrollo de cloroplastos, la biosíntesis de carotenoides y por otro lado, ser un inductor del alargamiento del hipocotilo durante de la deetiología de plántulas y en SAS (Kim y cols., 2003; Stephenson y cols., 2009; Toledo-Ortiz y cols., 2010).

Estudios realizados en *Arabidopsis thaliana*, han demostrado que PAR1 actúa como regulador positivo de la expresión del gen *PSY* al interactuar y secuestrar a PIF1 evitando la unión de este último con el promotor del gen *PSY* (Bou-Torrent y cols., 2015). Además, se ha comprobado que PAR1 interactúa con PIF4 evitando que éste último pueda unirse al ADN, evitando así la excesiva elongación del hipocótilo (Hao y cols., 2012).

Con el fin de dilucidar algunos de los mecanismos moleculares por los cuales ocurre la acumulación de carotenoides en la raíz de reserva en *Daucus carota* crecida en oscuridad y la inhibición de este proceso por luz, es que en esta memoria de título se propuso cuantificar la expresión de los genes *DcPIF3* y *DcPAR1* en distintas etapas de desarrollo de la raíz de zanahoria crecida en condiciones de luz y oscuridad. Además, se evaluará la posible interacción entre estas dos proteínas. Estos resultados complementarán la sobreexpresión de los genes *DcPIF3* y *DcPAR1* en *Daucus carota* que se están llevando a cabo en el grupo de investigación con el fin de determinar su funcionalidad y su rol en la síntesis de carotenoides en esta especie.

2 Hipótesis.

DcPAR1 y DcPIF3 interactúan *in vivo* y la expresión relativa de sus genes aumenta durante el desarrollo de la raíz de reserva de *Daucus carota*, en relación directa con el aumento del contenido de carotenoides en esta.

3 Objetivo general.

Determinar la interacción entre las proteínas DcPAR1 y DcPIF3 y la expresión relativa de sus genes en la raíz de reserva de *Daucus carota*, crecida en luz y en oscuridad en distintas etapas de desarrollo.

3.1 Objetivos específicos.

- 1) Determinar la interacción entre las proteínas DcPIF3 y DcPAR1.
- 2) Evaluar la expresión relativa de los genes *DcPAR1* y *DcPIF3* durante el desarrollo de la raíz de reserva crecida en oscuridad (R/O) o expuesta a luz (R/L) .

4. Materiales y Métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Material biológico:

Se utilizaron semillas de *Daucus carota L.* de la variedad *Nantesse* obtenidas de manera comercial. Se germinaron en vermiculita estéril y se dejaron crecer durante 4, 8 y 12 semanas, regando con medio hidropónico 1X y con un fotoperiodo de 16/8 a 24°C. Una vez que el fenotipo coincidiera con el reportado por Fuentes y cols., (2012), se recolectaron las raíces de las zanahorias y se congelaron con nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80° C hasta su uso. También, se sembró *Nicotiana benthamiana*, para utilizar en ensayo BiFC, mantenidas en el laboratorio, para dejarlas crecer en una combinación de tierra de hojas: vermiculita (1:1) con un fotoperiodo 16/8 a 24°C y se regaron con agua. Se utilizaron cuando cumplieron entre 4 a 5 semanas desde su germinación.

4.1.2 Partidores utilizados.

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron partidores diseñados y probados previamente por miembros del grupo de laboratorio, los que aparecen enlistados en la Tabla 1.

4.1.3 Soluciones.

Para la realización de las distintas metodologías llevadas a cabo en esta memoria se utilizaron:

-Medio hidropónico 100X: (hidropónico 100X: KNO₃ 0,125M, Ca(NO₃)₂*4H₂O 0,15M, MgSO₄*7H₂O 0,075M, KH₂PO₄ 0,05M, KCl 0,005M, H₃BO₃ 0,005M, MnSO₄*H₂O 8,5*10⁻⁴M; ZnSO₄*7H₂O= 2,1*10⁻⁴ M, CuSO₄ 1,5*10⁻⁴M, Na₂SO₃Si 8*10⁻³M, EDDHA 8*10⁻³M)

-Tampón CTAB: CTAB 2%; Tris HCl[pH=8] 300mM; EDTA 25 mM; NaCl 2M; Espermidina 0,05%; H₂O tratada con DEPC

-Tampón TE: Tris-HCl 10 mM [pH=8], EDTA 1 mM

-Solución TAE: Tris-acetato 40 mM y EDTA 1mM, pH=8

-Amortiguador de carga de ADN (Fermentas): Gel Loading Dye 6X

-Mix DNAsaI (Thermo Fisher): 1 µL de DNAsaI (1 U/µL), incluyendo 2 µL amortiguador 10X con MgCl₂; y 1 µL de Riboblock (40 U/µL).

-Mix RT-PCR: Buffer ImProm-II 5x (Promega) 4 μ L, MgCl₂ (50 mM) 3 μ L, Riboblock 0,5 μ L (Thermo Fisher), dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP;10 mM) 1 μ L, Transcriptasa Reversa ImProm-II (Promega) 1 μ L, H₂O (libre de nucleasas) 1 μ L

Gel RED (Biotium)

-CCMB80: Acetato de potasio 10 mM, pH=7; CaCl₂*2H₂O 80 mM, MnCl₂*4 H₂O 20 mM, MgCl₂*6H₂O 10 mM, glicerol 10%.

-Enzima de restricción PstI (Thermo Fisher),enzima polimerasa SapphireAmp Fast PCR Master mix (Takara), Forget-Me-Not EvaGreen qPCR Master Mix 2X (Biotium), Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Thermo Fisher) , Medio MS 1X (sacarosa 2%, mioinositol 0,01%)

4.1.4 Softwares

Para la obtención de las temperaturas de *melting* de los partidores se utilizó Oligo Analyzer Tool (www.idtdna.com). Para la visualización y el registro de los geles de agarosa se empleó GeneSnap 7.12 (Syngen). En el cálculo de la eficacia de los partidores se usó LineRegPCR. Análisis estadísticos y creación de gráficos se utilizó Graphpad Prism 7. En el tratamiento de imágenes se utilizó ImageJ y Adobe Photoshop 6C.

Tabla 1. Lista de partidores utilizados en este trabajo donde F= sentido, R= antisentido y Tm= temperatura de fusión.

Partidor	Secuencia	Tm (°C)	Fragmento amplificado
qPAR1F	AAT GCC AAG CCC TTG AGC CAC	60,9	Amplifica región del gen <i>DcPAR1</i> utilizado en qPCR.
qPAR1R	ATC CTC ATC CTC ATC AGC TCC AGT	59,3	
qPIF3F	TGG GTG TTG GGA TGG GTA TGG	59,3	Amplifica región del vector pPIF3-N en PCR de colonias y en qPCR.
qPIF3R	AGC CAC GCC TTG AAA ACT TGC	59,1	Amplifica fragmento del gen <i>DcPIF3</i> en qPCR.
Actina4 F	CACACTTTCTACAATGAGCT	50,1	Amplifica región del gen de <i>DcActina4</i> de <i>Daucus Carota</i> , utilizado para verificar calidad del ADNc.
Actina4 R	GCAGTGATCTCTTTGCTCAT	52,7	
qUbi F	CAAGACAAAGAAGGCATCCCGC	58,8	Amplifica región del gen de <i>DcUbiquitina</i> de <i>Daucus Carota</i> , se utilizó en qPCR.
qUbi R	CTTGGGCTTGGTGTAGGTCTTC	57,7	
Higro F	TTTGTGTACGCCCGACAGTC	57,4	Utilizado para amplificar la región del gen de resistencia a la higromicina en vectores pYFN y pYFC.
Higro R	AAGACCTGCCTGAAACCGAAC	57,7	
nosT R	ATTGCCAAATGTTTGAACGA	51,1	Utilizado en amplificación de región del los vectores PDA1, PDA2, PIF3-N y PIF3-C.
PAR1 F	ATGAAAAACATAACCACCGGAATGG C	58,3	Utilizado en amplificación de región del vector PDA1 y PDA2
35s F	CGCACAATCCCCTATCCTT	52,1	Utilizado en amplificación de región del vector PDA1 y PDA2

4.2 Métodos

4.2.1 Extracción de ARN.

Para la extracción de ARN, se utilizaron 200 mg de raíz de zanahoria crecida en oscuridad o luz y se molieron en un mortero estéril y frío en presencia de nitrógeno líquido hasta formar un polvo fino. Se traspasó el polvo a tubos Eppendorf de 2 mL y se dejaron en nitrógeno líquido hasta terminar la molienda de todas las muestras. Luego, se les agregó 1 mL de amortiguador CTAB y se incubó a 65° C con agitación a suave durante 20 minutos. Se les agregó 1 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogeneizaron en vórtex hasta homogenizar la solución y se centrifugó en frío (4°C) durante 15 minutos a 12000 g. Se recogió la fase superior, se pasó a un tubo de 1,5 mL y se le agregó 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) para volver a centrifugar en las mismas condiciones. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo de 1,5 ml para agregarle ¼ de volumen de cloruro de lito (10 M) y se dejó a -20 °C durante toda la noche. Las muestras se centrifugaron en frío a 12000g por 20 minutos y se descartó el sobrenadante por inversión. Al precipitado se le agregó 1 mL de etanol 70% tratado con DEPC y posteriormente las muestras se centrifugaron en frío a 16000g durante 10 minutos. Luego de terminada la centrifugación, se eliminó el etanol mediante inversión y se dejó secar en papel absorbente estéril. Una vez secas las muestras se resuspendieron en 25 µL de amortiguador TE y se calentaron durante 8 minutos a 55 °C para facilitar la solubilización del ARN. Finalmente, se midió su concentración y pureza en un espectrofotómetro Nanovue (GE Healthcare & Electronics), midiendo los índices de absorbancia 260/280 nm para detectar la presencia de proteínas y de 260/230 para la presencia de compuestos fenólicos y sales. Con el fin de verificar la integridad del ARN, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa como indica el punto

4.2.2.

4.2.2 Electroforesis en gel de agarosa.

Las electroforesis se realizaron a 70V para las muestras de ARN y entre 80-90V para las muestras de ADN durante 20 minutos y entre 45 y 60 minutos, respectivamente. Los geles de agarosa se prepararon entre el 1 y 2% p/v con una solución TAE. Para las muestras de ARN se cargó un volumen total de 7 μ L en los que se encontraba: 1 μ L de ARN, 2 μ L de amortiguador de carga, GEL RED 1X, el resto en agua tratada con DEPC. Por su parte las muestras de ADN se cargaron con amortiguador de carga DNA a una proporción 6:1. Finalmente los geles fueron teñidos durante 15 minutos con bromuro de etidio 1 mg/L y se visualizaron en un transiluminador mediante el software GeneSnap 7.12 con un tiempo de exposición entre 780-820 ms.

4.2.3 Reacción de Retrotranscripción (RT).

Para eliminar posibles trazas de ADN genómico que se pudiesen encontrar en las muestras de ARN, se trataron 7 ng de ARN con 4 μ L del mix DNaseI y se llevaron a 20 μ L de volumen final con agua libre de nucleasas. La reacción se llevó a cabo en un termociclador en donde se incubó por 40 minutos a 37 °C y se detuvo la reacción agregando 1 μ L de EDTA 50 mM e incubando durante 10 minutos a 55 °C.

En la síntesis de la hebra complementaria, se incubaron 9 μ L del ARN tratado y 1,5 μ L de oligonucleótido AP 10 mM. Esta mezcla de reacción se incubó a 70° C durante 15 minutos y segundos antes de que acabase el tiempo se traspasaron los tubos de manera inmediata a hielo y se le agregaron 10,5 μ L del mix RT-PCR. Las muestras fueron posteriormente incubadas con el siguiente programa: 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos, 70°C durante 15 minutos.

Una vez sintetizado el ADNc se verificó su calidad mediante una reacción de PCR con partidores que amplifican un fragmento del gen *DcActina4*. Para realizar esta reacción de PCR se utilizó 1 μ L del ADNc sintetizado y diluido 10 veces. Además, se utilizaron 8 μ L de SapphireAmp Fast PCR Master mix 2X, 8 μ L de H₂O libre de nucleasas y 0,5 μ L de los partidores Actina4 F y Actina4 R (10mM). Se dejó en un termociclador con el perfil térmico

que se especifica en la Tabla 2 y los productos de PCR se resolvieron según indica el punto 4.2.2.

Tabla 2. Perfil térmico utilizado para la amplificación de *DcActina4*.

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)
1	98	00:60
40	94	00:05
	52	00:05
	72	00:10
1	72	00:30

4.2.4 RT-PCR cuantitativo.

Para cuantificar los niveles de transcrito, se usaron las muestras de ADNc obtenidas en la sección 3.5, las cuales fueron diluidas 20 veces. Luego, la reacción se llevó a cabo en tubos de 0,2 mL donde cada reacción contenía (Tabla 3):

Tabla 3. Reactivos y cantidades utilizadas en la reacción RT.

Reactivo	Volumen
Forget-Me-Not EvaGreen qPCR Master Mix 2X	6,5 µL
Partidor F (10 mM)	0,2 µL
Partidor R (10 mM)	0,2 µL
ADNc	4 µL
H ₂ O	2,1 µL

Se determinó la expresión de los genes *DcPIF3*, *DcPAR1* y *DcUbiquitina*, en donde el último corresponde al gen “*housekeeping*” usando los partidores de la Tabla 1. Se utilizaron 3 muestras biológicas y 2 réplicas técnicas de cada una, teniendo así un total de 6

reacciones por condición (R/O y R/L) y dos controles sin templado. Una vez dispuestas las reacciones en los tubos, se llevaron al termociclador Mx3000P (Stratagene) y se amplificaron las secuencias de los genes de interés con el siguiente perfil térmico (Tabla 4):

Tabla 4. Perfil térmico utilizado en la reacción de RT.

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)
1	95	10:00
40	95	00:10
	60	00:15
	72	00:20
1	95	01:00
1	55	00:30
1	95	00:30

Para la obtención de datos comparables es que se igualaron los umbrales de fluorescencia para cada gen en cada condición, utilizando el umbral obtenido por el equipo mismo. Para el caso de la eficiencia de los partidores se calcularon mediante el *software* LineRegPCR.

Se determinaron los valores Ct de cada gen, en cada condición y se incorporaron en la siguiente fórmula (Pfaffl, 2001):

$$R = \frac{(\text{Eficiencia del partidor GOI})^{Ct \text{ promedio} - Ct}}{(\text{Eficiencia del partidor HKP})^{Ct \text{ promedio} - Ct}}$$

donde la eficiencia de los partidores GOI corresponde al valor de los partidores utilizados en los genes *DcPIF3* y de *DcPARI*, determinado como se indicó previamente. La eficiencia del partidor HKP corresponde al valor de eficiencia de *DcUbiquitina*, mientras que R corresponde a las veces de cambio de la expresión del gen de interés GOI respecto al gen de *DcUbiquitina*. El Ct promedio ubicado en el numerador corresponde a los valores Ct promediados del gen en cada condición evaluada (ej 4 semanas R/O) y el ubicado en el denominador corresponde a los valores Ct promediados del gen *DcUbiquitina* en la misma

condición. Una vez obtenidos los valores de R de cada condición se graficaron con el software Graphpad Prism 7.

4.2.5 Preparación de *E. coli* DH5 α quimiocompetente.

Se inocularon 200 μ L de suspensión celular de *E.coli* DH5 α en 5 mL de medio LB y se cultivaron a 37°C por 16 horas y con agitación. Posteriormente, en un matraz estéril, se depositó 250 mL de medio LB líquido y se le agregó 1 mL del cultivo crecido previamente el que se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,3. Una vez alcanzada, se distribuyó en tubos de 50 mL y se centrifugó a 3000g durante 10 minutos a 4°C para descartar el sobrenadante y lavar la pella con amortiguador CCMB80 filtrado y frío. El cultivo se incubó en hielo por 20 minutos y posteriormente centrifugado a 3000g por 8 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado con 2 mL de amortiguador CCMB80 frío. Se juntaron todos los volúmenes y se alicuotaron 200 μ L en tubos de 1,5 mL para almacenarlos a -80°C hasta su uso.

4.2.6 Preparación de células de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 quimiocompetentes.

Se colocaron 5 mL de medio LB líquido al que se le agregó rifampicina hasta una concentración de 10 mg/L y gentamicina 50 mg/L. Posteriormente inocularlo con 200 μ L de *A. tumefaciens* GV3101 y se incubó durante toda la noche a 28°C y con agitación constante. Luego, en un matraz de Erlenmeyer estéril de 125 mL, se depositaron 50 mL de medio LB líquido y 500 μ L del cultivo crecido durante la noche para dejarlo a 28°C con agitación durante 16 horas. Al término de la incubación, el cultivo se dejó en hielo durante 30 minutos y luego se transfirió a tubos de 50 mL para su posterior centrifugación a 4000 g por 10 minutos y a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 5 mL de CaCl₂ 20 mM frío y estéril. Luego, los tubos fueron centrifugados a 4000 g y 4°C durante 4 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en CaCl₂ 20 mM frío.

Finalmente, las células fueron alicuotadas en tubos de 1,5 mL y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

4.2.7 Transformación de *E. coli*.

Con el fin de obtener las bacterias con los plásmidos deseados, es que se utilizaron tubos con 500 µL de suspensión bacteriana quimiocompetente (*Escherichia coli* DH5α en el caso de los vectores de expresión y DB3.1 para los vectores vacíos, obtenidas previamente en el punto 3.7) y se les agregaron 200 ng de ADN plasmidial. La diferencia entre las cepas utilizadas es debido a la presencia del gen *ccdB* en los vectores vacíos el cual codifica para una proteína tóxica llamada CCDB. Esta proteína se une covalentemente a la subunidad GyrA de la ADN girasa mientras está formado el complejo con el ADN escindido, causando la rotura del ADN y la posterior muerte de la célula. Las cepas de *E. coli* DB3.1 codifican la proteína antídoto CCDA, la cual previene la toxicidad de CCDB formando un complejo CCDA-CCDB que permite la sobrevivencia de las bacterias, por otro lado, las cepas DH5α no tienen el gen que codifican la proteína antídoto CCDA lo que culmina con la muerte celular. Este gen, luego de la recombinación homóloga con el vector de entrada es reemplazado por el gen de interés, como *DcPARI* en PDA1 y PDA2. Se incubaron durante 20 minutos en hielo y se les dio un golpe de calor de 45° C por 30 segundos. Inmediatamente se les agregó 1 mL de medio LB a temperatura ambiente y se dejaron a 37° C con una agitación de 150 rpm (agitador orbital) durante 1 hora. Se tomaron 120 µL de la suspensión y se hicieron crecer en una placa con medio LB sólido en presencia de agente de selección kanamicina 50 mg/L. La suspensión se esparció con perlas de vidrio estériles y las bacterias en las placas se dejaron crecer durante 16 horas a 37 ° C. A las colonias aisladas se les confirmó la correcta transformación mediante un PCR de colonias como sale indicado en el punto 3.10. Las colonias transformadas con los vectores PIF3-N y PIF3-C se les realizó una extracción plasmidial, mediante el uso de un sistema comercial según indica el paso 3.2.9.

4.2.8 PCR de colonias.

Con el fin de verificar la correcta transformación de las colonias de *Escherichia coli* y de *A. tumefaciens* aisladas, se les realizó un PCR con distintos partidores según lo indica la siguiente Tabla:

Tabla 5. Lista de Partidores utilizados para la amplificación mediante PCR de colonias de los distintos vectores y el tamaño del fragmento amplificado.

Vector de transformación	Partidores utilizados	Tamaño del amplicón (pb)
pYFN	Higro F + Higro R	624
pYFC	Higro F + Higro R	624
PDA1 (<i>E.coli</i>)	PAR1 F + nosT R	488
PDA2 (<i>E.coli</i>)	PAR1 F + nosT R	488
PDA1 (<i>A. tumefaciens</i>)	35s F + nosT R	1154
PDA2 (<i>A. tumefaciens</i>)	35s F + nosT R	933
PIF3-N	qPIF3 F + nosT R	739
PIF3-C	qPIF3 F + nosT R	739

Se utilizó como muestra de ADN, tocando, con una punta estéril cada colonia crecida de manera aislada desde las placas (previamente numeradas) y se consideró como 1 μ L de solución. Este templado se adicionó a un tubo de PCR de 0,2 mL con un mix compuesto por 8 μ L de SapphireAmp Fast PCR Master mix 2X, 8 μ L de H₂O libre de nucleasas, 0,5 μ L de los partidores F y R (10 mM). Posteriormente, se incubaron las distintas reacciones en un termociclador con los programas detallados en las siguientes tablas.

Los productos de las reacciones de PCR se resolvieron mediante una electroforesis en gel de agarosa según lo indica el punto **3.4**

Tabla 6. Perfil térmico utilizado en la reacción de PCR para corroborar las bacterias de *E. coli* y *A. tumefaciens* transformadas con PDA1, PDA2 pYFN, pYFC, PIF3-Ny PIF3c.

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)
1	98	00:60
35	94	00:05
	50	00:05
	72	00:15
1	72	00:30

Tabla 7. Perfil térmico utilizado en la reacción de PCR con los partidores 35s F y nosT R para las colonias de *A. tumefaciens* transformadas con PDA1 y PDA2.

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)
1	98	00:60
35	94	00:05
	51	00:05
	72	00:15
1	72	00:30

4.2.9 Extracción de ADN plasmidial.

De las colonias positivas por PCR, se tomó una muestra directamente mediante una punta estéril la cual se dejó crecer en 10 mL de medio LB con kanamicina (50 mg/mL), y se dejó creciendo durante 2 días a 37°C con agitación. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 10000g por 5 minutos, el sobrenadante se descartó y se guardó el tubo con la pella. Se prosiguió la extracción del ADN plasmidial mediante el uso del sistema comercial EZNA plasmid DNA Minikit I según las indicaciones del fabricante. Finalmente, se midió su concentración y pureza mediante espectrofotometría, así como se indicó previamente (3.2.1).

4.2.10 Obtención de los vectores PIF3-N y PIF3-C.

Para poder obtener los vectores de expresión PIF3-N y PIF3-C, se realizó un intercambio de inserto entre un vector de entrada (pCR8-PIF3) y uno de destinación pYFN o pYFC, mediante recombinación homóloga. Se llevó a cabo esta reacción mediante una mezcla que contenía 100 ng del vector de entrada (pCR8-PIF3), 150 ng del vector de destinación (pYFN y pYFC), 2 μ L del mix Gateway LR Clonase II Enzyme Mix y se llevó hasta un volumen final de 10 μ L con H₂O. La reacción se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego de completar el tiempo de reacción se confirmó la efectividad de la reacción mediante PCR amplificando con los partidores para *DcPIF3* y el terminador NOS (sección 4.2.8) y mediante ensayo de digestión enzimática (sección 4.2.11). Con los plásmidos que dieron positivos para estas pruebas, se transformaron células de *E.coli* cepa DH5 α quimiocompetentes (sección 4.2.7). Finalmente, se obtuvieron los vectores que aparecen en la siguiente tabla (tabla 8)

Tabla 8. Vectores utilizados en este seminario de título.

Nombre del vector	Referencia	Abreviación
pCR8-PIF3	Tesis de Magíster Jonathan Canales	pCR8-PIF3
pYFC43	Belda-Palazón y cols., 2012	pYFN
pYFN43	Belda-Palazón y cols., 2012	pYFC
pYFN43-DcPAR1	Tesis Doctoral de Daniela Arías	PDA1
pYFC43-DcPAR1	Tesis Doctoral de Daniela Arías	PDA2
pYFN43-DcPIF3	Realizado en esta memoria de título	PIF3-N
pYFC43-DcPIF3	Realizado en esta memoria de título	PIF3-C

Los vectores pCR8-PIF3, PDA1 y PDA2 fueron construidos por nuestro grupo de laboratorio (Canales J, no publicada; Tesis Doctoral de Arias, 2019). Por su parte los vectores vacíos que corresponden a pYFN y pYFC fueron generados por Alejandro Ferrando (Belda-Palazón y cols., 2012) y compartidos por el Dr. Juame Martinez-Garcia Centre for Research In Agricultural Genomics (CRAG), Barcelona, España.

Todos los vectores de destinación tienen en común que el gen de interés está dirigido por el promotor 35s CaMV y en su extremo 3', el terminador de la nopalina sintetasa de *A. tumefaciens* (Figura 5).

A	35s	pYFN-C	NOST
B	35s	pYFN-N	NOST
C	35s	pYFN-N	DcPAR1
D	35s	pYFN-C	DcPAR1
E	35s	pYFN-N	DcPIF3
F	35s	pYFN-N	DcPIF3

Figura 5. Esquema de los vectores de expresión utilizados en este trabajo.

Los vectores (A) vector control pYFC, (B) vector control pYFN, (C) PDA1, (D) PDA2, (E) PIF3-N (F) PIF3-C, 35s: promotor constitutivo perteneciente al virus del mosaico de la coliflor (CaMV), NOST: terminador fuerte del gen de Nopalina Sintasa de *A. tumefaciens*, pYFP-C: corresponde a la secuencia nucleotídica que codifica para la sección carboxilo-terminal de la proteína fluorescente amarilla (YFP), pYFP-N: corresponde a la secuencia nucleotídica que codifica la región amino terminal de YFP, *DcPIF3*: gen de la proteína PIF3 de *D. carota*, *DcPAR1*: gen de la proteína PAR1 de *D. carota*.

4.2.11 Verificación de la recombinación mediante digestión enzimática.

Para determinar la efectividad de la obtención de los vectores mostrados en la figura anterior se combinaron en un tubo Eppendorf 500 ng del producto de la recombinación obtenido en 3.12 y 1 µL de la enzima PstI más 2 µL del amortiguador O10X (Thermo Fisher), llevando a 20 µL con H₂O libre de nucleasas. La mezcla reacción se incubó 2 horas a 37° C y se dejó 8 horas a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción mediante la adición de EDTA a una concentración final de 20 mM. Una vez adicionado el EDTA, los productos de la digestión se resolvieron mediante geles de agarosa, según lo indica el punto 3.4.

4.2.12 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

Las células de *A. tumefaciens* cepa GV3101 quimiocompetentes, obtenidas en el punto 3.2.6, se transformaron con los vectores de destinación (pYFN y pYFC; PDA1 y PDA2; PIF3-N y PIF3-C). Inicialmente, se descongelaron en hielo viales que contenían *A. tumefaciens* almacenados en -80°C y se les agregó 500 ng del vector de destinación, homogenizando con suaves golpes en el tubo procurando no resuspender ni introducir burbujas. Se incubaron los tubos por 20 minutos en hielo y pasado este tiempo se sumergieron en nitrógeno líquido por 5 minutos. Luego, se calentaron a 37 °C en un *termoblock* durante 5 minutos y terminado el tiempo se les agregaron 1 mL de medio LB líquido para dejarlos en agitación a 28°C durante 4 horas. Pasado el tiempo se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente por 2 minutos a 3000g y se eliminó el sobrenadante por inversión. Con los restos de sobrenadante se resuspendió la pella y se plaquearon 120 µL en medio de cultivo LB sólido con en el que se encontraban los agentes de selección (kanamicina 50 mg/mL, gentamicina 50 mg/mL y rifampicina 10 mg/mL) se incubaron las placas por 48 horas a 28 °C y pasado el tiempo se evaluaron colonias aisladas mediante la técnica de PCR.

4.2.13 Ensayo de Complementación Bimolecular Fluorescente (BIFC)

Se inocularon 30 mL de medio LB, con los agentes de selección gentamicina (50 mg/L) y kanamicina (50 mg/L) con 200 µL de un precultivo de *A. tumefaciens* GV3101 transformadas previamente con los vectores PDA1, PDA2, pYFN, pYFC, PIF3-N y PIF3-C, para posteriormente incubarlos por 16 horas en agitación constante a 28°C. Los vectores pYFN y pYFC se utilizaron como controles negativos mientras que los vectores PDA1 y PDA2 se utilizaron como control positivo Para este ensayo, se probaron las siguientes combinaciones de vectores: pYFN: PIF3-C, pYFC: PIF3-N, PDA1: PDA2, PIF3-C: PDA1, PIF3-N: PDA2, PIF3-N: PIF3-C. Al término del tiempo de incubación se centrifugaron los tubos con las bacterias a 5000g por 10 minutos y a 4°C, se resuspendió la pella en 30 mL de medio MS 1x y se ajustó la densidad óptica OD₆₀₀ a 0,700 con el mismo amortiguador, una vez alcanzada la OD₆₀₀ se le agregó Acetosiringona a una concentración final de 10 mM y se incubaron las suspensiones bacterianas por 1 hora a 28° C. Luego de la incubación, se tomaron volúmenes en la razón 1:1 de los vectores a combinar y en una jeringa (por cada

combinación) se procedió a infiltrar 4 hojas, como mínimo, de *N. benthamiana*, haciendo uso de 2 plantas distintas por combinación de vectores. Posterior a la infiltración se dejaron pasar 4 días y se miraron las muestras en un microscopio confocal Zeiss, modelo LSM 710 utilizando el software ZEN. El marcador YFP se excitó con una longitud de onda de 480nm y su emisión fue capturada entre los 503 nm y 594 nm. Con un aumento de 60x.

4.2.14 Tratamiento de las imágenes.

Para el tratamiento de las imágenes se utilizó el software ImageJ en donde se separaron los distintos campos (campo claro, YFP, unidas) y se guardaron en formato TIFF. Los archivos TIFF fueron abiertos en el software Adobe Photoshop 6C en el que se les aplicó el siguiente tratamiento a todas las imágenes: se pasó al modo de color RGB, en la herramienta Filtro se cambiaron los parámetros de intensidad: 10; Conservar detalles: 0%; Reducir ruido: 100%; Enfocar detalles: 0%.

4.2.15 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el software Graphpad Prism 7. Para la comparación entre las condiciones R/O y R/L se utilizó la prueba t de Student con corrección de Welsch. Mientras que para las comparaciones entre los tiempos de desarrollo se realizó un test ANOVA de una vía, considerando un Intervalo de confianza del 95%.

5. Resultados

5.1 Determinar la interacción entre las proteínas DcPIF3 y DcPAR1

5.1.1 Generación de los vectores de expresión

Para abordar este objetivo se debieron generar los vectores PIF3-N y PIF3-C y transformar *E. coli* con estos vectores y con los vectores pYFN, pYFC, PDA1 y PDA2. Inicialmente en el laboratorio contábamos con ADN plasmidial de los vectores pYFN, pYFC, PDA1 y PDA2. Por lo que el primer paso fue transformar bacterias *E. coli* DB3.1 con los vectores vacíos (pYFN y pYFC) y *E. coli* DH5 α con los vectores con el gen *DcPAR1* (PDA1 y PDA2). Después de realizar el proceso de transformación y de obtener colonias aisladas, se procedió a analizarlas mediante PCR (Figura 6).

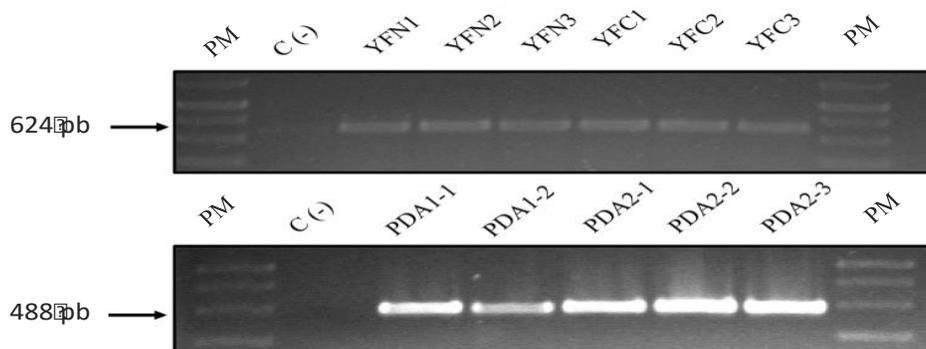


Figura 6. Análisis molecular de las colonias de *E. coli* transformadas con los vectores pYFN, pYFC, PDA1 y PDA2. A) Amplificación de un fragmento del gen de resistencia a higromicina 624pb de las colonias transformadas con los vectores vacíos. YFN1-YFN3 corresponden a las colonias transformadas con pYFN, YFC1-YFC3 las transformadas con pYFC. **B)** Amplificación desde *DcPAR1* hasta el terminador NOST en donde se aprecia la banda de 488pb esperada. PDA1-1 y 2 son las colonias transformadas con PDA1, PDA2-1 y 3 corresponden a las colonias transformadas con PDA2. En ambas imágenes: PM corresponde al marcador de peso molecular GeneRuler 1 Kb DNA. Ladder. C (-) es el control negativo sin ADN templado.

Luego de resolver los productos de PCR, se observó en las 3 colonias transformadas con el vector pYFN y en las 3 transformadas con pYFC el fragmento esperado de 624 pb y que no se pudo observar en el control negativo, lo que sugiere una correcta transformación de las bacterias (Figura 6A). Por otro lado, de las colonias transformadas con PDA1 y PDA2 se amplificaron de una región del gen *DcPARI* hasta una región del terminador NOST y se observó el fragmento esperado de 488 pb en todas las colonias analizadas y que no se vio en el control negativo, sugiriendo también una correcta transformación de las bacterias (Figura 6B).

Se seleccionaron dos colonias de cada ensayo de transformación, que mostraron la amplificación esperada, y se incubaron en medio LB con agente de selección (kanamicina) durante 16 horas para posteriormente realizarles una extracción plasmidial. Los productos de la extracción fueron medidos mediante espectrofotometría obteniendo concentraciones entre 100-180 ng/ μ L y una relación 260/280 y 260/230 cercanos a 2.0 lo que indica su alta calidad. Este ADN plasmidial se usó posteriormente para transformar *A. tumefaciens*.

Luego, se generaron los vectores PIF3-C y PIF3-N mediante recombinación homóloga entre el vector de entrada PCR8-PIF3 (que ya se encontraba disponible y verificado en el laboratorio) y los vectores de destinación pYFN y pYFC lo que permitiría la expresión de la proteína PIF3 fusionada al extremo amino o carboxilo terminal de YFP para el ensayo BiFC (Figura 5). Después de la reacción de recombinación, se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α , se les realizó una extracción plasmidial a las colonias aisladas obtenidas obteniendo una relación 260/280 también cercana a 2.0. A los plásmidos se les analizó mediante digestión enzimática y PCR para corroborar la correcta recombinación. El ensayo de digestión se realizó con la enzima de restricción PstI (como se indicó en **sección 4.2.11**), obteniendo un patrón de bandas que coincidió con el propuesto por el análisis de digestión virtual de los vectores con el programa SnapGene software (from GSL Biotech; available at snapgene.com; Figura 7).

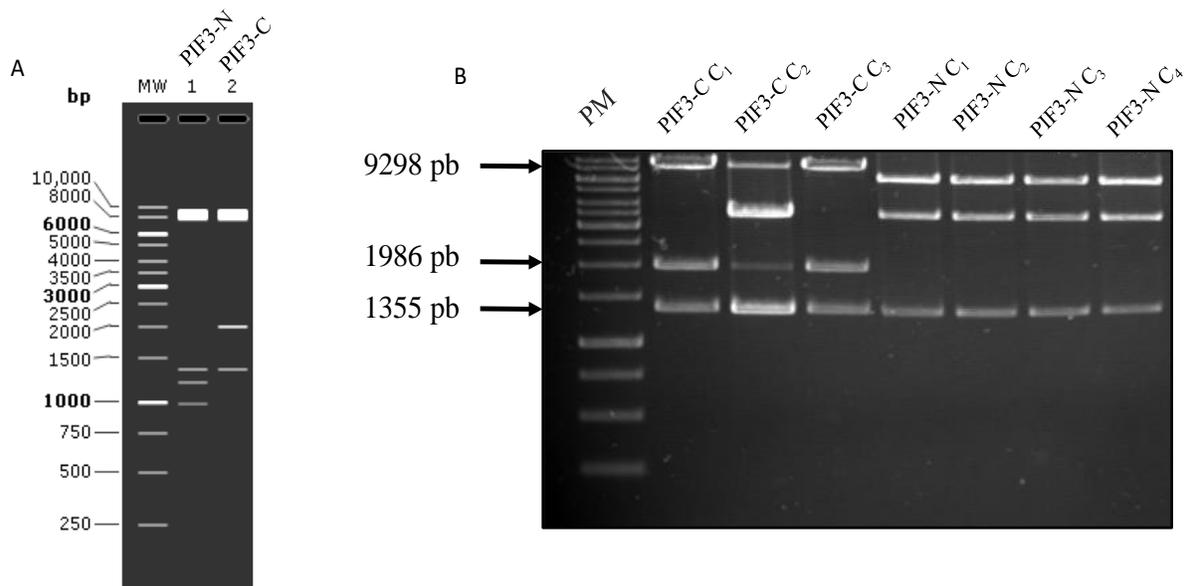


Figura 7. Correcta recombinación del vector PIF3-C corroborada mediante digestión enzimática del ADN plasmidial de las colonias transformadas con PIF3-N y PIF3-C. En (A) el patrón de bandas esperados en PIF3-N y PIF3-C obtenido mediante la digestión virtual de los vectores con el software Snapgene (GSL Biotech), el primer carril tiene el marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb DNA Ladder; en (B) banda esperada de 9298pb que corresponde al esqueleto del vector, la siguiente banda de menor peso molecular esperada es la de 1986pb para *DcPIF3* con una región del promotor 35S, la última banda esperada es de 1355pb para una región de *PIF3*. De izquierda a derecha primer carril mismo marcador de peso molecular, segundo al cuarto carril colonias 1-3 transformadas con PIF3-C, quinto al octavo carril colonias 1-4 transformadas con PIF3-N.

En esta figura se puede ver el mismo patrón en el ADN plasmidial extraído de las colonias 1 y 3 transformadas con PIF3-C. Las bandas marcadas con asteriscos en las figuras muestran una migración parecida a la de la simulación virtual (Figura 7A), por lo que se obtuvieron dos colonias de *E. coli* con los vectores PIF3-C, C1 y C3. El ADN plasmidial de las cuatro colonias transformadas con PIF3-N no mostraron el mismo patrón de bandas que la esperada mediante la digestión virtual (Figura 7A y B). Por esto se les realizó un PCR a las colonias amplificando una zona entre el gen *DcPIF3* y el terminador NOS con partidores específicos utilizando como control positivo el vector PIF3-C (verificado mediante la digestión enzimática). Como observa en la Figura 8, el ADN plasmidial de las 4 colonias PIF3-N muestra el fragmento esperado de 739 pb, corroborando que el gen *DcPIF3* se encuentra clonado en el vector de entrada pYFN.

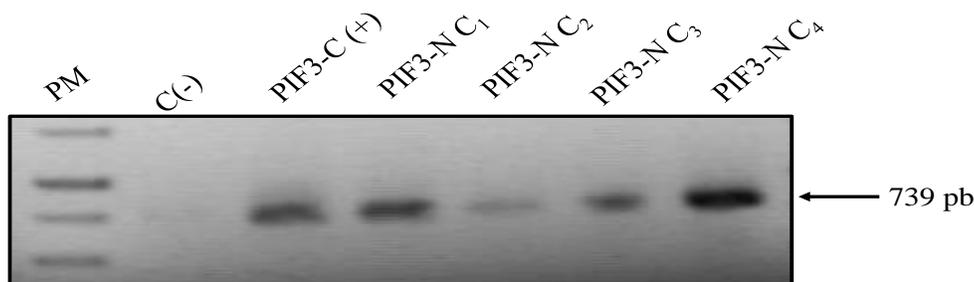


Figura 8. Corroboración de la recombinación de los vectores PIF3-N mediante amplificación de *DcPIF3-NOST* a partir de colonias transformadas con vectores PIF3-N. Se analizaron cuatro colonias PIF3-N, donde se aprecia la amplificación de una banda del tamaño esperado de 739 pb. PM: marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb DNA Ladder C(-): control negativo sin ADN templado, PIF3-C (+): control positivo que corresponde a el vector PIF3-C.

5.1.2 Transformación de bacterias *Agrobacterium tumefaciens* con vectores generados.

Una vez obtenidos todos los plásmidos necesarios para el ensayo BiFC, se procedió a transformar las colonias de *A. tumefaciens* GV3101 con cada uno de ellos y a las colonias aisladas obtenidas se les analizó mediante PCR con la combinación de partidores descritos en la Tabla 5. En la Figura 9 A se muestra el análisis mediante electroforesis del producto de PCR de las colonias de *A. tumefaciens* transformadas con los vectores vacíos y de interés. Se observa el producto de amplificación del gen de higromicina de 624 pb en todas las colonias analizadas. La Figura 9 B muestra el el producto de amplificación de *DcPIF3* realizado a las colonias transformadas con los vectores PIF3-N y PIF3C. Con ello se concluye que la transformación fue exitosa debido a la presencia de una banda con el peso molecular esperado correspondiente de 739 pb. Finalmente, en la figura 9 C se presenta el PCR realizado a las colonias aisladas de las bacterias de *Agrobacterium* transformadas con PDA1 y PDA2, que muestran el fragmento esperado (1154 y 933 pb, respectivamente) de cada una al amplificar desde el promotor 35S hasta el terminador NOST.

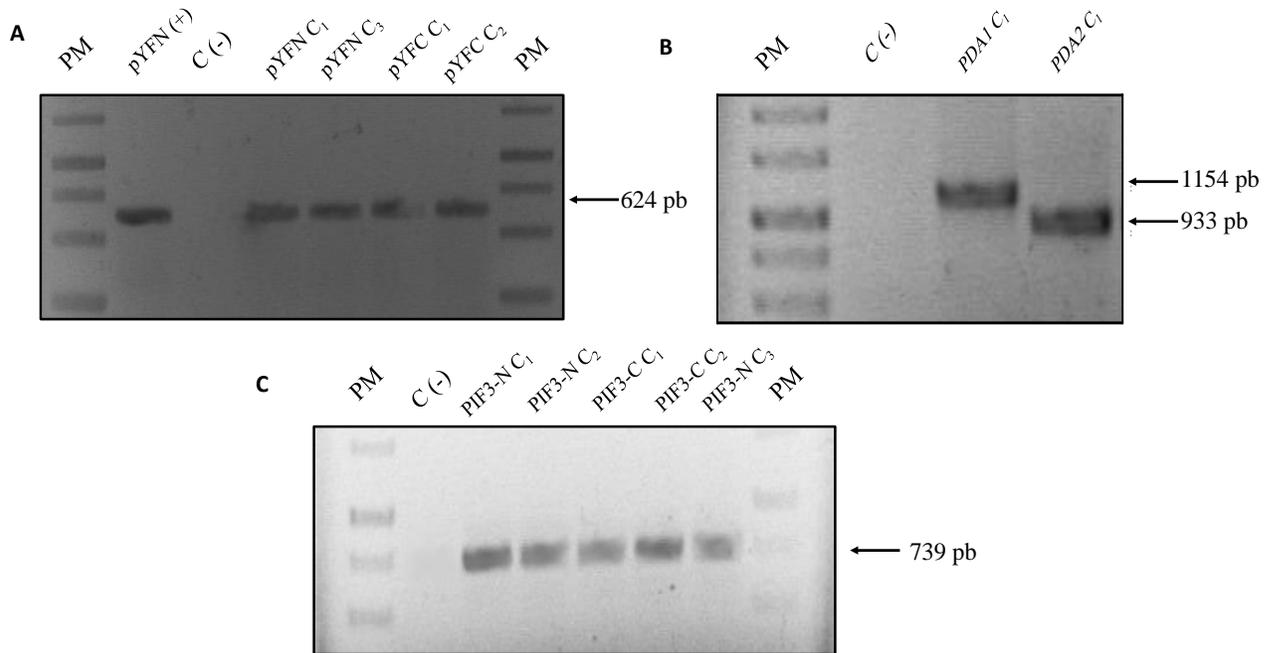


Figura 9. Análisis molecular de la transformación de bacterias *A. tumefaciens* con pYFN, pYFC, PIF3-N, PIF3-C, PDA1, PDA2. **A)** colonias de las bacterias transformadas con pYFN (carriles 4 y 5) y las transformadas con pYFC (carriles 5 y 6). Se utilizó de control positivo el ADN plasmidial extraído previamente, banda del tamaño esperado que es 624 pb. **B)** el análisis a las colonias transformadas con PDA1 y PDA2 (carril 3 y 4 respectivamente), se aprecian las bandas correspondientes al tamaño que se esperaba de 1154 y 933 pb. **C)** colonias transformadas con los vectores PIF3-N (carriles 3 y 4) y las transformadas con PIF3-C (carriles 5, 6 y 7), se indica la banda del tamaño esperado de 739 pb. En todas las imágenes PM: marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb DNA Ladder, C(-): control negativo sin ADN templado.

5.1.3 Evaluación de la interacción entre las proteínas DcPIF3 y DcPAR1 mediante ensayo BiFC en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Para evaluar la interacción entre DcPIF3 y DcPAR1 se realizó un ensayo BiFC el cual se basa en la reconstrucción de una proteína fluorescente tras la coexpresión de sus fragmentos N y C-terminal (no fluorescentes por si solos) fusionados a dos proteínas de interés. Para ello, se transformó de manera transiente hojas de *N. benthamiana* con las cepas de *A. tumefaciens* transformadas previamente con los vectores PIF3-C, PIF3-N, PDA1, PDA2, pYFN y pYFC. Se observó en efecto que ambas proteínas interactúan *in vivo* dado que producto de la unión de las proteínas de interés, se acercan los fragmentos N y C-terminales de YFP, re-estableciendo el fluoróforo funcional. Para este trabajo se evaluó la

formación del homodímero de DcPIF3 y el heterodímero con DcPAR1. La combinación de vectores (**sección 3.2.13**) se utilizó con el fin de tener los controles necesarios para este experimento y los resultados del ensayo se pueden ver en la Figura 10.

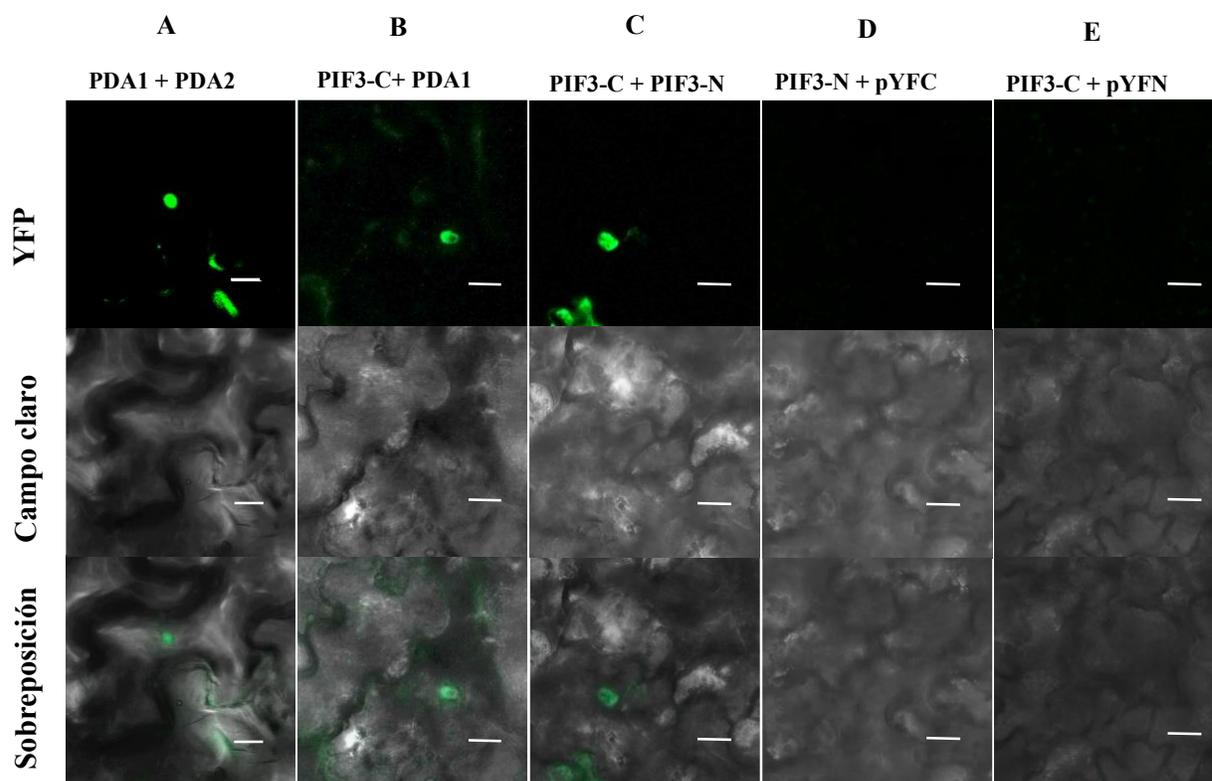


Figura 10. Interacción *in vivo* de las proteínas DcPIF3 y DcPAR1. Las columnas con distintas letras (A, B, C, D, E) corresponden a la combinación de vectores que se expresaron de manera transiente en las hojas de *N. benthamiana*. La fila YFP muestra las imágenes obtenidas luego de excitar la muestra a 488 nm y visualizada en el rango de 503-594 nm. La sobreposición de las imágenes se logró mediante la unión de los canales YFP y Campo claro. Se utilizó un aumento de 60x. Barra blanca representa 20 μm . PDA1: PAR1: YFPNt, PDA2: PAR1:YFPCt, PIF3-C: PIF3:YFPCt, PIF3-N: PIF3:YFPNt, pYFC: vector con YFPCt, pYFN: vector con YFPNt.

La coinfiltración de los vectores PDA1 y PDA2 (Figura 10 A) se utilizó como control positivo debido a que la formación de un homodímero de DcPAR1 ya había sido descrita mediante el mismo ensayo en la Tesis Doctoral de Daniela Arias (Arias, 2019). Basándonos en los dominios HLH, que presentan DcPIF3 y DcPAR1 y que confieren la capacidad de formación de heterodímeros y homodímero es que se esperaba observar fluorescencia en la coinfiltración de los vectores (PDA1 + PIF3-C y PIF3-C + PIF3-N). Así como se puede

observar en la Figura 10 B y C, se puede apreciar la interacción de las proteínas DcPIF3 con DcPAR1 y DcPIF3- DcPIF3 en las hojas de

Cabe destacar que la fluorescencia ocurre en el núcleo de la célula, consistente con la localización nuclear de los factores de transcripción. Los vectores pYFN y pYFC se utilizaron como controles negativos (Figura 10 D y E) dado que no muestran fluorescencia aun estando las regiones N y C terminal de YFP en pYFN con PIF3-C y en pYFC con PIF3-N. En estos controles ambos fragmentos de la proteína YFP no se acercan para ensamblar el fluoróforo lo que demuestra que la interacción de PIF3 y PAR1 es específica y necesaria para restablecer la proteína completa de YFP. De esta forma se concluye, que las proteínas DcPAR1 y DcPIF3 interactúan *in vivo* en un modelo heterólogo y que ambas presentan localización nuclear.

5.2 Evaluación de la expresión diferencial de *DcPIF3* y *DcPAR1* en la raíz de reserva de zanahoria crecida en oscuridad y luz a las 4, 8 y 12 semanas mediante qRT-PCR.

Para determinar si hay diferencias respecto a los niveles de expresión de los genes evaluados en este trabajo durante el desarrollo de la raíz de reserva en asociación con el aumento de carotenoides y si son reprimidos o activados por oscuridad o luz. Se procedió a determinar la abundancia de transcritos de ambos genes en raíces de reservas crecidas durante 4, 8 y 12 semanas con una porción expuesta en luz y otra en oscuridad. Se extrajo ARN y se determinó que las extracciones presentaran concentraciones sobre los 400 ng/ μ L y de alta pureza (valor 260/280 y 260/230 cercanas a 2.0). Una vez medidas las concentraciones de las muestras de ARN, se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa, cada una de ellas, para verificar su integridad, esperando observar las dos bandas características correspondientes a los ARN ribosomales. La Figura 11 muestra el gel de agarosa de las extracciones de ARN de las zanahorias con 4 semanas en donde se pueden visualizar las dos bandas, lo que confirma la integridad del ARN para su posterior uso. Así mismo, se verificó la integridad del ARN con las muestras de 8 y 12 semanas (no mostrado).

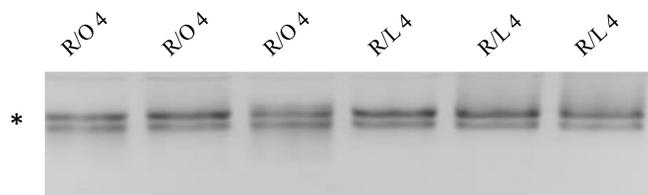


Figura 11. Integridad de las muestras de ARN mediante electroforesis en gel de agarosa. Imagen representativa de las muestras de ARN obtenidas de las raíces de zanahoria. R/O 4 son las muestras de 4 semanas crecidas en oscuridad y R/L 4 son las expuestas a luz, (*) dos bandas correspondientes a los ARN ribosomales 18S y 25S respectivamente.

El siguiente paso fue sintetizar el ADNc mediante la reacción RT-PCR (sección **3.2.3** en Materiales y Métodos). Luego de sintetizado el ADNc se verificó su integridad amplificando un fragmento de la región codificante del gen *DcActina4* en una reacción de PCR a cada una de las muestras (Figura 12) utilizando como control positivo ADN genómico de zanahoria. Como resultado representativo, se muestra la amplificación del fragmento de 695 pb del gen de *DcActina4* en todas las muestras de 8 semanas (R/O y R/L). Como se observa en el control positivo C(+), se detecta una menor migración debido a que los partidores amplifican una región más grande del ADN genómico dado por un intrón en su interior. El hecho de que no muestren la banda de menor migración en las muestras de ADNc confirma que el tratamiento con DNasa I fue eficiente y no dejó trazas de ADN genómico en las muestras. De estos resultados se concluye que el ADNc cumple con los requisitos para realizar el qRT-PCR.

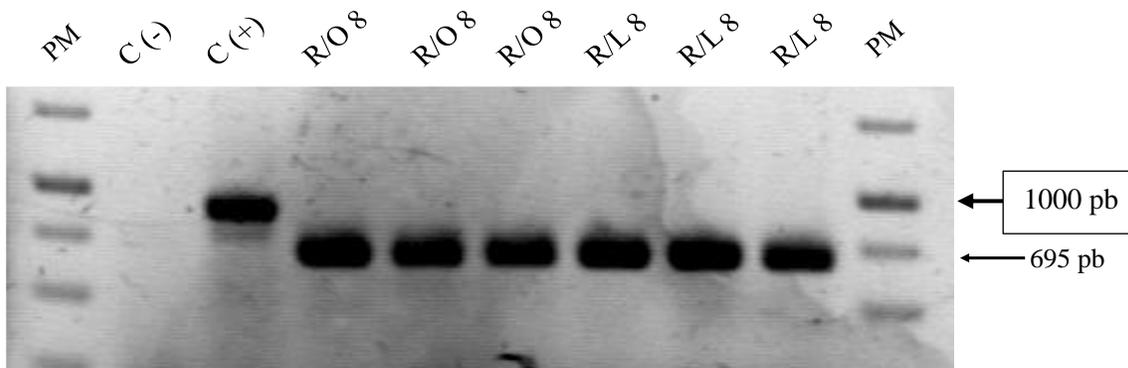


Figura 12. Análisis de la calidad del ADNc de raíz de *D.carota* de 8 semanas mediante PCR. R/O 8: muestras de ADNc sintetizado a partir del ARN extraído de la raíz de reserva de 8 semanas crecida en oscuridad, R/L 8: ADNc sintetizados a partir del ARN de la raíz crecida durante 8 semanas expuesta a luz. Gel representativo de todas las muestras en donde la flecha indica el fragmento de 695 pb esperado, PM: marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb DNA Ladder, C(-): control negativo sin ADN templado, C(+): control positivo con ADN genómico de zanahoria como templado.

Una vez corroborados los ADNc, se procedió a determinar mediante qRT-PCR la abundancia de transcrito del gen *DcPARI* en las distintas etapas de desarrollo y comparando entre las condiciones de oscuridad y luz. Como muestra la Figura 13, a las 4 y 8 semanas hay una mayor expresión en la condición R/O respecto a R/L la cual es significativa. Los resultados obtenidos en raíz de 8 semanas concuerdan con los resultados obtenidos a partir del análisis del transcriptoma (Arias, 2019). Finalmente, a las 12 semanas pese a haber una mayor expresión de *DcPARI* en oscuridad, la diferencia no es significativa. Al analizar las diferencias entre las etapas de desarrollo de R/L y R/O (distintas letras sobre las barras), se observa que en la condición oscuridad, hubo una mayor expresión a las 4 semanas y disminuyó significativamente a las 8 y 12 semanas. En la condición R/L por su parte, las 4 y 12 semanas se detectó una mayor expresión de *DcPARI* en comparación con las 8 semanas, pero menores a R/O de 4 semanas. En resumen, la expresión de *DcPARI* es mayor a las 4 semanas donde no se acumulan carotenoides (ver Figura 4) y luego disminuye durante el desarrollo normal en R/O, pero siempre es mayor que en R/L (Figura 13).

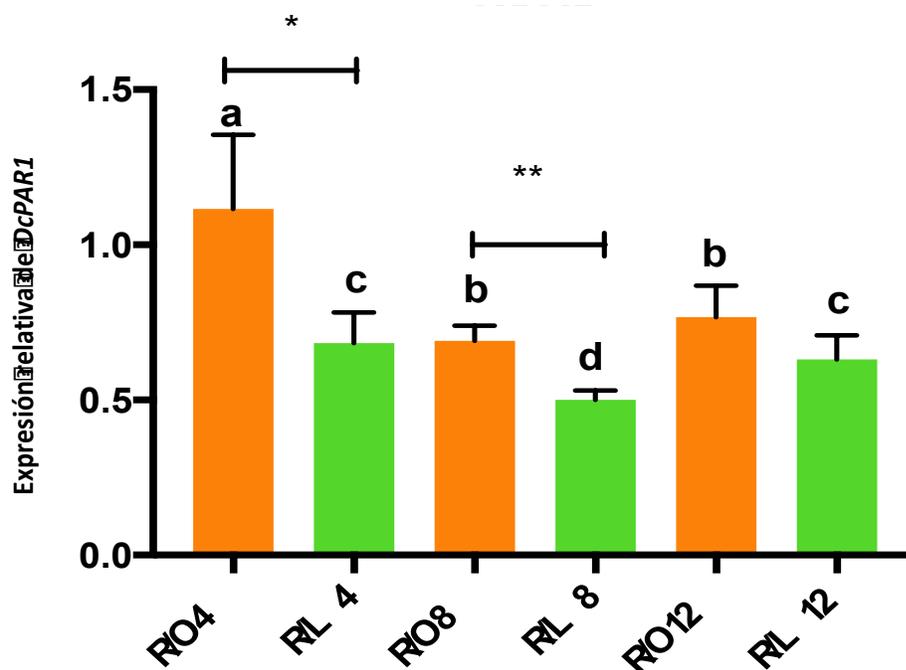


Figura 13. Niveles de expresión relativa del gen *DcPAR1* durante el desarrollo de la raíz de reserva de *Daucus carota* y en condición luz y oscuridad. Se analizaron los niveles de transcrito *DcPAR1* en zanahorias de 4, 8 y 12 semanas crecidas en raíz en presencia de luz (R/L) o en oscuridad (R/O). En cada medición se utilizó la expresión del gen *DcUbiquitina* como normalizador. Las distintas letras indican una diferencia significativa entre las semanas de desarrollo determinada por un test ANOVA de una vía $p > 0,05$. Los asteriscos indican una diferencia significativa entre la raíz a las mismas semanas comparando R/L y R/O determinada por una prueba *t* de Student de dos colas, en donde * $p > 0,05$ y ** $p > 0,005$.

Luego evaluamos la abundancia de los transcritos del gen *DcPIF3* (Figura 14) en donde se observa un comportamiento similar en el caso de las 8 semanas al del gen *DcPAR1*, en donde en oscuridad se ve un aumento significativo en los niveles de transcrito en la condición R/O respecto a la R/L; este aumento es de aproximadamente 4 veces más. Por otra parte, al comparar la expresión relativa en las distintas etapas de desarrollo (diferentes letras sobre las barras), se ve que en el caso de R/O hay una mayor abundancia del transcrito a las 8 semanas respecto a las 4 y 12. Para R/L se ve un aumento significativo a las 12 semanas respecto de las 4 y 8 semanas. En resumen, *DcPIF3* se expresa más en R/O a 4 y 8 semanas donde la acumulación de carotenoides es nula o poca y menos a las 12 semanas donde hay una mayor acumulación de carotenoides (Figura 14).

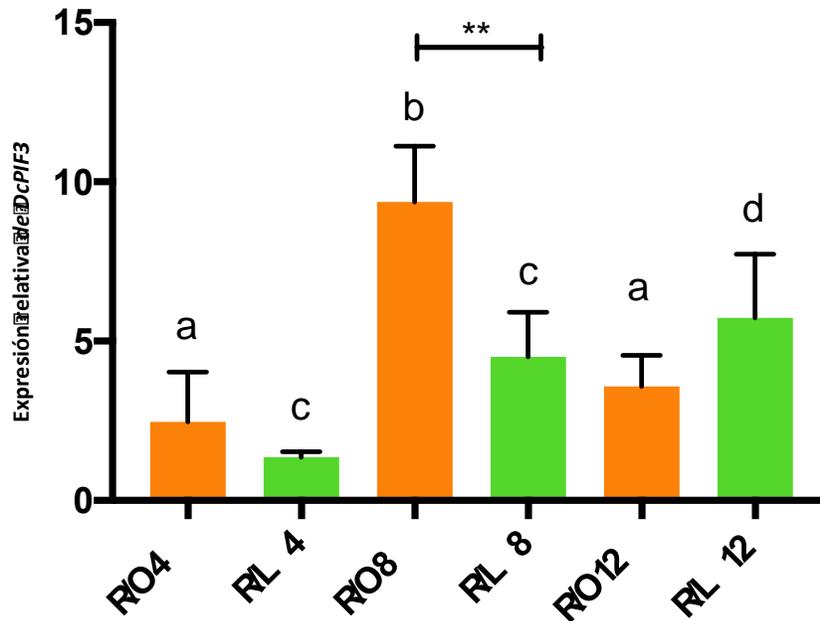


Figura 14. Niveles de expresión del gen *DcPIF3* durante el desarrollo de la raíz de reserva de *Daucus carota*. Se analizaron los niveles de transcrito a zanahorias de 4, 8 y 12 semanas crecidas en presencia (R/L) o ausencia (R/O) de luz, donde para cada medición se utilizó la expresión del gen *DcUbiquitina* como normalizador. Las distintas letras indican una diferencia significativa entre las semanas de desarrollo determinada por un test ANOVA de una vía $p > 0,05$. Los asteriscos indican una diferencia significativa entre la raíz a las mismas semanas comparando R/L y R/O determinada por una prueba *t* de Student de dos colas, en donde ** $p > 0,005$.

6. Discusión

Para tener una comprensión de los eventos y factores moleculares que participan en la biosíntesis y acumulación de carotenoides en la raíz de reserva de *Daucus carota* que se desarrolla en oscuridad, es que se estudiaron los genes *DcPAR1* y *DcPIF3*, ya que en la octava semana de desarrollo estos genes demostraron estar sobreexpresados en la raíz de reserva de 8 semanas crecida en oscuridad, resultado obtenido mediante RNAseq (Arias, 2019). Como antecedente se sabe que las zanahorias transgénicas cuyo gen *DcPAR1* se encuentra silenciado, presentan una raíz delgada y pálida con reducidos carotenoides y baja expresión de genes carotenogénicos. También, se verificó que PAR1 se une a AtPIF7 de *A. thaliana* mediante BIFC. Por ello en esta tesis aportamos en nuevos resultados sobre la función que podrían tener *DcPAR1* y *DcPIF3* en la síntesis de carotenoides en la raíz de zanahoria. Para lograr este objetivo, se realizó un ensayo de unión entre ambas proteínas y se midieron los niveles de expresión de los genes a las 4, 8 y 12 semanas en raíces de zanahorias crecidas en oscuridad o en presencia de luz como se ha realizado previamente con genes directamente relacionados a la ruta carotenogénica. La mayoría de los genes involucrados en síntesis de carotenoides como *DcPSY1*, *DcLCYB1*, *DcLCYB2* mostraron una mayor expresión en la raíz crecida en oscuridad respecto a la crecida en luz (Fuentes y cols., 2012). Por otro lado, estudios previos realizados en *A. thaliana* relacionan positivamente a PAR1 con la expresión del gen *PSY* al interactuar con PIF1, evitando que este último pueda ejercer su efecto negativo en su transcripción (Toledo-Ortiz y cols., 2010).

6.1 Generación de vectores.

En la obtención de los vectores PIF3-N y PIF3-C, mediante recombinación entre el vector de entrada pCR8-PIF3 y cada uno de los vectores de expresión en plantas, corroborado mediante digestión enzimática, las colonias transformadas con PIF3-N mostraron un patrón de bandas distinto a lo esperado (con un menor número de estas y de mayor tamaño). Esto puede deberse a una digestión incompleta la que daría como resultado una menor cantidad de bandas, pero de mayor tamaño como muestra la Figura 7B. Existen distintos motivos por los cuales una digestión podría ser incompleta. En este caso y según las indicaciones del fabricante, se sospecha de la presencia de contaminantes como el SDS, el cual se utiliza

durante la lisis de las células bacterianas; y del etanol utilizado en la limpieza del ADN. La presencia de trazas de estos reactivos puede hacer perder actividad a la enzima de restricción, resultando en una digestión incompleta. Por ello se amplificó un segmento del gen *DcPIF3* hasta el terminador NOST presente en el vector, determinado de este modo que el vector realmente poseía el inserto esperado (Figura 8). Además, este resultado coincide con el control positivo y con el PCR de colonias de *A. tumefaciens*.

6.2 Interacción entre DcPAR1 y DcPIF3.

Las proteínas DcPAR1 y DcPIF3 corresponden a un co-factor transcripcional y un factor transcripcional, respectivamente. Ambas presentan el dominio HLH, el cual confiere la capacidad de formar hétero y homo-dímeros para regular la transcripción de los genes blanco (Toledo-Ortiz y cols., 2003). Pudimos determinar que ambas proteínas presentaban localización nuclear y capacidad de formar homodímeros (Figura 10), lo que concuerda con lo esperado para factores PAR1 y PIF3 funcionales (Bou-Torrent y cols., 2015). Además, determinamos que DcPAR1 y DcPIF3 interactúan in vivo, sumando antecedentes para la funcionalidad de su dominio HLH y complementa resultados previos donde se determinó que DcPAR1 interactúa con PIF7 de *A. thaliana* (Arias, 2019). Pese a estos resultados, la interacción entre estas proteínas debe ser validada por otro método como la co-inmuno precipitación o el ensayo *pull down*. Estos métodos de validación se han realizado en trabajos previos al evaluar la interacción entre PAR1 y PAR2 con PIF4 de *A. thaliana* (Hao y cols., 2012). Pese a los métodos de validación propuestos, para obtener una mejor noción de los eventos moleculares que ocurren en la raíz de zanahoria, en la acumulación de carotenoides, es necesario entender la dinámica de las interacciones entre DcPAR1 y DcPIF3 por lo que un ensayo *Floated-leaf Luciferase Complementation Imaging* (FLuCI) a futuro sería de gran utilidad. En este ensayo, la reconstrucción de la luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis* al aproximarse las proteínas de fusión con los fragmentos N y C no ocurre de manera covalente entre los fragmentos lo que permitiría monitorear el ensamblaje y desensamblaje del complejo proteico a diferencia del ensayo BiFC (Gehl y cols., 2011).

6.3 Expresión relativa de transcritos *DcPAR1* y *DcPIF3* en el desarrollo de la raíz de zanahoria.

De los resultados obtenidos es importante destacar que los niveles de expresión de ambos genes son mayores en la condición 8 semanas R/O comparada 8 semanas R/L coincidiendo y validando los resultados otorgados por el transcriptoma *de novo*.

Dado que *DcPAR1* es un factor necesario para la síntesis de carotenoides y para inducir la expresión de genes carotenogénicos en zanahoria (Arias, 2019) y que además promueve la fotomorfogénesis inhibiendo la función de PIF en *A. thaliana* (Bou-Torrent y cols., 2015), esperábamos que la expresión de *PAR1* tuviera alguna correlación con la expresión de genes carotenogénicos y abundancia de carotenoides en R/O. Al medir los niveles de transcrito del gen *DcPAR1* a lo largo del desarrollo, se observó que a las 4 semanas hubo una mayor expresión del gen en la condición R/O (Figura 12), mientras que a las 8 y 12 disminuyó su expresión significativamente, momento en que la zanahoria comienza a sintetizar y acumular carotenoides (Fuentes y cols., 2012). Estos resultados son interesantes debido a que el co-factor transcripcional *PAR1* ha sido asociado previamente de manera positiva con la expresión del gen *PSY* (Bou-Torrent y cols., 2015), por lo que se esperaba una correlación positiva entre la abundancia de carotenoides y niveles de transcrito *DcPAR1*. Sin embargo, existe una asociación temporal entre la expresión de *DcPAR1* que ocurre mayoritariamente a las 4 semanas y los genes de la ruta carotenogénica, como *PSY1*, *PSY2*, *ZDS2* y *LCYB1* que comienzan a aumentar a las 8 semanas de desarrollo de la raíz de zanahoria (Fuentes y cols., 2012). Se puede sugerir entonces que si a las 4 semanas hay una mayor expresión puede ser indicativo de que en estas etapas de desarrollo comienza a prepararse la maquinaria necesaria para la síntesis de carotenoides en etapas posteriores de desarrollo. Esto concuerda con la expresión el gen *DXS1* que mostró el mismo patrón y codifica para la enzima que participa en la síntesis de precursores de los carotenoides en la vía MEP (Ruiz-Sola y Concepción, 2012). Pese a estos indicios, es necesario medir los niveles de proteína *DcPAR1* en las distintas etapas de desarrollo puesto que el nivel de transcritos muchas veces no tiene una relación directa con la abundancia de proteínas.

Por otro lado, la abundancia del transcrito de *DcPAR1* es mayor en condiciones R/O respecto a R/L concordando con que la expresión del gen *PAR1* en *A. thaliana* es rápidamente inducida por sombra (Roig-Villanova y cols., 2006).

Los factores *PIF* están conformados por una familia de factores de transcripción en *A. thaliana* que son estables en oscuridad (Al-Sady y cols., 2006) y degradados en luz por fitocromos (Flores y Stange, 2012) y luego de unirse a PAR1 (Bou-Torrent y cols., 2015), por lo cual se ha relacionado negativamente con la síntesis de carotenoides (Toledo-Ortiz y cols., 2010), aunque sus funciones son compensadas entre ellos, logrando evidenciar una respuesta solo en mutantes cuádruples de PIF (Leivar y Quail, 2011). Pese a ser un represor del gen *PSY*, la mayor actividad represora se le atribuye a la proteína PIF1 en *A. thaliana* (Toledo-Ortiz y cols., 2010) en plántulas, pero estudios recientes en la raíz de *A. thaliana*, demostraron que de las proteínas PIF1, PIF3, PIF4 y PIF5, ninguna regula la expresión del gen *PSY* en este órgano en específico (Ruiz-Sola y cols., 2014). En *Daucus carota*, el gen *DcPIF3* mostró estar mayormente expresado en R/O de 8 semanas respecto a las 4 y 12 semanas (Figura 13), coincidiendo con el momento del desarrollo de la raíz de zanahoria en donde aumenta la acumulación de carotenoides. Por un lado, su interacción con DcPAR1 podría explicar la capacidad que tienen ambas proteínas de unirse o que en este órgano igualmente sea capaz de sintetizar carotenoides pese a la mayor cantidad de transcritos del gen *DcPIF3*, aunque existe la opción de que DcPIF3 no sea el factor de transcripción regulador de *PSY* en *Daucus carota*. Al igual que en *DcPAR1*, es necesario saber los niveles de proteína que hay a las distintas etapas del desarrollo y en R/L y R/O ya que el hecho de que haya más transcrito no se traduce en una mayor cantidad de proteína necesariamente. Hay que considerar que la regulación de las proteínas PIF por PAR1 ocurre a nivel proteico y no transcripcional y el aumento de *DcPIF3* a las 8 semanas puede ser un sistema compensatorio debido a la baja abundancia de la proteína, pero es algo que se debe aún determinar. Su interacción con la proteína PAR1 sugiere que a las 8 semanas DcPAR1 podría disminuir la actividad represora de DcPIF3 sobre el gen *PSY*. Estudios de plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresen DcPIF3 podrían ayudar a dilucidar el nivel de proteína de PIF3 en condición de luz y oscuridad y si eso afecta su unión al promotor de *PSY* y en consecuencia al nivel de carotenoides. Por otro lado, sería importante indagar sobre la presencia de otros PIFs en el genoma de *Daucus carota* y determinar su expresión y función en *Daucus carota* mediante silenciamiento génico, tal como se hizo para *DcPAR1*.

En base a los antecedentes presentados y los resultados obtenidos es que se propone el siguiente modelo de mecanismo de regulación de genes de la vía de síntesis de carotenoides en la raíz de reserva de zanahoria (Figura 15), bajo el supuesto que el nivel de expresión relativa de los genes en estudio es similar al de la abundancia proteica. La condición luz (R/L, Figura 15A) los fitocromos activos y traslocados dentro del núcleo interactúan con PIF3 e inducen su degradación. Además en esta condición hay bajos niveles de expresión de *DcPAR1* y *DcPIF3* lo que en su conjunto favorecerían que, en presencia de luz, otros factores de transcripción (no determinados todavía) se unan al promotor de genes carotenogénicos como *PSY*, inhibiendo su expresión.

En la condición de oscuridad (R/O Figura 15B) donde hay mayor expresión de *DcPIF3* pero sobretodo de *DcPAR1*, se propone que PIF3 interactúa con PAR1 permitiendo que factores de transcripción positivos se unan a los LRE y se proceda a la transcripción de los genes de la ruta carotenogénica como *PSY*.

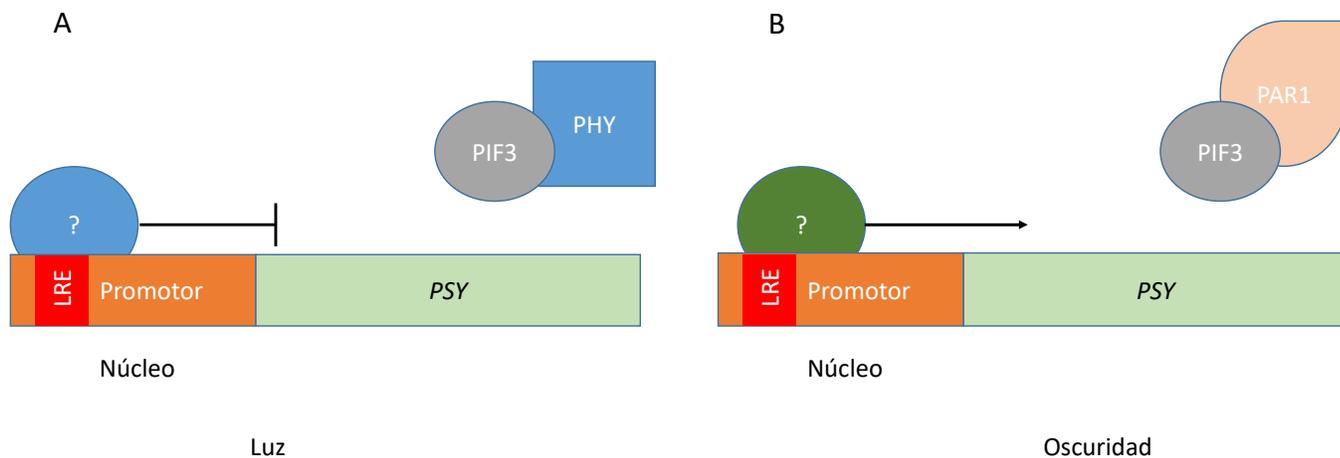


Figura 15. Modelo del mecanismo de regulación de la síntesis de carotenoides en raíz de zanahoria.

En la condición luz (A) PIF3 no puede ejercer su actividad inhibitoria por su degradación inducida por fitocromos. Otros factores de transcripción inhiben la transcripción de genes como *PSY*. En oscuridad (B) la interacción entre PAR1 y PIF3 permite que factores de transcripción positivos transcriban genes de la ruta carotenogénica.

7. Conclusiones

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que:

1. Los genes *DcPIF3* y *DcPARI* codifican para proteínas con localización nuclear capaces de homodimerizar y heterodimerizar, aportando este estudio a su caracterización funcional.
2. La expresión relativa de *DcPARI* y *DcPIF3* se correlaciona parcialmente con la acumulación de carotenoides en la raíz de reserva de *D. carota* crecida en oscuridad o en luz y se requiere determinar la abundancia proteica para vincular a estos factores con un rol positivo o negativo sobre la síntesis de carotenoides en *D.carota*.

8. Referencias

- Akiyama, K., & Hayashi, H. (2006). Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Annals of Botany*, 97(6), 925-931.
- Al-Sady, B., Ni, W., Kircher, S., Schäfer, E., & Quail, P. H. (2006). Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Molecular Cell*, 23(3), 439-446.
- Arias, D. "Estudio del efecto de la luz sobre la acumulación de carotenoides en la raíz de reserva de *Daucus carota*". *Tesis para optar al grado de doctor en biotecnología molecular, Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile*
- Bou-Torrent, J., Toledo-Ortiz, G., Ortiz-Alcaide, M., Cifuentes-Esquivel, N., Halliday, K. J., Martínez-García, J. F., & Rodríguez-Concepción, M. (2015). Regulation of carotenoid biosynthesis by shade relies on specific subsets of antagonistic transcription factors and cofactors. *Plant Physiology*, 169(3), 1584-1594.
- Bramley, P. M. (2002). Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *Journal of Experimental Botany*, 53(377), 2107-2113.
- Baranska, M., Baranski, R., Schulz, H., & Nothnagel, T. (2006). Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta*, 224(5), 1028-1037.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (Eds.). (2012). *Carotenoids: handbook*. Birkhäuser.
- Canales, J "Estudio de la participación de DcPIF3 en la fotomorfogénesis y la síntesis de carotenoides mediante la sobreexpresión en *Arabidopsis thaliana*". *Tesis para optar al grado de magister en ciencias biológicas, Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, 2020*.
- Cunningham Jr F, Gantt E. (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of plant biology* 49(1):557-583.
- Franklin, K. A., Lerner, V. S., & Whitelam, G. C. (2004). The signal transducing photoreceptors of plants. *International Journal of Developmental Biology*, 49(5-6), 653-664.
- Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research*, 43(3), 228-265.
- 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.

- Galstyan, A., Cifuentes-Esquivel, N., Bou-Torrent, J., & Martinez-Garcia, J. F. (2011). The shade avoidance syndrome in Arabidopsis: a fundamental role for atypical basic helix–loop–helix proteins as transcriptional cofactors. *The Plant Journal*, 66(2), 258-267.
- Gehl, C., Kaufholdt, D., Hamisch, D., Bikker, R., Kudla, J., Mendel, R. R., & Hänsch, R. (2011). Quantitative analysis of dynamic protein–protein interactions in planta by a floated-leaf luciferase complementation imaging (FLuCI) assay using binary Gateway vectors. *The Plant Journal*, 67(3), 542-553.
- Hao, Y., Oh, E., Choi, G., Liang, Z., & Wang, Z. Y. (2012). Interactions between HLH and bHLH factors modulate light-regulated plant development. *Molecular plant*, 5(3), 688-697.
- Howitt, C. A., & Pogson, B. J. (2006). Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, cell & environment*, 29(3), 435-445.
- Hughes, D. A. (2001). Dietary carotenoids and human immune function. *Nutrition*, 17(10), 823-827.
- Jones, S. (2004). An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome biology*, 5(6), 226.
- Kim, J., Yi, H., Choi, G., Shin, B., Song, P. S., & Choi, G. (2003). Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *The Plant Cell*, 15(10), 2399-2407.
- Landrum, J. T. (2009). Carotenoids: physical, chemical, and biological functions and properties. CRC Press.
- Latowski, D., Kuczyńska, P., & Strzałka, K. (2011). Xanthophyll cycle—a mechanism protecting plants against oxidative stress. *Redox Report*, 16(2), 78-90.
- Leivar, P., & Quail, P. H. (2011). PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in plant science*, 16(1), 19-28.
- Li, L., & Yuan, H. (2013). Chromoplast biogenesis and carotenoid accumulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 539(2), 102-109.
- Llorente, B., Martinez-Garcia, J. F., Stange, C., & Rodriguez-Concepcion, M. (2017). Illuminating colors: regulation of carotenoid biosynthesis and accumulation by light. *Current opinion in plant biology*, 37, 49-55.
- Lu, S., & Li, L. (2008). Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(7), 778-785.
- Namitha, K. K., & Negi, P. S. (2010). Chemistry and biotechnology of carotenoids. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50(8), 728-760.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.

Pires, N., & Dolan, L. (2009). Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. *Molecular biology and evolution*, 27(4), 862-874.

Pizarro, L., & Stange, C. (2009). Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia e investigación agraria*, 36(2), 143-162.

Rodríguez-Concepción, M. (2010). Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 504(1), 118-122.

Rodríguez-Concepción, M., & Stange, C. (2013). Biosynthesis of carotenoids in carrot: an underground story comes to light. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 539(2), 110-116.

Roig-Villanova, I., Bou, J., Sorin, C., Devlin, P. F., & Martínez-García, J. F. (2006). Identification of primary target genes of phytochrome signaling. Early transcriptional control during shade avoidance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141(1), 85-96.

Römer, S., & Fraser, P. D. (2005). Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta*, 221(3), 305-308.

Rosas-Saavedra, C., & Stange, C. (2016). Biosynthesis of carotenoids in plants: enzymes and color. In *Carotenoids in nature* (pp. 35-69). Springer, Cham.

Ruiz-Sola, M. Á., & Rodríguez-Concepción, M. (2012). Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 10.

Ruiz-Sola, M. Á., Rodríguez-Villalón, A., & Rodríguez-Concepción, M. (2014). Light-sensitive Phytochrome-Interacting Factors (PIFs) are not required to regulate phytoene synthase gene expression in the root. *Plant signaling & behavior*, 9(8), e29248.

Simkin, A. J., Zhu, C., Kuntz, M., & Sandmann, G. (2003). Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*) leaves. *Journal of Plant Physiology*, 160(5), 439-443.

Simpson, K., Cerda, A., & Stange, C. (2016). Carotenoid biosynthesis in *Daucus carota*. In *Carotenoids in Nature* (pp. 199-217). Springer, Cham.

Stange, C., & Flores, C. (2012). Carotenoids and photosynthesis-regulation of carotenoid biosynthesis by photoreceptors. In *Advances in photosynthesis-fundamental aspects*. InTech.

Stange, C & Rodríguez-Concepción, M (2015). "Carotenoid pigments in Carrot". Editor Chen, Chunxian, *Pigments in Fruits and Vegetables: Genomics and Dietetics*, Springer, on line <http://www.springer.com/fr/book/9781493923557>

Stephenson, P. G., Fankhauser, C., & Terry, M. J. (2009). PIF3 is a repressor of chloroplast development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(18), 7654-7659.

Toledo-Ortiz, G., Huq, E., & Quail, P. H. (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *The Plant Cell*, 15(8), 1749-1770.

Toledo-Ortiz, G., Huq, E., & Rodríguez-Concepción, M. (2010). Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(25), 11626-11631.

Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., ... & Sharma, S. (2017). Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in plant science*, 8, 161.

Stephenson, P. G., Fankhauser, C., & Terry, M. J. (2009). PIF3 is a repressor of chloroplast development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(18), 7654-7659.

8. Anexos

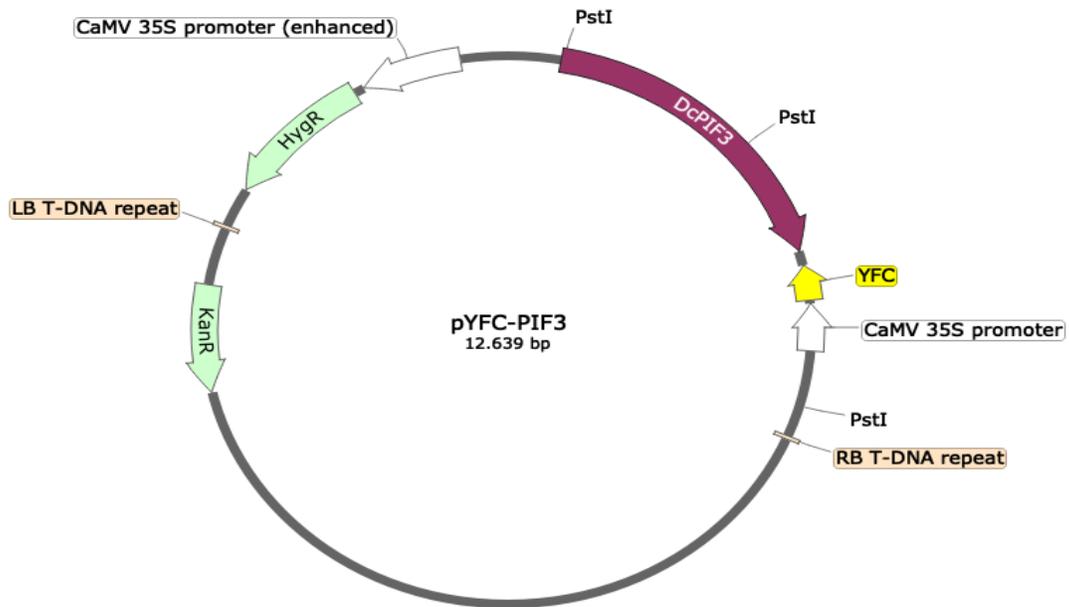


Figura A1. Esquema del vector PIF3-C. Vector de expresión en plantas PIF3-C, cuyo tamaño es de 12.639 pb. KanR: gen de resistencia a la kanamicina, HygR: gen de resistencia a la higromicina, CaMV 35s: promotor del virus mosaico de la coliflor, LB/RB T-DNA repeat: borde izquierdo y derecho del vector que flanquean el ADN que será insertado por *A. tumefaciens*, YFC: gen que codifica para la región carboxilo terminal de la proteína fluorescente YFP, PstI: sitios de corte de la enzima de restricción PstI.

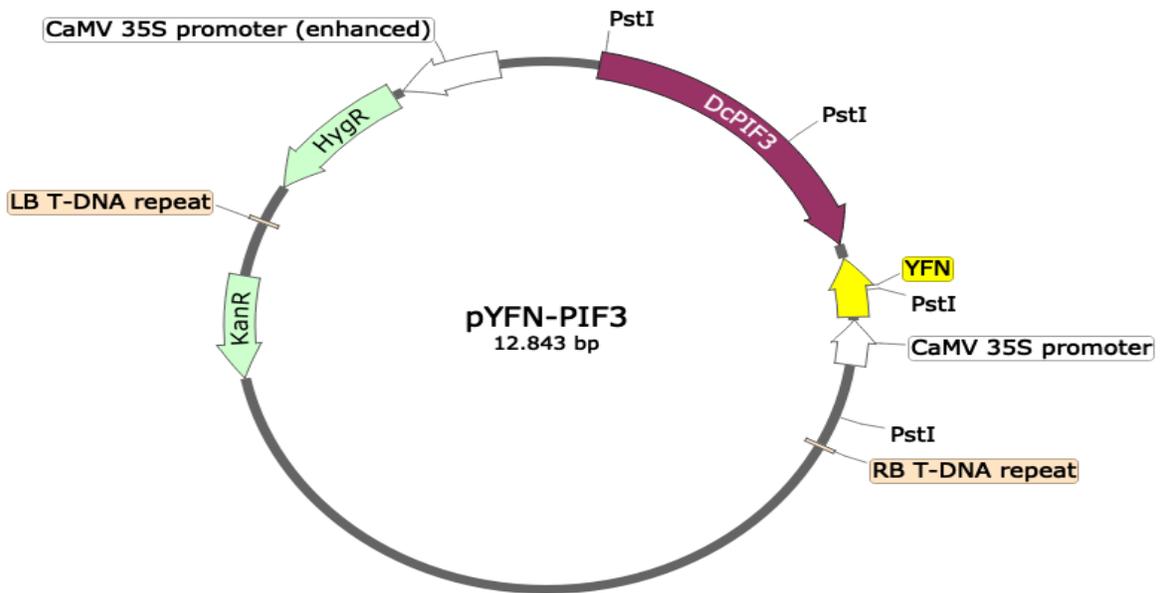


Figura A1. Esquema del vector PIF3-C. Vector de expresión en plantas PIF3-C, cuyo tamaño es de 12.843 pb. KanR: gen de resistencia a la kanamicina, HygR: gen de resistencia a la higromicina, CaMV 35s: promotor del virus mosaico de la coliflor, LB/RB T-DNA repeat: borde izquierdo y derecho del vector que flanquean el ADN que será insertado por *A. tumefaciens*, YFN: gen que codifica para la región amino terminal de la proteína fluorescente YFP, PstI: sitios de corte de la enzima de restricción PstI.

