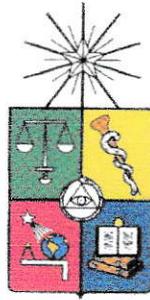


UCH-FC  
MAG-BMCN  
R789  
C.1



Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

**“Caracterización funcional del gen carotenogénico  
licopeno  $\beta$ -ciclasa 2 (*DcLcyb2*) de *Daucus carota*  
(zanahoria) mediante expresión en sistemas  
heterólogos”**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al grado de

**Magíster en Ciencias Biológicas,  
mención en Biología Celular, Molecular y Neurociencias.**

**Facultad de Ciencias**

Por

**Carolina Rosas Saavedra**

**Junio, 2015**

Directora de Tesis: Dra. Claudia Stange K.  
Co-Director de Tesis: Dra. Lorena Norambuena.

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

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

Carolina Angélica Rosas Saavedra

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 18 de Junio de 2014.

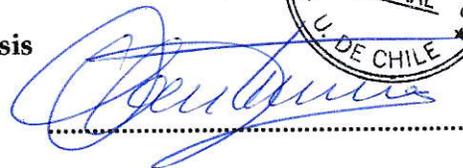
Director de Tesis:

Dra. Claudia Stange Klein

  
.....  
  
Co-Director de Tesis

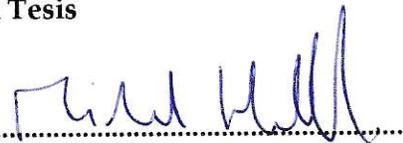
Co-Director de Tesis

Dra. Lorena Norambuena Morales

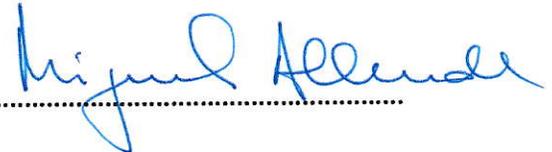
  
.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Michael Handford

  
.....

Dr. Miguel Allende Connelly

  
.....

Dr.

.....

**A mi abuelita Juana.**

**(lo anoté con letras grandes para que lo puedas leer, viejita  
querida)**

## AGRADECIMIENTOS

No saber por dónde empezar y sólo tener una hoja para agradecer es la razón de por qué la mayoría de quienes escribimos esta sección la dejamos para el final. Se necesita inspiración y buena memoria para retroceder en el tiempo y recordar todos los avances, logros, caídas y triunfos y reunir a cada quien contribuyó para que esos momentos fueran los mejores o los necesarios. Quiero agradecer a quienes contribuyeron a los buenos y a los malos momentos, pues hacen a la persona y científica que soy hoy día. Con estas palabras creo que ya me siento inspirada y comienzan a aparecer nombres y rostros que me acompañaron, guiándome, debatiendo, trabajando y riendo (a veces haciéndome bullying, pero los quiero). Vienen a mi mente todos los miembros del laboratorio, en especial Charlie, Koke, Lore P, Analía, Carlitos Rubilar, Carlitos Salinas, Amanda, Franco, Salo, Uri, Dani A, Ricardo, Hita, Aliosha, Claudín, Orlando, Diego, Pato estrella, Juan Camilo, Luis Felipe, Pauli, Ange, Seba profe Lili, profe Lore, profe Mike y todos quienes formaron y forman parte de este gran laboratorio, porque somos muchos!

Quiero agradecer a un miembro muy especial en este laboratorio, mi Pato, a quien se ha convertido en parte fundamental de mi vida, es mi colega, mi amigo, mi compañero de vida, mi amor y ahora mi familia, a quien me he unido por el lazo más fuerte e importante de la vida, nuestro pequeñ@. Sin él definitivamente no hubiera logrado ni la mitad de los resultados de esta Tesis, me apoyó y ayudó en todo lo que necesité, sobre todo cuando salía tarde del lab, estaba siempre preocupado de ir a buscarme, incluso a altas horas de la madrugada, hasta atropelló a un gato por mi culpa, por acudir en mi búsqueda!. Siempre preocupado de todo lo que pasaba en mi vida, preocupado de que no trabajara demasiado, pendiente hasta hoy de hacerme feliz, de complacer todos mis caprichos y deseos, de darme la razón aunque no la tuviera, muchas gracias Patricio Pérez-Henríquez, para mí el mejor científico, el más correcto y el más lindo.

Agradecer a mi familia, a mis queridos y valientes hermanos, Javier, Jessica y Cristian a quienes agradezco su apoyo y su alegría, sus bromas y su preocupación siempre. Estoy agradecida de tenerlos, y sobre todo súper orgullosa de ellos, de los sólidos que han sido desde pequeños. Los amo. A mi adorada abuelita, mi luz y mi ejemplo. A mi madre, mi guardiana y sabia madre. A la tía Doris, por todo su apoyo y por acogerme cuando más lo necesité.

Agradezco a mis amigos de la vida, en especial a Denis y a Ori, por todos sus consejos, tiempo y cariño. Por escucharme cuando lo necesité, cuando los experimentos eran infinitos, el tiempo y la vida pasaba, y ellas ahí esperándome. Gracias a Ori, por toda su ayuda y apoyo para preparar la defensa privada de esta Tesis, lejos mi mejor coucher.

Muchas gracias a todos a quienes no menciono en esta página, pero que formaron parte del día a día en el lab, en la Facultad, en la U y que de alguna u otra forma aportaron a este trabajo.

Finalmente, en esta sección también se agradecen los aportes y financiamiento de proyectos y becas, así es que me corresponde agradecer principalmente el apoyo de Claudia, mi profe, pues sé que se las arregló muchas veces para financiar mi sueldo de tesista, y siempre acogió mis sugerencias, propuestas y locuras.

De todo corazón, muchas gracias a todos!.

## INDICE DE MATERIAS

DEDICATORIA.....	ii
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE DE MATERIAS.....	v
INDICE DE TABLAS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Características, función y biosíntesis de los carotenoides.....	1
1.2 Ruta de biosíntesis de los carotenoides.....	4
1.3 Síntesis y acumulación de carotenoides en organismos fotosintéticos.....	7
1.4. Regulación de la ruta carotenogénica en plantas.....	11
1.5. El gen <i>lcyb</i> en la ruta de síntesis de los carotenoides.....	12
1.5.1 Expresión del gen <i>lcyb</i> en modelos vegetales.....	17
1.6 <i>Daucus carota</i> L. (zanahoria) como modelo de estudio.....	17
1.6.1 Regulación transcripcional de la ruta carotenogénica en <i>Daucus carota</i>	18
L.....	
1.7 Estrategia a utilizar.....	22
1.8 Hipótesis.....	24
1.9 Objetivo general.....	24
1.10 Objetivos específicos.....	24
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
2.1 Reactivos.....	25
2.2 Material Vegetal.....	25
2.2.1 Planta modelo: Zanahoria ( <i>Daucus carota</i> L. cv. Nantes).....	25
2.2.2 Planta modelo: Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> cv Xanthi NN).....	25
2.3 Material Biológico.....	27

2.3.1	Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo.....	27
2.3.1.1	Cepas bacterianas.....	27
2.3.1.2	Plásmidos.....	27
2.3.1.3	Medios de cultivo y soluciones.....	30
<b>2.4</b>	<b>Cultivo y transformación de bacterias.....</b>	<b>32</b>
2.4.1	Cultivo de <i>Escherichia coli</i> .....	32
2.4.2	Preparación de células electrocompetentes de <i>Escherichia coli</i> DH5- $\alpha$ .....	32
2.4.3	Transformación de células electro-competentes.....	33
2.4.4	Preparación de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> One Shot® Mach1™ y One Shot® BL21(DE3).....	33
2.4.5	Transformación de células de <i>E. coli</i> quimio-competentes.....	34
2.4.6	Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para la transformación de tejido vegetal.....	35
2.4.7	Obtención de células quimiocompetentes de <i>A. tumefaciens</i> GV3101.....	35
2.4.8	Transformación de <i>A. tumefaciens</i> quimio-competentes.....	36
<b>2.5</b>	<b>Cultivo <i>in vitro</i> y transformación de tejido vegetal.....</b>	<b>36</b>
2.5.1	Transformación y regeneración <i>in vitro</i> mediante organogénesis somática de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	36
2.5.2	Transformación transitoria de hojas de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	38
<b>2.6</b>	<b>Métodos de Biología Molecular.....</b>	<b>39</b>
2.6.1	Extracción y purificación de ácidos nucleicos.....	39
2.6.1.1	Purificación de ADN desde geles de agarosa.....	39
2.6.1.2	Aislamiento y purificación de ADN plasmidial de <i>E.coli</i> .....	39
2.6.1.3	Extracción de ADN genómico a partir de tejido vegetal.....	39
2.6.1.4	Extracción de ARN a partir de tejido vegetal.....	40
2.6.1.5	Pureza y calidad del ARN vegetal.....	41
2.6.2	Digestiones enzimáticas.....	42
2.6.3	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	42
2.6.3.1	Diseño de partidores.....	42
2.6.3.2	PCR convencional.....	44
2.6.3.3	PCR de colonia.....	45

2.6.3.4	Adición de residuos de adenosina para clonamiento en pCR <sup>®</sup> 8.....	46
2.6.3.5	Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	47
2.6.3.6	PCR en Tiempo Real o RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR).....	48
2.6.4	Construcciones genéticas.....	53
2.6.4.1	Clonación de los fragmentos de interés en el vector de entrada pCR <sup>®</sup> 8.....	53
2.6.4.2	Clonación de los fragmentos de interés en el vector de expresión pETBlue-1.....	53
2.6.4.3	Clonación de los fragmentos de interés en los vectores de destinación pGWB2, pGWB5 y pMDC32 por recombinación Gateway <sup>®</sup> .....	54
2.6.5	Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	55
<b>2.7</b>	<b>Determinación de la cantidad y la composición de los carotenoides.....</b>	<b>56</b>
2.7.1	Extracción de carotenoides a partir de cultivo líquido de bacterias de <i>E. coli</i> .....	56
2.7.2	Extracción de carotenoides a partir de tejido vegetal.....	58
2.7.3	Cuantificación de los pigmentos totales mediante espectrofotometría.....	58
2.7.4	Composición de los pigmentos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC).....	59
<b>2.8</b>	<b>Análisis bioinformático.....</b>	<b>60</b>
2.8.1	Análisis y alineamiento múltiple de secuencias.....	61
2.8.2	Análisis “ <i>in silico</i> ” de la localización subcelular de la proteína DcLCYB2 de <i>Daucus carota L.</i> .....	60
2.8.3	Otros programas y aplicaciones para el análisis bioinformático.....	61
<b>2.9</b>	<b>Microscopía de Fluorescencia Confocal.....</b>	<b>61</b>
	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo específico 1. Aislar, expresar y caracterizar funcionalmente el gen <i>DcLcyb2</i> mediante complementación heteróloga en <i>Escherichia coli</i> BL21 pDS1B-<math>\Delta</math>crtY.....</b>	<b>63</b>
3.1.1	Aislamiento y clonación del gen <i>DcLcyb2</i> en el vector de entrada pCR <sup>®</sup> 8..	63
3.1.2	Análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína DcLCYB2.....	68
3.1.3	Clonación del gen <i>DcLcyb2</i> en el vector de expresión pETBlue-1 para los ensayos de complementación en <i>Escherichia coli</i> BL21 pDS1B- $\Delta$ crtY.....	74

3.1.4	Complementación heteróloga de la cepa mutante <i>E.coli</i> BL21 pDS1B- $\Delta$ crtY con el gen <i>DcLcyb2</i> .....	78
3.1.5	Cuantificación y análisis de la composición de carotenoides purificados a partir de <i>E.coli</i> BL21 pDS1B- $\Delta$ crtY complementada con el gen <i>DcLcyb2</i> de <i>Daucus carota</i> .....	80
<b>3.2</b>	<b>Objetivo específico 2. Determinar la localización subcelular de DcLCYB2 mediante la transformación transitoria de hojas de <i>Nicotiana tabacum</i>.....</b>	<b>85</b>
3.2.1	Clonación del gen <i>DcLcyb2</i> s/t en el vector de entrada pCR®8.....	85
3.2.2	Construcción del vector binario pGWB5/ <i>DcLcyb2</i> s/t.....	89
3.2.3	Obtención de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformado con el vector pGWB5/ <i>DcLcyb2</i> s/t.....	91
3.2.4	Determinación de la localización sub-celular de la proteína DcLCYB2 mediante microscopía de fluorescencia confocal.....	93
<b>3.3</b>	<b>Objetivo específico 3. Expresar el gen <i>DcLcyb2</i> en <i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco) mediante transformación estable con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....</b>	<b>97</b>
3.3.1	Generación de los vectores de destinación pMDC32/ <i>DcLcyb2</i> y pGWB2/ <i>DcLcyb2</i> mediante recombinación Gateway®.....	97
3.3.2	Transformación estable de <i>Nicotiana tabacum</i> con las construcciones pMDC32/ <i>DcLcyb2</i> y pGWB2/ <i>DcLcyb2</i> .....	101
	3.3.2.1 Organogénesis somática de explantes de tabaco transformados con las construcciones pMDC32/ <i>DcLcyb2</i> y pGWB2/ <i>DcLcyb2</i> .....	101
	3.3.2.2 Identificación de las líneas de <i>N. tabacum</i> portadoras del gen <i>DcLcyb2</i> .....	106
<b>3.4</b>	<b>Objetivo específico 4. Determinar el efecto de la expresión del gen <i>DcLcyb2</i> en los niveles de carotenoides y en la expresión de genes endógenos claves de la ruta carotenogénica de <i>Nicotiana tabacum</i>.....</b>	<b>109</b>
3.4.1	Análisis del contenido y composición de pigmentos en líneas transgénicas de tabaco transformadas con las construcciones pMDC32/ <i>DcLcyb2</i> y pGWB2/ <i>DcLcyb2</i> .....	109
3.4.2	Análisis de la expresión del gen <i>DcLcyb2</i> en líneas transgénicas de tabaco transformadas con la construcción pMDC32/ <i>DcLcyb2</i> .....	120
3.4.3	Efecto en la expresión de los genes carotenogénicos endógenos de plantas de tabaco transgénicas que expresan altos niveles de transcrito del gen <i>DcLcyb2</i> de <i>D.carota</i> L.....	124
	<b>DISCUSION.....</b>	<b>128</b>

4.1 Aislamiento y análisis de secuencia de DcLCYB2.....	128
4.2 Caracterización funcional del gen licopeno $\beta$ -ciclase 2 de <i>Daucus carota</i> L. en <i>E.coli</i> .....	130
4.3 La proteína DcLCYB2 se localiza en los plastidios de las células vegetales.....	136
4.4 La expresión del gen <i>DcLcyb2</i> provoca un aumento de los niveles de carotenoides en hojas de la planta modelo <i>Nicotiana tabacum</i> .....	140
4.5 La sobre-expresión del gen <i>DcLcyb2</i> modula los niveles de expresión de genes carotenogénicos endógenos en hojas de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	146
4.6 Uso del gen <i>DcLcyb2</i> como herramienta biotecnológica para el desarrollo de especies vegetales mejoradas mediante ingeniería metabólica.....	148
<b>CONCLUSIONES</b> .....	150
<b>REFERENCIAS</b> .....	152
<b>ANEXOS</b> .....	167

## INDICE DE TABLAS

	Título	Pág
TABLA I	Vectores utilizados en esta Tesis de Magíster.....	30
TABLA II	Medios para cultivo <i>in vitro</i> de <i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco).....	38
TABLA III	Partidores utilizados en esta Tesis para experimentos de PCR convencional, PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) y RT-PCR.....	43
TABLA IV	Programas de PCR utilizados.....	51
TABLA V	Cuantificación de pigmentos purificados a partir de clones de <i>Escherichia coli</i> transformados con la construcción pETblue-1/DcLcyb2.....	83
TABLA VI	Perfil de carotenoides determinado por RP-HPLC de hojas de tabaco transgénicas de 6 meses de edad transformadas de manera independiente con las construcciones pMDC32/Dclcyb2 y pGWB2/Dclcyb2.....	117
TABLA VII	Niveles de transcrito de genes carotenogénicos endógenos en tabacos que sobre-expresan el gen <i>DcLcyb2</i> de zanahoria.....	127

## INDICE DE FIGURAS

Número	Título	Pág
<b>Figura 1</b>	Ruta de biosíntesis de los carotenoides en plantas.....	6
<b>Figura 2</b>	Esquema ilustrativo de los complejos multienzimáticos implicados en la biosíntesis de carotenoides en cloroplastos de maíz, según Shumskaya y Wurtzel (2013).....	10
<b>Figura 3</b>	Reacciones de ciclación en la ruta carotenogénica.....	13
<b>Figura 4</b>	Niveles de mRNA de <i>DcLcyb1</i> y <i>DcLcyb2</i> en hojas versus raíces de <i>Daucus carota</i> L. silvestre.....	20
<b>Figura 5</b>	Obtención del gen <i>DcLcyb2</i> a partir de <i>Daucus carota</i> .....	65
<b>Figura 6</b>	Clonamiento del gen <i>DcLcyb2</i> en el vector pCR®8.....	67
<b>Figura 7</b>	Análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína DcLCYB2.....	71
<b>Figura 8</b>	Predicción de la estructura secundaria de DcLCYB1 y DcLCYB2.....	73
<b>Figura 9</b>	Aislamiento del gen <i>DcLcyb2</i> para ensayos de complementación heteróloga.....	75
<b>Figura 10</b>	Clonamiento del gen <i>DcLcyb2</i> en el vector de expresión pETBlue-1.....	77
<b>Figura 11</b>	Transformación de la cepa mutante <i>E.coli</i> BL21 pDS1B- $\Delta$ <i>crtY</i> con el gen <i>DcLcyb2</i> .....	79
<b>Figura 12</b>	Análisis por RP-HPLC de los carotenoides extraídos de las células de <i>E. coli</i> complementadas con el gen <i>DcLcyb2</i> .....	82
<b>Figura 13</b>	Niveles de carotenoides producidos por LCYB2. ....	85
<b>Figura 14</b>	Amplificación del gen <i>DcLcyb2</i> sin codón de término de la traducción...	86
<b>Figura 15</b>	Digestión enzimática de la construcción pCR®8/ <i>DcLcyb2</i> s/t.....	88

<b>Figura 16</b>	Digestión de la construcción pGWB5/ <i>DcLcyb2</i> s/t con Hind III.....	91
<b>Figura 17</b>	PCR de colonia de <i>A. tumefaciens</i> transformado con el vector pGWB5/ <i>DcLcyb2</i> s/t.....	92
<b>Figura 18</b>	Localización subcelular de la proteína DcLCYB2. ....	95
<b>Figura 19</b>	Clonamiento del gen <i>DcLcyb2</i> en los vectores pMDC32 y pGWB2.....	100
<b>Figura 20</b>	Organogénesis somática de explantes de hojas de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	104
<b>Figura 21</b>	Identificación de líneas de tabaco transgénicas transformadas de manera independiente con las construcciones pMDC32/ <i>DcLcyb2</i> y pGWB2/ <i>DcLcyb2</i> .....	108
<b>Figura 22</b>	Contenido de $\beta$ -caroteno y luteína en líneas de tabaco transgénicas que expresan el gen <i>DcLcyb2</i> de zanahoria.....	112
<b>Figura 23</b>	Contenido de carotenoides totales y clorofila en líneas de tabaco transgénicas que expresan el gen <i>DcLcyb2</i> de zanahoria.....	115
<b>Figura 24</b>	Patrón de composición porcentual de carotenoides en plantas de tabaco transgénicas pMDC32/ <i>DcLcyb2</i> y pGWB2/ <i>DcLcyb2</i> .....	118
<b>Figura 25</b>	Análisis de qRT-PCR de los niveles de transcrito de <i>DcLcyb2</i> en tabaco transgénico.....	123
<b>Figura 26</b>	Expresión relativa de los genes carotenogénicos <i>Ntpsy1</i> , <i>Ntpsy2</i> y <i>Ntlcyb</i> en líneas de tabaco que sobre-expresan el gen <i>DcLcyb2</i> de zanahoria.....	126
<b>Anexo 1.</b>	Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de diferentes LCYBs.....	167

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABA</b>	: Ácido Abscísico
<b>ADN</b>	: Acido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	: Acido ribonucleico
<b>BAP</b>	: Benzil Amino Purina
<b>BLAST</b>	: Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico)
<b>BrEt</b>	: Bromuro de etidio
<b>°C</b>	: Grado centígrado
<b>CCS</b>	: Capsantina Capsorrubina Sintasa
<b>cm</b>	: Centímetro(s)
<b>Ct</b>	: Cycle threshold (Ciclo umbral)
<b>CTAB</b>	: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
<b>cv</b>	: Cultivar
<b>2,4-D</b>	: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<b>DEPC</b>	: Dietilpirocarbonato
<b>DNasa</b>	: Desoxirribonucleasa
<b>dNTP</b>	: Desoxiribonucleótido trifosfato
<b>DO</b>	: Densidad Óptica
<b>EDTA</b>	: Ácido etilendiaminotetraacético
<b>g</b>	: Gramos
<b>gPF</b>	: Gramos de Peso Fresco
<b>gPS</b>	: Gramos Peso Seco
<b>h</b>	: hora(s)
<b>HPLC</b>	: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución).
<b>hpt</b>	: Hygromycin phosphotransferase (gen de la higromicina fosfotransferasa)

<b>IBA</b>	: Ácido Indol Butírico
<b>Kb</b>	: Kilobase
<b>M</b>	: Molar
<b>Medio LB</b>	: Medio Luria Bertani
<b>Medio MS</b>	: Medio Murashige y Skoog
<b>min</b>	: Minuto(s)
<b>mM</b>	: Mili molar
<b>mL</b>	: Mili litro
<b>nptII</b>	: Neomycin phosphotransferase II (gen neomicina fosfotransferasa)
<b>pb</b>	: Par(es) de base(s)
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
<b>pGWB</b>	: Gateway Binary vector
<b>PM</b>	: Peso Molecular
<b>rpm</b>	: Revoluciones por minuto
<b>RT</b>	: Transcripción Reversa
<b>SDS</b>	: Dodecil sulfato de sodio
<b>sGFP</b>	: Synthetic Green Fluorescent Protein (Proteína Fluorescente Verde sintética)
<b>Ta</b>	: Temperatura de hibridación
<b>TAE</b>	: Tris-acetato EDTA
<b>Tris</b>	: Tris (hidroximetil) aminometano
<b>U</b>	: Unidad enzimática
<b>µg</b>	: Micro gramo
<b>µL</b>	: Microlitro
<b>µM</b>	: Micro Molar
<b>UTR</b>	: Untranslated Region (Región no traducible)
<b>X-gal</b>	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D- galactósido

® : Marca registrada

™ : Marca registrada

≥ : Mayor o igual

## RESUMEN

Los carotenoides son compuestos isoprenoides lipídicos sintetizados por todos los organismos fotosintéticos y también por algunas bacterias, levaduras y áfidos. En las plantas, estos compuestos son sintetizados en los plastidios y son esenciales en procesos como la fotosíntesis, la fotoprotección y la síntesis de fitohormonas. En los animales, los carotenoides actúan como moléculas antioxidantes y también como precursores de vitamina A cuando se incorporan en la dieta. Actualmente, la ruta de biosíntesis de los carotenoides está bien caracterizada y es altamente conservada en plantas, donde se han identificado las enzimas más importantes de esta vía. Hasta la fecha, se sabe que el principal mecanismo regulador de la ruta carotenogénica se produce a nivel transcripcional, donde factores activadores como la luz y el desarrollo tienen un efecto directo en la activación de la expresión génica carotenogénica .

La licopeno  $\beta$ -ciclase (LCYB) es una enzima clave implicada directamente en la síntesis de los carotenoides  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno a través de la ciclación de licopeno. En *Daucus carota* (zanahoria), el modelo de estudio utilizado en nuestro laboratorio, los carotenoides se producen tanto en las hojas como en las raíces de reserva, siendo en este último órgano donde se acumulan las más altas cantidades de  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno. En algunas plantas modelo, la presencia de diferentes isoformas de los genes carotenogénicos está asociada a una función órgano-específica. *D. carota* alberga dos genes *Lcyb*: *DcLcyb1* y *DcLcyb2* de los cuales *DcLcyb2* se expresa principalmente en las raíces de almacenamiento de plantas adultas de zanahoria, en correlación con los niveles más altos de carotenoides detectados en esta etapa del desarrollo.

En este trabajo, mostramos que DcLCYB2 se localiza en los cloroplastos, y que es una enzima funcional, como se demuestra por complementación heteróloga en *Escherichia coli* y mediante la expresión estable en *Nicotiana tabacum* (tabaco). Se observó que las plantas transgénicas con los niveles más altos de *DcLcyb2* incrementaron los niveles de  $\beta$ -caroteno, carotenoides totales y clorofila en las hojas, sin embargo no se observaron cambios significativos en el contenido o en la composición porcentual de los carotenoides totales. Mediante el uso de PCR cuantitativo también se determinó el efecto de la sobreexpresión de *DcLcyb2* en los niveles de expresión de tres genes endógenos carotenogénicos claves (*Ntpsy1*, *Ntpsy2* y *Ntlcyb*) en líneas de tabaco transgénicas. Se observó un efecto activador del gen *DcLcyb2* en dos de los genes estudiados (*Ntpsy1* y *Ntpsy2*), lo que sugiere un efecto regulador de este gen en la ruta de biosíntesis de carotenoides en tabaco mediante mecanismos de retroalimentación a nivel transcripcional.

Nuestros resultados demostraron la funcionalidad *in vivo* del gen *DcLcyb2* en la planta modelo *Nicotiana tabacum* indicando su importancia tanto en la expresión de genes carotenogénicos como en la acumulación de carotenoides.

## ABSTRACT

Carotenoids are lipidic isoprenoid compounds synthesized by all photosynthetic organisms and also by bacteria, yeasts and aphids. In plants, these compounds are synthesized in plastids and they are essential in these organisms due to their role in processes like photosynthesis, photo-protection and hormone synthesis. In animals, they act as antioxidant molecules and also as vitamin A precursors when they are incorporated in the diet. The carotenogenic pathway is well characterized and highly conserved in plants, and the most important enzymes of the pathway have been identified. To date, it is known that the major regulatory mechanism occurs at the transcriptional level where activating factors such as light and development have a direct effect in the activation of carotenogenic gene expression.

Lycopene b-cyclase (LCYB) is a key enzyme involved directly in the synthesis of  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene through the cyclization of lycopene. Carotenoids are produced in both carrot (*Daucus carota*) leaves and reserve roots, and high amounts of  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene accumulate in the latter. In some plant models, the presence of different isoforms of carotenogenic genes is associated with an organ-specific function. *D. carota* harbors two *Lcyb* genes, of which *DcLcyb2* is mainly expressed in storage roots of adult carrot plants, correlating with the highest carotenoid level at this stage of development. In this work, we show that DcLCYB2 is localized in the plastid and that it is a functional enzyme, as demonstrated by heterologous complementation in *Escherichia coli* and stable expression in *Nicotiana tabacum* (tobacco). Transgenic plants with higher levels of *DcLcyb2* had incremented levels of  $\beta$ -carotene, total carotenoids and chlorophyll in leaves, although no significant changes in carotenoid content and composition pattern were observed. In addition, we determined

the effects of overexpression of *DcLcyb2* on the expression levels of three key endogenous carotenogenic genes (*Ntpsy1*, *Ntpsy2* y *Ntlcyb*) in transgenic tobacco lines by using quantitative PCR. We observed an activating effect of *DcLcyb2* gene for two of these genes in the lines (*Ntpsy1*, *Ntpsy2*), suggesting a regulatory effect of this gene in the biosynthetic pathway of carotenoids in tobacco through feedback mechanisms at the transcriptional level.

Our results proved the *in vivo* functionality of *DcLcyb2* gene in this plant model and also they showed the importance of this gene in carotenoid gene expression and accumulation in tobacco leaves.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 Características, función y biosíntesis de los carotenoides.

Los carotenoides son compuestos isoprenoides de naturaleza lipídica sintetizados por todos los organismos fotosintéticos (plantas y algas) y también por algunas bacterias, levaduras, hongos y áfidos (Velayos y col., 2000; Iniesta y col., 2008; Moran y Jarvik, 2010).

Actualmente, se han descrito más de 750 carotenoides estructuralmente distintos (Giorio y col., 2007), los cuales se subdividen en dos grandes grupos: los carotenos, que contienen solo átomos de carbono e hidrogeno y las xantofilas, que poseen además sustituyentes oxigenados.

Los carotenoides son pigmentos que derivan de la condensación de varias unidades isoprénicas de cinco carbonos formando moléculas de cuarenta carbonos, que contienen hasta 15 enlaces conjugados (Taylor y Ramsay, 2005; Giorio y col., 2007; Armstrong y Hearts, 1996).

La presencia de numerosos enlaces conjugados les confiere distintas características, por ejemplo, la de actuar como cromóforos (parte de una molécula capaz de absorber luz y generar color), los cuales confieren colores distintivos, en el rango del amarillo al rojo, en aquellos organismos que producen o acumulan estos polienos. Al ser pigmentos coloreados, en plantas, los carotenoides se evidencian en las raíces de reserva, los frutos y las flores, donde facilitan la polinización (Armstrong y Hearts, 1996; Grotewold, 2006), y también en las hojas senescentes al degradarse la clorofila.

La cantidad y configuración de los dobles enlaces conjugados dentro de la estructura de cada carotenoide, así como la presencia y tipo de ciclación en sus extremos, también confieren a estos compuestos propiedades de absorción de fotones en las longitudes de onda del color azul.

Estos pigmentos participan en procesos fisiológicos esenciales como la fotosíntesis, donde captan la energía lumínica de diversas longitudes de onda en los complejos cosechadores de luz de los fotosistemas, abarcando un rango espectral de absorción entre 450 y 550 nm. Esta energía lumínica es transferida a la clorofila durante la fotosíntesis (Britton, 1995; Schmid, 2008). Otras funciones que dan cuenta de la importancia de los carotenoides en la naturaleza son: 1) Actúan como antioxidantes afectando procesos oxidativos en sistemas biológicos mediante la eliminación de radicales libres. La resonancia de los electrones a lo largo del esqueleto carbonado en una molécula de carotenoide, permite la absorción de los electrones desapareados de las moléculas radicalarias (Britton, 1995; Britton, 1998; Nelson y col., 2003). La actividad antioxidante de los carotenoides está dada por mecanismos tanto de reducción como de oxidación. La mayoría de las especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como los radicales hidroxilo, son reducidas por  $\beta$ -caroteno, mientras que en casos como el del anión superóxido, éste es eliminado eficientemente mediante oxidación por astaxantina (Skibted, 2012). En particular, los carotenoides generan un alto nivel de protección fotooxidativa contra los efectos del singlete de oxígeno, del radical superóxido y del triplete excitado de clorofila producidos en los centros de reacción del fotosistema II como consecuencia de la fotosíntesis (Armstrong y Hearts, 1996; Cunningham y Gantt, 1998; Giorio y col., 2007; Takano y col., 2005; Telfer, 2005) 2) Los carotenoides también participan en la disipación térmica del exceso nocivo de energía lumínica dirigida a los centros de reacción fotoquímicos a través del ciclo de

las xantófilas (Demmig y col., 1987). Varios investigadores han demostrado que los carotenoides zeaxantina y luteína desempeñan papeles críticos en la disipación térmica. Por ejemplo, se ha observado una fuerte correlación entre la disipación térmica y la acumulación de zeaxantina en una variedad de plantas (Demmig-Adams y col., 1996). 3) Adicionalmente, los carotenoides son precursores en la síntesis de fitohormonas tales como las estrigolactonas, involucradas en procesos de morfogénesis (Gómez-Roldán y col., 2008), y el ácido abscísico (ABA), asociado a procesos de regulación de la dormancia y germinación de semillas, así como a la adaptación ambiental de plantas (Raghavendra y col., 2008).

En mamíferos, algunos carotenoides ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, criptoxantina) son convertidos a vitamina A (retinol) luego de un clivaje molecular seguido de un proceso reductivo. Este mecanismo es clave, considerando que los mamíferos son incapaces de sintetizar vitamina A *de novo*. Tampoco cuentan con la capacidad de sintetizar carotenoides *de novo* y su capacidad para modificarlos es limitada (Bhosale P y Bernstein, 2007). Por lo tanto, es esencial la incorporación de carotenoides en la dieta mediante el consumo de vegetales ricos en ellos tales como zanahorias, zapallos, tomates, entre otros.

El  $\beta$ -caroteno, por ejemplo, posee 11 dobles enlaces conjugados y ciclaciones  $\beta$  en sus extremos, lo que le confiere una coloración naranja intensa, además de ser uno de los carotenoides con mayor actividad provitamina A (El-Agamey y col., 2004; Giorio y col., 2007). La vitamina A cumple a su vez funciones esenciales en la formación de los dientes, tejidos sanos, piel, mucosas y en el funcionamiento de la retina (Fraser y Bramley, 2004; Krinsky y Johnson, 2005; DellaPenna y Pogson, 2006; Cazzonelli y col., 2010). Debido a su reconocida capacidad antioxidante, el consumo de alimentos ricos

en carotenoides (por ejemplo el licopeno, la luteína y la zeaxantina) ha sido asociado a la prevención y reducción del daño celular y por consiguiente, a una reducción de las probabilidades de desarrollar ciertos tipos de cáncer, enfermedades degenerativas y vasculares además de problemas visuales (Breimer, 1990; Esterbauer y col., 1992; Mayne, 1996; Rao y Rao, 2007; Snodderly, 1995; Tanumihardjo y Yang, 2005).

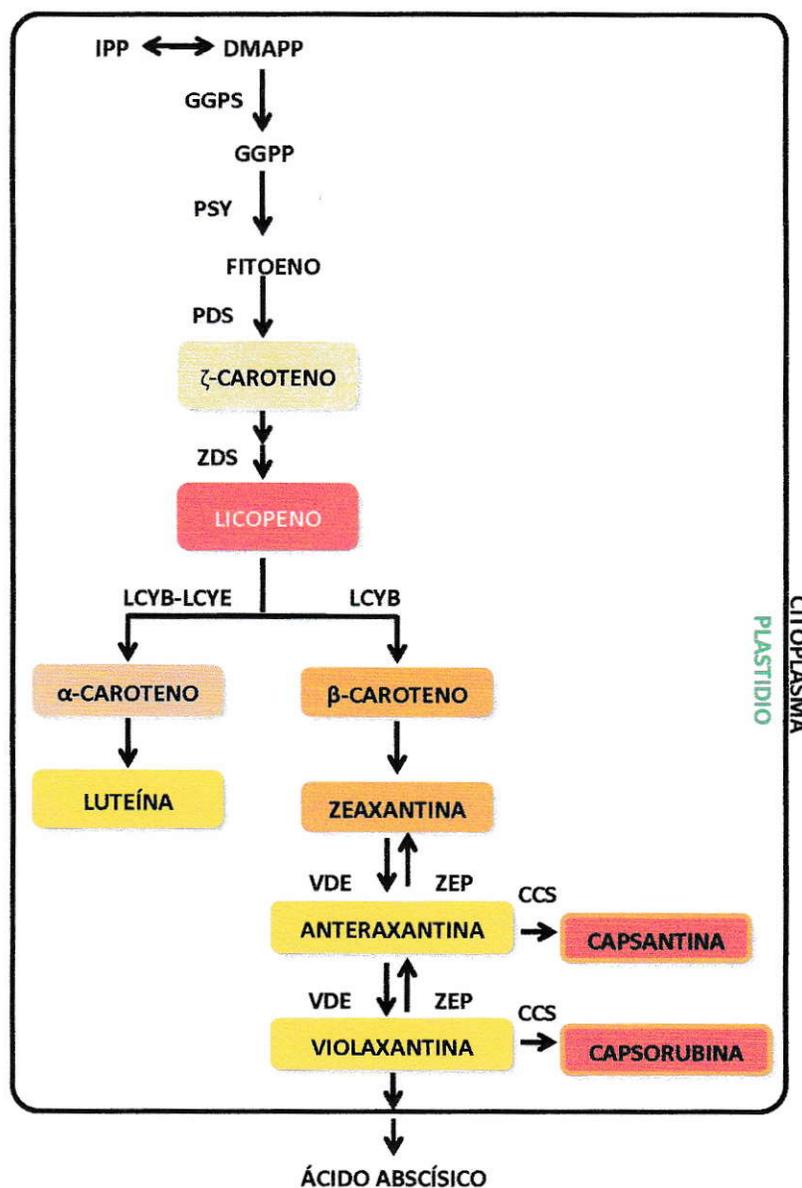
## **1.2. Ruta de biosíntesis de los carotenoides.**

En las plantas, la biosíntesis de los carotenoides ocurre en los plastidios (cloroplastos y cromoplastos) de las células vegetales a partir de la unión cola-cola de dos moléculas de geranyl geranyl pirofosfato (GGPP), mediada por la enzima fitoeno sintasa (PSY) (Figura 1) para producir fitoeno. Luego ocurren cuatro desaturaciones seguidas, llevadas a cabo por las enzimas fitoeno desaturasa (PDS) y  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS), con la finalidad de extender las series conjugadas de dobles enlaces. El fitoeno sufre así cuatro desaturaciones sucesivas, que resultan en la formación secuencial de fitoflueno,  $\alpha$ -caroteno, neurosporeno y por último licopeno, de color rojo (Figura 1, Cunningham y Gantt, 1998). Junto con estas desaturaciones ocurren además isomerizaciones a partir de la actividad de las enzimas Isomerasa de carotenoides (CRTISO) y  $\zeta$ -Caroteno Isomerasa (Z-ISO), donde se produce la formación de all-trans-licopeno, configuración estable y clave para las subsiguientes ciclaciones.

Luego de la formación del licopeno, la ruta carotenogénica se divide en dos ramas principales: 1) Da lugar a la síntesis de  $\beta$ -caroteno mediante la ciclación de ambos extremos de la molécula de licopeno y es llevada a cabo por la enzima licopeno  $\beta$ -ciclasa, LCYB, y 2) conducente a la generación de  $\alpha$ -caroteno, a través de la

ciclación de un extremo de la molécula de licopeno mediante LCYB y del otro extremo lineal libre mediante la enzima licopeno  $\epsilon$ -ciclasa, LCYE (Cunningham y Gantt, 1998). Posteriormente, el  $\beta$ -caroteno es hidroxilado a zeaxantina, la cual es epoxidada a compuestos como la neoxantina para generar finalmente el ácido abscísico (ABA). Por otro lado, la hidroxilación de  $\alpha$ -caroteno da lugar a la formación de luteína.

Dada la vital importancia de los carotenoides en plantas y en animales, la regulación de su síntesis ha sido ampliamente estudiada en las últimas décadas. Los avances en esta área de estudio han permitido el descubrimiento y caracterización de la mayoría de los genes involucrados en la ruta de síntesis de los carotenoides (Cunningham y Gantt, 1998; Cunningham, 2002; Howitt y Pogson, 2006), lo que ha permitido modificar la síntesis de éstos en diversos organismos, en especial en las plantas (Aluru y col., 2008; Davuluri y col., 2004; Diretto y col., 2007; Lamers y col., 2008; Shewmaker y col., 1999; Ye y col., 2000).



**Figura 1. Ruta de biosíntesis de los carotenoides en plantas.** Diagrama simplificado con las principales enzimas y productos metabólicos de los carotenoides que son sintetizados en plantas y las enzimas implicadas en cada etapa. Todos los isoprenoides derivan del compuesto isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero, dimetilalilpirofosfato (DMAPP), los cuales son sintetizados a partir de vías metabólicas independientes y compartimentalizadas. La ruta carotenogénica de la figura señala la síntesis del primer carotenoide de la ruta, el fitoeno, producto de la condensación de dos moléculas de geranyl-geranyl-pirofosfato (GGPP), hasta la síntesis de la fitohormona ácido abscísico (ABA). GGPS: Geranyl-Geranyl-Pirofosfato Sintasa; PSY: Fitoeno Sintasa; PDS: Fitoeno Desaturasa; ZDS: ζ-caroteno Desaturasa; LCYB: Licopeno β-Ciclase; LCYE: Licopeno ε-Ciclase; VDE: Violaxantina De-Epoxidasa; ZEP: Zeaxantina Epoxidasa; CCS: Capsantina-Capsorubina Sintasa. Esquema modificado de Rodríguez-Villalón y col., (2009).

### 1.3. Síntesis y acumulación de carotenoides en organismos fotosintéticos.

Los plastidios, principalmente cloroplastos y cromoplastos, son los organelos que sintetizan y almacenan metabolitos de carotenoides (López-Juez y Pyke, 2005). La síntesis de carotenoides *de novo* se produce en casi todos los tipos de plástidos diferenciados en hojas, frutos, flores, raíces y semillas. El tipo y tamaño de plastidio tienen efectos significativos en la acumulación de carotenoides y en su estabilidad (Hannoufa y Hossain, 2012; Li y Yuan, 2013). Cromoplastos son plastidios ricos en carotenoides en el que varias subestructuras de lipoproteínas (por ejemplo, glóbulos, cristales, membranas, fibrillas y túbulos) secuestran carotenoides (Vishnevetsky et al., 1999; Egea et al, 2010; Li y Yuan, 2013). Particularmente, las mutantes de tomate *high pigment* (hp1, HP2 y HP3) tienen alto contenido de carotenoides debido al aumento en el número y/o volumen de cromoplastos (Kolotilin y col., 2007; Galpaz y col, 2008; Azari y col, 2010; Enfissi y col., 2010). Por otra parte, la mutante de la coliflor *Or*, sobre-acumula  $\beta$ -caroteno en cromoplastos en conformaciones de lámina, cinta, y subestructuras de cristal, sin cambios significativos en la expresión de la mayoría de los genes carotenogénicos (Li y col., 2001; Lu y col., 2006). En los cloroplastos, las membranas de los tilacoides y los plastoglobuli proporcionan a estos organelos una mayor capacidad para secuestrar y almacenar los carotenoides que han sido sintetizados, lo que se traduce en la acumulación de altos niveles de carotenoides en los tejidos verdes.

Otros plastidios acumulan diferentes niveles de carotenoides. En semillas de trigo, por ejemplo, los amiloplastos que almacenan almidón acumulan luteína (Hentschel y col., 2002; Howitt y col, 2009). A su vez, los leucoplastos son plastidios incoloros característicos de las células de raíces maduras, los cuales acumulan niveles

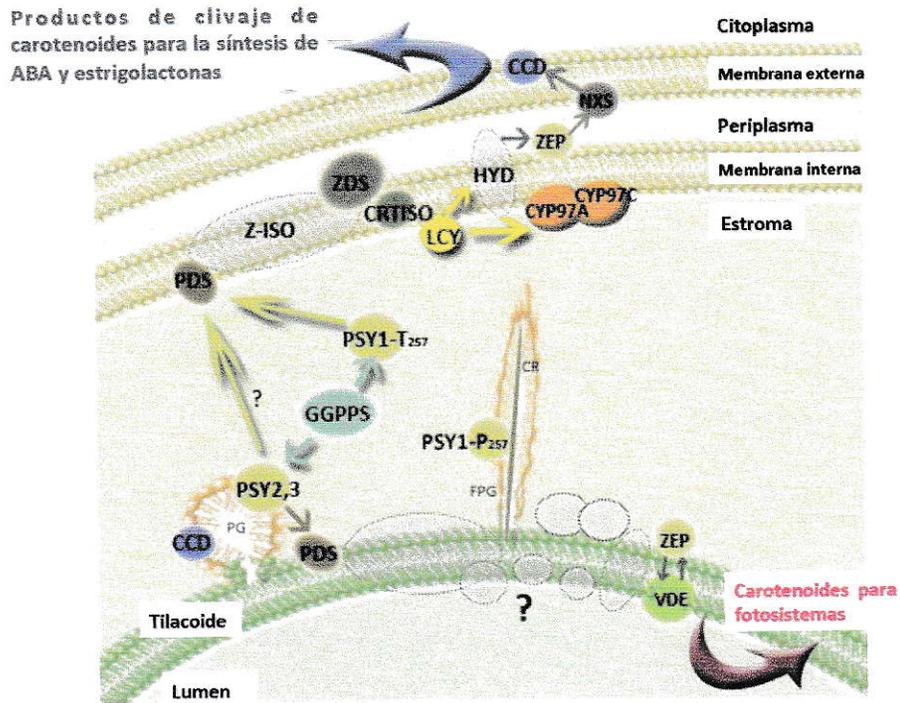
trazas de neoxantina y violaxanthin (Parry y Horgan, 1992). La falta de subestructuras lipoproteicas apropiadas en estos plastidios limita su capacidad de acumular y almacenar carotenoides de manera significativa y estable (Li et al., 2012). Del mismo modo, los etioplastos, precursores de los cloroplastos en plantas cultivadas en oscuridad, tienen poca capacidad de biosíntesis y acumulación de carotenoides (Park y col., 2002; Toledo-Ortiz y col., 2010). Los carotenoides también están presentes en los elaioplastos, plastidios especializados en el almacenamiento de lípidos.

Estudios proteómicos de proteínas plastidiales y fracciones tilacoidales demuestran además la relación entre la composición de carotenoides y la biogénesis y morfología de plastidios y la translocación de proteínas (Tzvetkova-Chevolleau y col., 2007; Wang y col., 2013). La morfología de los plastidios y el desarrollo son también factores que afectan a la retención de carotenoides. Análisis microscópicos revelan que un cambio en la arquitectura de los cromoplastos está asociado con la composición de carotenoides en una variedad de frutos de pimiento (Kilcrease y col., 2013). Bai et al. postulan que *Or* aumenta los niveles de carotenoides mediante la reducción del umbral de contenido de carotenoides necesario para activar la diferenciación de los cromoplastos (Bai y col., 2014).

Tanto la acumulación como la síntesis de carotenoides en los plastidios está comandada por enzimas codificadas en genoma nuclear, las cuales luego de ser sintetizadas son dirigidas como pre-proteínas a los plastidios, donde son procesadas postraduccionalmente. Por lo tanto, la secuencia polipeptídica de estas pre-proteínas contienen un péptido de tránsito en la porción N- terminal. La longitud de cada péptido de tránsito es variable y no se han reportado secuencias consenso. En el caso de enzimas carotenogénicas claves de la vía como PSY de frutos de tomate maduro, el

péptido de tránsito es de aproximadamente 9kD, correspondiente a aproximadamente 80 residuos de aminoácidos (Misawa y col., 1994).

El núcleo de la ruta de biosíntesis de los carotenoides está compuesto por aproximadamente 10 enzimas (Cuttriss y col., 2011). De acuerdo a estudios proteómicos en cloroplastos de *Arabidopsis thaliana* (Joyard y col, 2009; Ferro y col, 2010), muchas de las enzimas de la ruta carotenogénica se localizan exclusivamente en las membranas de la envoltura (Figura 2), mientras que sólo unas pocas se encuentran en las membranas de los tilacoides, como por ejemplo, aquellas enzimas del ciclo de las xantofilas y la fitoeno desaturasa (PDS). Por otra parte, se ha descrito que en cromoplastos de frutos de pimiento (*Capsicum annuum*) gran parte de las enzimas carotenogénicas se localizan en los plastoglóbulos (Austin y col., 2006; Ytterberg y col., 2006). Sin embargo, aún se desconoce la distribución espacial de la ruta de biosíntesis como una unidad que regule el patrón de distribución de los carotenoides en los plastidios (Shumskaya y col., 2012).



**Figura 2. Esquema ilustrativo de los complejos multienzimáticos implicados en la biosíntesis de carotenoides en cloroplastos de maíz, según Shumskaya y Wurtzel (2013).** Las proteínas sombreadas en gris no han sido localizadas experimentalmente. PG. Plastoglóbulo Globular, FPG: Plastoglóbulo Fibrilar, CR: Cristales de Carotenoides hipotéticos. Leyenda en Figura 1.

Se ha sugerido que los cambios en los niveles de carotenoides probablemente desencadenan diferentes mecanismos de regulación, dando como resultado la activación de una cascada de señalización para generar respuestas adaptativas en la célula (Nogueira y col., 2013). Sin embargo, aún se desconoce cómo una célula vegetal desencadena diferentes mecanismos de regulación, incluyendo la regulación de la transcripción y la localización de proteínas junto con la organización estructural, organelar y suborganelar, en orden a adaptar el contenido de carotenoides cuando éste ha sido alterado.

#### 1.4 Regulación de la ruta carotenogénica en plantas.

La regulación de ruta carotenogénica es muy compleja, dado los requerimientos fisiológicos de: la germinación, el desarrollo fotomorfogénico, la fotosíntesis, el desarrollo de flores y frutos y en respuesta a diferentes estímulos ambientales (Li y col., 2008; Welsch y col., 2000; Bramley, 2002; Rodríguez-Villalón y col., 2009 a y b).

La regulación puede ocurrir entonces de diferentes maneras. Una de estas es a nivel de 1) redundancia génica, que en muchos casos puede llevar a la especialización de cada gen y su regulación, ya sea tejido-específica o en respuesta a diversos estímulos. Esto ocurre por ejemplo para los genes *lcyb* y *psy* de tomate, los cuales se encuentran en forma de genes parálogos (*lcyb* y *cycb*, y *psy1* y *psy2*), donde *psy1* y *cycb* participan en la ruta carotenogénica durante la maduración de los frutos mientras que los otros dos actúan en esta ruta en las hojas. Genes parálogos de *psy* han demostrado ser inducibles bajo diferentes estímulos. Por ejemplo, el gen *psy3* en arroz y maíz es inducido en respuesta a ABA y se expresa principalmente en la raíz, mientras que los genes *psy1* y *psy2* son regulados por luz y se expresan mayoritariamente en tejido fotosintético (Welsch y col., 2008; Li y col., 2008).

Otro punto de regulación ocurriría a nivel de 2) el secuestro y la acumulación de carotenoides, determinados en parte por la biogénesis de diferentes tipos de plastidios (Deruere y col., 1994; Vishnevsky y col., 1999). Por ejemplo, los mutantes de tomate *hp-2* y *hp-3* poseen una acumulación elevada de pigmentos dado el mayor tamaño de sus cromoplastos (Kolotilin y col., 2007; Galpaz y col., 2008). Además, los carotenoides en cromoplastos se encuentran en forma de plastoglobulos o cristales de mayor estabilidad frente a la degradación lumínica (Steinmuller y Tevini, 1985; Merzlyak y Solovchenko, 2002). En relación a esto, recientemente se determinó

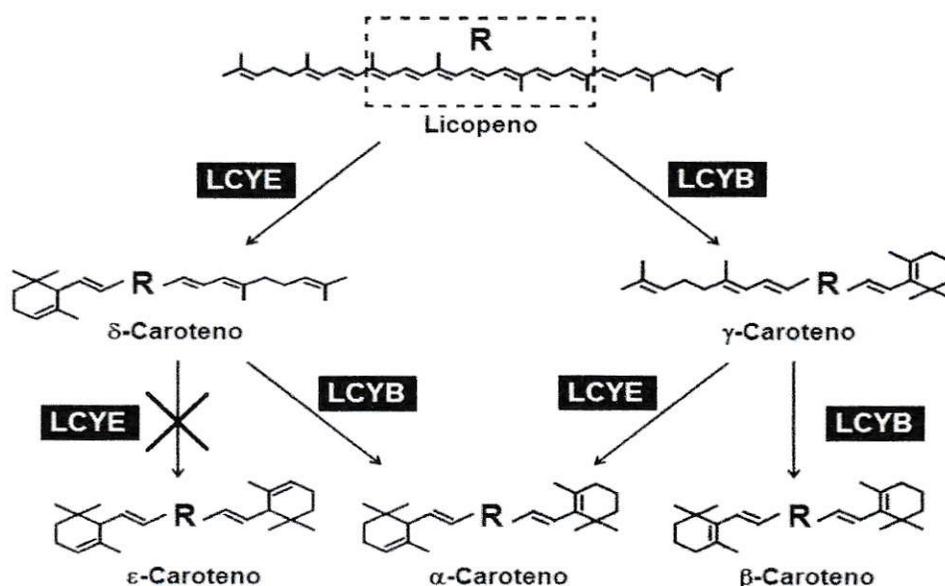
que la tasa de síntesis y degradación de los carotenoides en las hojas es muy elevada (Beisel y col., 2010).

La regulación a nivel transcripcional es responsable de la expresión de genes carotenogénicos, que codifican para las enzimas que participan directamente en la síntesis de los carotenoides en diversos organismos vegetales y en respuesta a una gran variedad de estímulos (Cazzonelli y Pogson, 2010; Lu y Li, 2008): 1) luminoso, ya sea durante la fotomorfogénesis como bajo estrés lumínico; 2: desarrollo y maduración de frutos; 3: estrés abiótico (principalmente sequía y salinidad); 4: retro-alimentación positiva y negativa y 5: fitohormonas.

### **1.5. El gen *lcyb* en la ruta de síntesis de los carotenoides.**

La ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas superiores se bifurca en la ciclación del licopeno, según el tipo de ciclación que sufran los extremos de ésta molécula (Figura 3). Se ha demostrado que alteraciones en la regulación o actividad enzimática en este punto de la vía afectan severamente la composición de carotenoides en distintos tejidos vegetales (Hirschberg, 2001; Bramley, 2002; Botella-Pavia y Rodríguez-Concepción, 2006; Howitt y Pogson, 2006). Pueden producirse dos tipos de anillos,  $\epsilon$ - ó  $\beta$ -, cuya diferencia radica en la posición de un doble enlace en el anillo ciclohexano. El tipo de anillo producido depende de la acción de la enzima 'licopeno ciclasa' (LCY) que actúa sobre el extremo de la molécula. En plantas superiores se han identificado dos tipos de LCYs: LCYB (Licopeno  $\beta$ -ciclasa), que cataliza la formación de anillos  $\beta$ -, y LCYE (Licopeno  $\epsilon$ -ciclasa) que introduce anillos  $\epsilon$ -. Ambas muestran una alta identidad de secuencia aminoacídica, teniendo probablemente un origen evolutivo común (Krubasik y Sandmann, 2000). La enzima

LCYB puede actuar secuencialmente sobre ambos extremos de la molécula de licopeno dando lugar al  $\beta$ -caroteno, con la producción de  $\gamma$ -caroteno como intermediario (Huguene y col., 1995; Cunningham y col., 1996; Pecker y col., 1996). Sin embargo, LCYE sólo puede introducir un anillo en uno de los dos extremos de la molécula de licopeno, originándose  $\delta$ -caroteno. La actuación de LCYB sobre el extremo lineal del  $\delta$ -caroteno da lugar al carotenoide  $\alpha$ -caroteno (Hirschberg, 2001; Fraser y Bramley, 2004; Bouvier y col., 2005). Sólo en algunas especies de lechuga (*Lactuca sativa*) se ha descrito la existencia de una LCYE capaz de introducir dos anillos  $\epsilon$ - en ambos extremos de la molécula de licopeno para producir el compuesto lactucaxantina (Cunningham y Gantt, 2001).



**Figura 3. Reacciones de ciclación en la ruta carotenogénica.** Esquema general de la ciclación del licopeno, tomado de Cunningham y Gantt (1998). En negrita se indican las enzimas que catalizan las reacciones de ciclación. Se indican los sustratos y productos de las enzimas. La dirección de cada reacción se indica con una flecha.  $\beta$ : licopeno  $\beta$ -ciclase.  $\epsilon$ : licopeno  $\epsilon$ -ciclase.



Las enzimas tipo licopeno ciclasas se componen de aproximadamente 400 aminoácidos, con un peso molecular calculado de 40 kDa. Como característica de las enzimas carotenogénicas de plantas, éstas presentan un péptido de destinación a plastidios en la región amino terminal de una longitud de 50-100 aminoácidos (Schnurr y col., 1996). Las proteínas en estado maduro poseen motivos conservados característicos de este tipo de enzimas (Hugueney y col., 1995). En particular se ha reportado la existencia de un sitio de unión a dinucleótidos (FAD/NADH) que parece estar implicado en la activación alostérica (Mialoundama y col., 2010; Hornero Mendez y Britton, 2002). El porcentaje de identidad aminoacídica entre las enzimas carotenogénicas de plantas superiores es de al menos un 78%.

Los genes que codifican LCYBs han sido identificados en tomate (GenBank: X86452), diversas especies de cítricos (GenBank: AF240787, AY166796, AY217103, AF152246), tabaco (GenBank: F13561), pimiento (GenBank: X86221), kiwi (GenBank: FG437038), zanahoria (GenBank: DQ192190, DQ192191). En muchos casos se ha reportado la existencia de dos o más genes *lycb* parálogos, uno (o algunos) de ellos con expresión tejido específica asociada a cromoplastos y otro (s) de expresión asociada a tejido fotosintético. En tomate se ha descrito la existencia de una segunda LCYB (LCYB2, gen *cycb*) específica de tejido cromoplástico, que es 53% idéntica a nivel de aminoácidos a la LCYB canónica (Ronen y col., 2000). Es interesante mencionar que LCYB2 muestra mayor identidad de secuencia con Capsantina-Capsorubina Sintasa (CCS) de pimentón, una enzima bifuncional que cataliza la formación de capsantina y capsorubina (carotenoides específicos de pimentón) a partir de anteraxantina y violaxantina, respectivamente, y que además posee actividad LCYB (Figura 1). A su vez, el gen *ccs* de pimentón se expresa principalmente durante la

maduración de los frutos, y su expresión es indetectable en los tejidos verdes (Hugueney y col., 1995). Otros ejemplos que evidencian la existencia de un gen *lcyb* que se expresa de manera tejido específica, dando cuenta de un mecanismo de regulación de la carotenogénesis en tejidos con altos niveles de carotenoides son los reportados en naranja (Alquézar y col., 2009), azafrán (Ahrazem y col., 2009), papaya (Blas y col., 2010; Devitt y col., 2010), sandía (Bang y col., 2007), entre otros.

En cuanto a los genes licopeno  $\beta$ -ciclase de *Daucus carota* L, en 2007, la mayoría de los genes de la ruta de carotenoides en zanahoria fueron clonados (Just y col., 2007). De acuerdo a lo encontrado en la literatura, el alto contenido de cromoplastos en la raíz de zanahoria, hace suponer la existencia de un gen *lcyb* que se exprese preferentemente en este órgano. Al respecto, fueron anotados dos genes candidatos codificantes para la enzima Licopeno  $\beta$ -ciclase: *DcLcyb1* y *DcLcyb2* (*ccs*). El gen *DcLcyb1* (GeneBank: DQ192190) posee un porcentaje de identidad entre 74% y 77% respecto a las secuencias de ADNc de genes *lcyb* específicos para cloroplastos en plantas y con respecto a *lcyb* de algas y cianobacterias. El silenciamiento de este gen en zanahoria produce la reducción significativa de los niveles de  $\beta$ -caroteno y carotenoides totales en las hojas de la planta (63% y 67% respectivamente). Mientras que en la raíz modificada la disminución de estos pigmentos fue de 45% y 38% respectivamente (Pizarro, 2008). Recientemente, se ha reportado la funcionalidad y caracterización del gen *DcLcyb1* (Moreno y col., 2013) donde se demostró que DcLCYB1 está localizada en los plastidios, y es una enzima funcional, de acuerdo a ensayos de complementación heteróloga realizados en *Escherichia coli*. Adicionalmente se determinó que tanto en hojas como en las raíces de almacenamiento de plantas transgénicas de zanahoria con los niveles más elevados o aquellos más reducidos de *DcLcyb1* habían incrementado o reducido respectivamente

los niveles de clorofila, carotenoides totales y  $\beta$ -caroteno. No obstante se informó que *DcLcyb1* no posee una función organo-específica, éste gen modula la expresión de genes carotenogénicos endógenos y la acumulación de pigmentos en las hojas y raíces de almacenamiento de zanahoria.

Por otra parte, el gen *DcLcyb2* o *ccs* (GeneBank: DQ192191) de *Daucus carota* L. posee un 74% de identidad nucleotídica con *lcyb2* o *Cs $\beta$ -lcyb2* de naranja, *cycb* de tomate y *ccs* de pimentón. En comparación con secuencias de ADNc de *lcyb2* o *cpicycb* de papaya, la identidad nucleotídica es de un 71%, mientras que posee un 65% de identidad nucleotídica con *lcyb2* o *CstLcyB2a* de azafrán. Estos son genes que se expresan preferentemente en cromoplastos, durante la maduración de los frutos y cuya actividad LCYB ha sido demostrada. Paralelamente, análisis filogenéticos realizados en nuestro laboratorio complementan estos antecedentes, agrupando al gen *DcLcyb2* de *Daucus carota* L. con genes *lcyb* que se expresan preferencialmente en tejidos cromoplásticos. Mientras que el gen *DcLcyb1* de *D. carota* L. se agrupa con genes *lcyb* de expresión preferencial en tejidos ricos en cloroplastos (Ocaez y col., 2009).

Es importante destacar que en zanahoria no se ha reportado detección de los pigmentos capsantina ni capsorubina como productos directos de la actividad de la enzima Capsantina Capsorubina Sintasa (CCS). Estos antecedentes indican que es altamente probable que *DcLcyb2* de *Daucus carota* L. codifique para un enzima con actividad LCYB. No obstante, hasta la fecha esto no ha sido demostrado. Adicionalmente, se desconoce cuál sería la participación de *DcLcyb2* en la ruta de síntesis de carotenoides *in planta*.

### 1.5.1 Expresión del gen *lcyb* en modelos vegetales.

Considerando que en el presente se han caracterizado licopeno  $\beta$ -ciclasas de diversas especies vegetales tales como naranja, papaya, kiwi, azafrán, entre otros, la expresión del gen en sistemas heterólogos podría tener aplicaciones biotecnológicas para generar el aumento de carotenoides en plantas.

Se han llevado a cabo distintas estrategias para aumentar los niveles totales de carotenoides y en especial de  $\beta$ -caroteno en distintos organismos vegetales. Se ha sobre-expresado el gen *lcyb* de *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum* (tomate) en plantas de tomate, obteniendo como resultado un aumento y cambio en la composición de carotenoides (Rosati y col., 2000; D'Ambrosio y col., 2004). Mediante la expresión del gen *lcyb* de *Lycium barbarum* en plantas de tabaco se generó un aumento en los niveles de  $\beta$ -caroteno (Ji y col., 2009). Por otra parte, experimentos de silenciamiento génico del gen LCYE en plantas de papa resultaron en aumento en los niveles totales de carotenoides y particularmente en  $\beta$ -caroteno, indicando la factibilidad de redireccionamiento de la ruta metabólica. Estos antecedentes promueven a la ciclación del licopeno como un paso clave en la biosíntesis de carotenoides (Diretto y col., 2006).

### 1.6 *Daucus carota* L. (zanahoria) como modelo de estudio.

La zanahoria doméstica, *Daucus carota* L. var *sativus* ( $2n = 18$ ), es una planta bienal del grupo botánico *Umbelliferae* (o *Apiaceae*), que también incluye el apio (*Apium graveolens*), el perejil (*Petroselinum hortense*), el anís (*Pimpinella anisum*), el eneldo (*Graveolens del Anethum*), entre otras especies. Se distinguen por la

morfología característica de la inflorescencia, una umbela compuesta, con flores en racimo dispuestas radialmente (Pimenov y Leonov, 1993).

*Daucus carota* L., es uno de los aproximadamente 20 miembros del género *Daucus*, en la familia de las umbelíferas. La mayoría de los miembros de este género son diploides, con un número básico de cromosomas de  $X=9$  a  $X=11$  (Simon and Goldman, 2007).

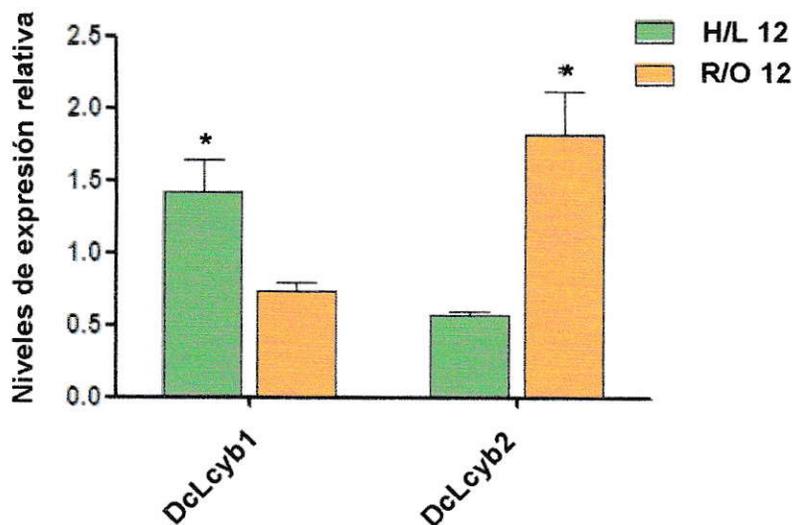
### **1.6.1 Regulación transcripcional de la ruta carotenogénica en *Daucus carota* L.**

Durante el desarrollo en oscuridad de la raíz modificada de zanahoria, nuestro modelo de estudio, existe una acumulación de carotenoides, en especial  $\beta$ -caroteno. Considerando la importancia de la regulación transcripcional de la ruta carotenogénica en otros organismos vegetales, en 2009 fueron determinados los patrones de expresión de seis genes (*DcPsy1*, *DcPsy2*, *DcPds*, *DcZds1*, *DcZds2* y *DcLcyb1*) de esta ruta directamente involucrados en la síntesis de  $\beta$ -caroteno durante el desarrollo de la raíz de zanahoria en oscuridad y en luz y durante el desarrollo de sus hojas (Fuentes, 2009).

Se observó que la expresión de todos los genes analizados es mucho más alta en las hojas respecto a lo detectado en la raíz, en la mayoría de los estadios de desarrollo analizados. Esto puede explicarse debido a la mayor tasa de recambio de estos compuestos en los órganos foliares (Beisel y col., 2010). Adicionalmente, se observó que la expresión de los genes *DcPsy1*, *DcPds*, *DcZds2* y *DcLcyb1* aumenta durante el desarrollo de las hojas, lo cual refuerza el punto anterior, considerando que la tasa fotosintética en hojas maduras es mayor. Por el contrario, los genes *DcZds1* y *DcPsy2*

disminuyen su expresión a medida que transcurre el desarrollo de las hojas, lo cual da indicios de la especialización de los genes parálogos *DcPsy1* y *DcPsy2*, y *DcZds1* y *DcZds2*. El gen *DcLcyb1* presentó el mayor aumento de expresión durante el desarrollo foliar respecto a los demás genes analizados. No obstante, se ha reportado que la expresión de *DcLcyb1* es 1,6 veces mayor en las hojas respecto a los niveles detectados en raíces en una etapa de madurez (Moreno, 2013).

En 2010, se determinaron los niveles de expresión del gen *DcLcyb2* en las hojas y en la raíz de zanahoria. Éstos fueron comparados con los niveles de expresión del gen *DcLcyb1* (Figura 4). De los dos genes *DcLcyb* parálogos presentes en zanahoria, la abundancia de transcrito del gen *DcLcyb2* estaría asociada principalmente a la carotenogénesis en la raíz modificada, ya que presenta un aumento mayor en su expresión en la décimasegunda semana del desarrollo de la raíz, mientras que el gen *DcLcyb1*, estaría más relacionado a la carotenogénesis en las hojas maduras, considerando que el patrón de expresión de éste se invierte en comparación al gen *DcLcyb2*, siendo mayor en hojas respecto a la raíz silvestre de zanahoria de 12 semanas de edad (Ocarez, 2010). Lo anterior fue corroborado por Moreno el año 2013 (Moreno y col., 2013).



**Figura 4. Niveles de mRNA de *DcLcyb1* y *DcLcyb2* en hojas versus raíces de *Daucus carota* L. silvestre.** El calibrador utilizado corresponde al promedio de los valores de Ct de cada gen en las hojas (H) expuestas a luz (L) y las raíces (R) crecidas en oscuridad (O) en zanahorias de 12 semanas de edad. Los asteriscos indican diferencias significativas en los niveles de expresión de cada gen entre ambos tipos de tejido analizados. Test T no-pareado con corrección de Welsch ( $p < 0,005$ ). \*: significativo ( $0,01 < p < 0,05$ ). Resultados Ocaez, N. 2010.

Adicionalmente, en nuestro laboratorio fueron analizados los niveles de expresión de los genes *DcLcyb1*, *DcLcyb2*, *DcPsy1* y *DcPsy2* en plántulas de *D. carota* L. silvestres tratadas con las fitohormonas ABA, 2,4-D y GA3 (Fuentes 2012). En presencia de ABA la expresión de *DcLcyb2* aumenta levemente (1,5 veces) en ABA 200 uM respecto a la condición control, mientras que en el tratamiento con la auxina sintética 2,4-D los niveles de transcrito *DcLcyb2* no presentan cambios significativos. Este comportamiento se repite para el tratamiento con la hormona GA3 a distintas concentraciones (5 uM, 20 uM y 50 uM).

De este análisis es importante destacar que el estudio y la caracterización del gen *DcLcyb2* son un paso clave para determinar su participación en la ruta de síntesis de carotenoides y en cómo los mecanismos regulatorios descritos previamente modulan la expresión de este gen. Por lo tanto, *DcLcyb2* es un candidato importante en el estudio de la carotenogénesis en zanahoria debido a 1) su elevado aumento de expresión en la raíz modificada de zanahoria en oscuridad respecto a los niveles detectados en hojas, y 2) a que, de acuerdo a los análisis de secuencia existentes, es un gen directamente involucrado en la síntesis de  $\beta$ -caroteno, el principal carotenoide acumulado en la raíz modificada de zanahoria. Adicionalmente, es un gen candidato que codificaría para una enzima con actividad lycopeno  $\beta$ -ciclase y que adicionalmente presenta en su secuencia motivos característicos de la enzima capsantina capsorubina sintasa (CCS), no obstante en zanahoria de raíz color anaranjado no se ha reportado la presencia del compuesto capsantina o capsorubina. Por otra parte, el gen *DcLcyb2* es un blanco importante de evaluar debido a que se ha reportado que el gen *lcyb*, así como el gen *psy*, son genes clave en la regulación de esta ruta en varios modelos vegetales.

### 1.7 Estrategia a utilizar.

Dado que hasta la fecha la secuencia del genoma de *Daucus carota* L. no ha sido publicada, la estrategia a utilizar durante este trabajo ha sido aislar y clonar el gen *DcLcyb2* utilizando la secuencia de cDNA (conocida) publicada y anotada por Just el año 2007. Posteriormente, el fragmento amplificado fue clonado en vectores de clonamiento y expresión para determinar su funcionalidad mediante la complementación heteróloga en *Escherichia coli*. Las respuestas funcionales obtenidas se correlacionaron con análisis bioinformático y estructural de la secuencia obtenida. Adicionalmente se determinó la localización sub-celular de la proteína DcLCYB2 mediante la clonación y fusión con el gen reportero *gfp* y se evaluó su funcionalidad en plantas de tabaco mediante la expresión y sobreexpresión del gen carotenogénico comandada por una y dos copias respectivamente del promotor constitutivo 35S en los vectores de destinación correspondientes. Este estudio permite sentar las bases sobre la funcionalidad y el efecto de la expresión del gen *DcLcyb2* de *D. carota* L.



## 1.8 Hipótesis.

“*DcLcyb2* de zanahoria tiene función licopeno  $\beta$ -ciclasa en sistemas heterólogos y modula la expresión de otros genes de la vía carotenogénica”.

## 1.9 Objetivo general.

Determinar y caracterizar la función del gen *DcLcyb2* mediante complementación heteróloga en *Escherichia coli* y mediante la transformación transitoria y estable de plantas de *Nicotiana tabacum*.

## 1.10 Objetivos específicos.

- 1) Aislar, expresar y caracterizar funcionalmente el gen *DcLcyb2* mediante complementación heteróloga en *Escherichia coli* BL21 pDS1B- $\Delta$ crtY.
- 2) Determinar la localización subcelular de DcLCYB2 mediante la transformación transitoria de hojas de *Nicotiana tabacum*.
- 3) Expresar el gen *DcLcyb2* en *Nicotiana tabacum* mediante transformación estable con *Agrobacterium tumefaciens*.
- 4) Determinar el efecto de la expresión del gen *DcLcyb2* en los niveles de carotenoides y en la expresión de genes endógenos claves de la ruta carotenogénica de *Nicotiana tabacum*.

## MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Reactivos

Todos los reactivos utilizados presentan una calidad apropiada para las técnicas empleadas y fueron adquiridos de Fermentas, Promega, Invitrogen, Axygen, Merck y PhytoTechnology Laboratories.

### 2.2 Material vegetal.

#### 2.2.1 Planta modelo: Zanahoria (*Daucus carota* L. cv. Nantes).

Para llevar a cabo algunos de los experimentos de esta Tesis de Magíster se utilizaron zanahorias del cultivar Nantaise o Nantes, cultivadas en tierra bajo condiciones estandarizadas en el invernadero del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Para los experimentos de extracción de ADN genómico relativos al objetivo específico No. 1, se utilizaron muestras de hojas obtenidas de plantas silvestres de zanahoria de 4 meses de edad, cultivadas en una mezcla de tierra de hojas, turba y vermiculita (2:3:1), bajo fotoperíodo de 16h iluminado con luz fluorescente blanca ( $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 20 - 23°C.

Las muestras de tejido foliar fueron congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente después de haber sido colectadas y fueron almacenadas a -80°C para los análisis de extracción de ADN genómico y amplificación por PCR.

#### 2.2.2 Planta modelo: Tabaco (*Nicotiana tabacum* cv Xanthi NN).

Se utilizaron plantas de tabaco *Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi NN de 3 y 6 meses de edad respectivamente, las cuales fueron cultivadas en una mezcla de tierra

de hojas, turba y vermiculita (1:1:1), con un ciclo luz/oscuridad de 16/8 h. El régimen de temperatura luz/oscuridad fue controlado en invernadero a 22/20°C respectivamente.

Para los experimentos de análisis mediante microscopía confocal relativos al objetivo específico No. 2, se utilizaron muestras de hojas agroinfiltradas de plantas de tabaco adultas de aproximadamente 12 semanas de edad, cultivadas en medio hidropónico 1X utilizando lana de roca como sustrato, bajo condiciones estandarizadas y homogéneas descritas en esta sección.

Para los experimentos de transformación estable mediante *Agrobacterium tumefaciens* relativos a los objetivos específicos No. 3 y 4, se utilizaron como explantes, las hojas obtenidas de plántulas de aproximadamente 4 semanas, post-germinación de semillas sembradas *in vitro*, en medio MS sólido (sección 2.3.1.3), en incubadores bajo condiciones estandarizadas descritas en esta sección (misma edad, misma técnica de cultivo). La estrategia utilizada para la obtención de material vegetal tuvo el propósito de contar con material estéril para disminuir la tasa de contaminación en los experimentos de regeneración *in vitro* de tabaco mediante organogénesis somática.

Para los experimentos de extracción de ADN y ARN así como para la determinación del contenido y composición de pigmentos relativos a los objetivos específicos Nos. 3 y 4, se colectaron muestras de hojas obtenidas de plantas adultas de aproximadamente 24 semanas de edad cultivadas en una mezcla de tierra de hojas, turba y vermiculita en proporción 1:1:1, con un ciclo luz/oscuridad de 16/8 h. El régimen de temperatura luz/oscuridad fue controlado en invernadero a 22/20°C respectivamente. Las muestras de tejido fueron utilizadas inmediatamente después de que éstas fueron colectadas.

## 2.3 Material Biológico

### 2.3.1 Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo.

#### 2.3.1.1 Cepas bacterianas.

Se utilizaron cepas de *Escherichia coli* (*E.coli*) DH5 $\alpha$  (Hanahan 1983), One Shot $^{\circledR}$  BL21(DE3) (Invitrogen), One Shot $^{\circledR}$  Mach1 $^{\text{TM}}$  resistente a fago T1 (Invitrogen) y *Agrobacterium tumefaciens* (*A.tumefaciens*) GV3101 (Koncz y Schell, 1986; Hardegger y Sturm, 1998).

#### 2.3.1.2 Plásmidos

pCR $^{\circledR}$ 8/GW/TOPO (Invitrogen). Vector de clonamiento o vector de entrada de tipo Gateway $^{\circledR}$ , el cual posee la enzima Topoisomerasa I unida covalentemente a la secuencia CCCTT del vector, favoreciendo la clonación de los productos de PCR con una adenosina libre en cada extremo. El vector pCR $^{\circledR}$ 8 cuenta con regiones *attL1* y *attL2* flanqueando los extremos de la zona de clonación. Estas regiones permiten el traspaso de los fragmentos clonados en este vector a vectores de destinación mediante tecnología Gateway $^{\circledR}$ , basada en la propiedad de recombinación sitio-específica del fago  $\lambda$  (Hartley y col., 2000) entre el par de secuencias de recombinación homóloga *attL1* y *attL2*, del vector de entrada, y las secuencias *attR1* y *attR2* en el vector de destinación.

Los vectores de destinación de tipo Gateway $^{\circledR}$  poseen los sitios de recombinación *attR1* y *attR2* flanqueando al gen letal de selección *ccdB*. Esta región a su vez se encuentra dentro de los bordes LB y RB, los cuales delimitan la zona que se insertará en el genoma de la planta en estudio. La presencia de los sitios de recombinación en este vector permitieron el reemplazo del gen letal *ccdB* con los

fragmentos de interés previamente clonados en fase respecto a *attL1*, en pCR<sup>®</sup>8. Esta reacción de recombinación es catalizada por la integrasa LR clonasa que interviene en la recombinación entre las regiones *attL1* y *attR1*, y las regiones *attL2* y *attR2* mediante un mecanismo de corte y ligación de hebras.

**pETBlue-1** (Novagen). Vector que facilita la expresión génica para la producción de proteínas nativas y permite el subclonamiento de genes fusionados a secuencias reporteras o de purificación. El vector pETBlue-1 posee el gen de resistencia a Ampicilina para la selección de bacterias transformantes.

Los vectores pETBlue son diseñados con un promotor T7 lac que dirige la expresión del gen de interés y además posee un promotor *E. coli* (tet) que dirige la expresión del péptido  $\alpha$  del gen lac Z. La configuración opuesta de un promotor respecto al otro permite la independencia del análisis de transformantes respecto de la expresión del inserto.

**pGWB5** (Nakagawa y col., 2007). Vector de destinación Gateway<sup>®</sup> de tipo binario utilizado para la expresión constitutiva de un gen de interés fusionado a la secuencia que codifica para una proteína reportera GFP sintética (sGFP, mutación S65T) localizada en el extremo carboxilo de la proteína recombinante.

**pMDC32** (Curtis y Grossniklaus, 2003). Vector de destinación Gateway<sup>®</sup>, utilizado para el análisis funcional de genes en plantas mediante expresión constitutiva y ectópica. En su secuencia presenta una copia doble del promotor 35S CaMV.

**pGWB2** (Nakagawa y col., 2007). Vector de destinación Gateway® de tipo binario utilizado para la sobre-expresión constitutiva de un gen de interés bajo el promotor 35S CaMV.

**pDS1B** (Niklitschek y col., 2008). Vector de expresión generado a partir del plásmido pBAD33 y la clonación en tándem de los genes *crtE* (*geranil-geranil pirofosfato sintasa*), *crtB* (*fitoeno sintasa*), *crtI* (*fitoeno desaturasa*), *crtY* (*licopeno  $\beta$ -ciclase*) y *crtX* (*zeaxantina glucosiltransferasa*) que forman parte de la ruta de síntesis de carotenoides de *Erwinia uredovora*. La cepa portadora del vector es productora de  $\beta$ -caroteno y posee un fenotipo de color amarillo.

**pDS1B  $\Delta$ crtY** (Niklitschek y col., 2008). Plásmido pDS1B modificado el cual presenta una mutación deletérea interna de 612 pb del gen *crtY*, (gen licopeno  $\beta$ -ciclase) de *Erwinia uredovora*. La cepa portadora del vector es productora de licopeno y posee un fenotipo de color rojo.

La Tabla I muestra un breve resumen con el tipo de resistencia a antibióticos codificada en los distintos plásmidos utilizados en esta Tesis.

**Tabla I. Vectores utilizados en esta Tesis de Magíster.** Se indica(n) el/los gen(es) marcadores de resistencia codificado(s) en los distintos vectores utilizados y la respectiva concentración de antibiótico requerida para la selección de transformantes.

NOMBRE	TAMAÑO (pb)	GEN DE RESISTENCIA	RESISTENCIA CONFERIDA	CONCENTRACIÓN DE ANTIBIÓTICO (u µg/mL)
pCR®8/GW/TOPO	2817	<i>Spr<sup>R</sup></i>	Espectinomicina	100
pETBlue-1	2601	<i>Am<sup>R</sup></i>	Ampicilina	100
pDS1B-ΔcrtY	11364	<i>Cam<sup>R</sup></i>	Cloranfenicol	34
pDS1B	11976	<i>Cam<sup>R</sup></i>	Cloranfenicol	34
pGWB5	17961	<i>nptII</i> <i>hpt</i>	Kanamicina (bacterias y plantas) Higromicina (plantas)	100
pGWB2	17236	<i>nptII</i> <i>hpt</i>	Kanamicina (bacterias y plantas) Higromicina (plantas)	100
PMDC32	12097	<i>nptII</i> <i>hpt</i>	Kanamicina (bacterias) Higromicina (plantas)	100

### 2.3.1.3 Medios de cultivo y soluciones.

Para el crecimiento bacteriano y cultivo *in vitro* se utilizaron los siguientes medios:

**LB (Luria-Bertani):** Triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 0,8% (p/v).

**LB-agar:** Triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 0,8% (p/v), 1,6% de agar-agar.

**SOC:** Triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM, glucosa 20mM. Utilizado en cultivos de células transformadas mediante

electroporación.

**Medio MS líquido (pH 5.8):** MS (Murashige y Skoog, 1962. Basal medium, *PhytoTechnology laboratories™*) 0,44% (p/v), mioinositol 0,01%, sacarosa 2% (p/v). Suplementado con acetosiringona 0,8 mM. Utilizado para el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*.

**Medio MS sólido (pH 5.8):** MS con vitaminas (Murashige y Skoog, 1962. Basal medium, *PhytoTechnology laboratories™*) 0,44% (p/v), mioinositol 0,01%, sacarosa 2% (p/v), agar-agar 0,7% (p/v). Utilizado en el cultivo *in vitro* de tejido vegetal.

**Medio de infiltración (pH 5.7):** MgCl<sub>2</sub> 25mM, MES 10mM, acetosiringona 200 uM. Utilizado en experimentos de agroinfiltración de hojas de *Nicotiana tabacum* (objetivo específico 2).

**Medio hidropónico (1X) (pH 6):** KNO<sub>3</sub> 0,125 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0,15 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,075 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 mM, KCl 5uM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 5 uM, MnSO<sub>4</sub> 1uM, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 200 nM, CuSO<sub>4</sub> 150 nM, Na<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Si 10uM, Fe/DTPA 10 uM. Utilizado para riego de plantas en invernadero.

**Tampón TAE 1X:** Ácido acético glacial 19 mM, Tris-base 40 mM, EDTA 1 mM (pH 8).

**Tampón de carga:** EDTA 50 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilencianol 0,25% (p/v) y glicerol 80% (v/v).

Los medios de cultivo de tejido vegetal y bacteriano se esterilizaron mediante autoclavado a 121°C y 1 atm de presión durante 20 min.

## **2.4 Cultivo y transformación de bacterias.**

### **2.4.1 Cultivo de *Escherichia coli***

En medio líquido, la cepa bacteriana se cultivó en agitadores orbitales a 37°C y 150 rpm durante 10-12 hrs en matraces Erlenmeyer o tubos tipo Falcon con diferentes capacidades volumétricas.

En medio sólido, se cultivaron en placas de Petri de 90 mm de diámetro, en medio LB- agar. Las placas fueron incubadas en estufas a 37°C por 16 hrs.

### **2.4.2 Preparación de células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5- $\alpha$ .**

A partir de una alícuota de cultivo líquido en glicerol almacenado a -80°C de la cepa de *E.coli* DH5 $\alpha$  se sembró mediante triple estría una placa con medio LB-agar y se incubó a 37°C durante la noche. Una colonia aislada procedente de la placa se inoculó en 20 mL de medio LB y se cultivó durante la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente 5 mL del preinóculo se añadió a un matraz de 1 L que contenía 500 mL de medio LB y se incubó a 37°C en agitación hasta que alcanzó una absorbancia entre 0,5 y 0,6 a 600 nm. A partir de este punto todas las manipulaciones se realizaron en frío. Las células se centrifugaron 10 min a 1100 g, se descartó el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con 400 mL de agua a 4°C, centrifugando cada vez 10 min a 1100 g. A continuación se resuspendieron en 10 mL de glicerol 10% (a 4°C) y se centrifugaron 10 min a 1100 g. Finalmente las células se resuspendieron en 1 mL de glicerol 10% (a 4°C) y se distribuyeron en alícuotas de 40  $\mu$ L en tubos de 1.5mL (Eppendorf) estériles, que se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su transformación.

### **2.4.3 Transformación de células electro-competentes.**

A una alícuota de 40  $\mu\text{L}$  de células electrocompetentes descongelada en hielo se añadió el vector recombinante (2  $\mu\text{L}$  de la ligación ó entre 50 y 100 ng de ADN plasmídico purificado, en un volumen máximo de 10  $\mu\text{L}$ ). Esta mezcla se introdujo en una cubeta de 2 mm de separación de electrodos (BioRad) preenfriada en hielo, y se introdujo en un aparato "Gene Pulser<sup>TM</sup>" (BioRad). Las condiciones de electroporación utilizadas fueron 125  $\mu\text{F}$  de capacitancia, 200  $\Omega$  de resistencia y un voltaje de 2.5 V. Tras el pulso eléctrico se añadió inmediatamente a la cubeta 1 mL de medio SOC a temperatura ambiente, las células transformadas se resuspendieron y fueron transferidas a un tubo de 1.5mL estéril (Eppendorf), donde se incubaron a 37 °C con agitación durante 1 h. Finalmente, las células fueron centrifugadas a 3000g durante 3 minutos. Luego de descartar más del 80% del volumen de sobrenadante, el pellet obtenido se resuspendió y las células se sembraron en placas Petri con medio LB-agar conteniendo X-Gal (1 $\mu\text{L}$ /mL de una solución de 40 mg/mL en formamida) suplementado con los antibióticos adecuados.

### **2.4.4 Preparación de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* One Shot<sup>®</sup> Mach1<sup>™</sup> y One Shot<sup>®</sup> BL21(DE3).**

Una alícuota de cultivo líquido en glicerol almacenado a -80°C de la cepa de bacteria One Shot<sup>®</sup> Mach1<sup>™</sup> o One Shot<sup>®</sup> BL21(DE3) a transformar se sembró en triple estría en medio LB agar y se dejó incubar a 37°C durante la noche. Al día siguiente 5 mL de LB, suplementado con ácido nalidíxico (100 mg/L), se inocularon con una colonia aislada y se incubaron a 37°C con agitación durante la noche. Al día siguiente un matraz con 50 mL de medio LB se inoculó con 2 mL del precultivo,

dejándose a 37°C en agitación durante 3 h. aproximadamente, hasta alcanzar una absorbancia de 0,5 – 0,6 a 600 nm. Las células se centrifugaron durante 5 min a 3600 g a 4°C y el sedimento se resuspendió con 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M frío (4°C). Tras centrifugar nuevamente en las mismas condiciones, el *pellet* obtenido se resuspendió en 7 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M a 4°C y se incubó 20 min. en hielo. Finalmente las células se centrifugaron durante 5 min a 3600g a 4°C y se resuspendieron en 1.8 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.08 M y glicerol 15%. Las células se guardaron en alícuotas de 200 µL en tubos de 1.5 mL (Eppendorf) estériles y se almacenaron a -80°C.

#### **2.4.5 Transformación de células de *E.coli* quimio-competentes.**

A una alícuota de células quimiocompetentes descongeladas en hielo (200 µL aprox.), se agregó la mezcla de la ligación (10 µL) o el plásmido recombinante (100 ng en un volumen máximo de 10 µL), incubando la mezcla final en hielo durante 1 h. La transformación de las células con ADN plasmidial se llevó a cabo siguiendo el método de golpe térmico descrito por Sambrook y Russell (2001). Brevemente, se dio un golpe a 42°C durante 2 min, al cabo del cual la mezcla se depositó rápidamente en hielo. Posteriormente, se añadió 1 mL de medio LB, y se incubó durante 1 h. a 37°C en agitación (200-250 rpm). Finalmente, las células se sembraron en placas Petri con medio LB-agar y los antibióticos correspondientes.

#### **2.4.6 Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de tejido vegetal.**

La bacteria se cultivó previamente en medio LB (sección 2.3.1.3) con Rifampicina (10 µg/mL), Gentamicina (50 µg/mL) y el antibiótico correspondiente al tipo de vector con el que fue transformada la bacteria, por un período de 17 horas a 28°C en agitación constante a 250 rpm, hasta obtener un D.O.<sub>600nm</sub> de 0,6. La suspensión bacteriana se diluyó en medio MS suplementado con acetosiringona 0,8 mM, utilizando una concentración de bacteria precrecida de 1ml en 50ml de medio MS. Las bacterias se cultivaron en placas de Petri en medio LB-agar suplementado con los antibióticos mencionados anteriormente por 17 hrs a 28°C.

#### **2.4.7 Obtención de células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* GV3101.**

Para la generación de células de *A. tumefaciens* quimiocompetentes, se dejó creciendo 5 mL de cultivo suplementado con gentamicina (100 mg/L) y rifampicina (12,5 mg/L) en agitación a 28 °C durante 18 hr. Posteriormente una alícuota del pre-inóculo se inoculó en 100 mL de LB líquido manteniendo las condiciones y las concentraciones de antibióticos mencionadas hasta alcanzar una D.O. de 0,5 a 600nm. Posteriormente, las células fueron mantenidas durante 10 min en hielo y centrifugadas a 3000 x g durante 20 min a 4°C. El sedimento obtenido se resuspendió en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM estéril y frío (4°C). Alícuotas de células (100 µl) fueron almacenadas a -80 °C.

#### **2.4.8 Transformación de *A. tumefaciens* quimio-competentes.**

A una alícuota de *A. tumefaciens* quimiocompetente descongelada en hielo, se agregaron 500 ng de la construcción de ADN plasmidial de interés y luego la mezcla se mantuvo por 5 min en nitrógeno líquido. Posteriormente, la mezcla se descongeló a temperatura ambiente durante 15 min para luego ser incubada en medio LB a 28 °C durante toda la noche en agitación constante. Finalmente, para la selección de los clones transformados, 50 µL de un concentrado de células transformadas se sembraron en LB-agar suplementado con gentamicina (50 ug/ml), rifampicina (10 ug/mL) y el antibiótico correspondiente a la resistencia codificada en la construcción (ej: kanamicina 100 ug/mL).

#### **2.5 Cultivo *in vitro* y transformación de tejido vegetal.**

##### **2.5.1 Transformación y regeneración *in vitro* mediante organogénesis somática de *Nicotiana tabacum*.**

Para la obtención *in vitro* de plántulas de *Nicotiana tabacum* (tabaco), semillas wild-type almacenadas en la colección de semillas del laboratorio de biología molecular donde se desarrolló esta Tesis de Magíster, fueron esterilizadas de acuerdo al procedimiento descrito por Fisher y Guiltinan (1995). En resumen, las semillas fueron esterilizadas superficialmente durante 20 minutos mediante agitación en una solución de cloro 10% v/v y Tween-20 0,1% v/v. Luego de cinco enjuagues con agua destilada estéril, las semillas fueron sembradas en frascos con medio MS sólido (sección 2.3.1.3) y luego fueron incubadas en una cámara de cultivo de 16 h luz a 22 °C durante aproximadamente 3 semanas. Las hojas completas de las plántulas de tabaco

cultivadas *in vitro* fueron colectadas, en condiciones de esterilidad, para luego ser transformadas mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

La metodología de transformación se realizó de acuerdo a lo descrito por Horsch (1985) y Klee (1987), con algunas modificaciones. Brevemente, las hojas colectadas fueron co-cultivadas en una suspensión de *Agrobacterium* portador del vector de interés en MS líquido durante 10 min. Esta suspensión fue preparada como se detalla en el punto anterior (sección 2.5.1). Durante el cocultivo, los explantes le fueron inferidos cortes con el fin de facilitar la infección de Agro. Posteriormente, los explantes fueron secados en papel absorbente estéril y cultivados durante 48 h en placas Petri con medio MS sólido, en oscuridad. Luego, los explantes fueron lavados con agua destilada estéril suplementada con cefotaxime (300 mg/L) para eliminar remanentes de la suspensión de agro. Una vez que los explantes se secaron, estos fueron depositados en placas Petri con medio N.t. I (Tabla II) durante 3 - 4 semanas a 22 °C con un fotoperíodo de 16 h luz. Transcurrido este tiempo, aquellos explantes donde se observó la aparición de brotes fueron separados y transferidos a medio N.t. II (Tabla II), donde se mantuvieron por 2-4 semanas adicionales para promover la elongación de los brotes.

Los brotes entre 1 y 5 cm de longitud fueron transferidos a frascos con medio N.t. III (Tabla II) de manera de promover la elongación y enraizamiento de éstos. Luego de enraizar, las plántulas generadas y de sobre 5 cm de altura fueron traspasadas a maceteros con una mezcla de tierra de hojas:vermiculita:turba en proporción 1:1:1. Para la aclimatación, las plantas se mantuvieron protegidas con una cubierta plástica translúcida de manera de mantener una atmósfera húmeda (90%) similar a la condición *in vitro*, la cual fue eliminada paulatinamente en un período de 3 semanas. El análisis

molecular de las plantas adultas obtenidas fue realizado aproximadamente 6 meses después de la aclimatación.

**Tabla II. Medios para cultivo *in vitro* de *Nicotiana tabacum* (tabaco).** Hormonas y antibióticos con los que se suplementó el medio basal (MB) compuesto de sacarosa 2%, NaCl, mioinositol. Los antibióticos higromicina y kanamicina fueron agregados de manera independiente de acuerdo al vector utilizado para la transformación (Tabla I).

Nomenclatura	Hormonas		Agente de selección		Antibiótico <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
	IBA (mg/L)	BAP (mg/L)	Higromicina (mg/L)	Kanamicina (mg/L)	Cefotaxime (mg/L)	
<i>Nicotiana tabacum</i> (N.t.)						
Medio	N.t. I	1	5	10	25	300
	N.t. II	---	---	15	50-100	150-300
	N.t. III	---	---	15	100	150-300

### 2.5.2 Transformación transitoria de hojas de *Nicotiana tabacum*.

Para la transformación transitoria de hojas de tabaco se utilizaron plantas adultas silvestres de aproximadamente 12 semanas de edad cultivadas en medio hidropónico (sección 2.2.2.a). La suspensión de bacteria fue preparada en medio de infiltración (sección 2.3.1.3) a partir del cultivo líquido de transformantes de *Agrobacterium tumefaciens* con las construcciones de interés. Cada hoja utilizada fue previamente asperjada con agua para facilitar la apertura estomática. La técnica de agro-infiltración (Kopertekh y Schiemann, 2005) se realizó utilizando una jeringa de 5mL cuyo extremo, desprovisto de aguja, fue incorporado en la zona abaxial del tejido foliar aplicando simultáneamente una presión leve y sostenida en la región de origen de la infiltración. La intensificación del color verde de la hoja fue indicativo de una agro-infiltración adecuada.

Cada hoja utilizada fue identificada y rotulada adecuadamente. El tejido fue muestreado luego de 3 a 4 días post-infiltración.

## **2.6 Métodos de Biología Molecular.**

### **2.6.1 Extracción y purificación de ácidos nucleicos.**

#### **2.6.1.1 Purificación de ADN desde geles de agarosa**

Las bandas de ADN separadas por electroforesis fueron visualizadas y purificadas desde geles de agarosa utilizando el kit ADN Wizard®SV gel & PCR clean-up system (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se utilizó para la reacción de ligación del producto de PCR del gen *DcLcyb2* en el vector de entrada pCR®8 y del fragmento *DcLcyb2* s/t en el mismo vector.

#### **2.6.1.2 Aislamiento y purificación de ADN plasmidial de *E.coli*.**

Para extraer ADN plasmidial a partir de *E. coli*, se inocularon 5 mL de LB suplementado con antibiótico (sección 2.3.1.3), con una colonia aislada y se incubaron a 37°C con agitación constante (200 rpm) durante 12 h. Posteriormente, se purificó el ADN plasmidial utilizando el kit "AxyPrep™ plasmid miniprep" (Axygen Biosciences) según las especificaciones del fabricante. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C. El ADN obtenido se utilizó para subclonar y transformar distintos tipos de cepas bacterianas, para verificar la presencia y orientación de los fragmentos de interés y para su secuenciación.

#### **2.6.1.3 Extracción de ADN genómico a partir de tejido vegetal.**

Para la extracción de ADN genómico de hojas jóvenes de tabaco y zanahoria se homogenizó el tejido en N<sub>2</sub> líquido, y se procedió según el método CTAB descrito inicialmente por Doyle y Doyle (1987), con modificaciones. A 100 mg de tejido fresco previamente pulverizado en mortero se les agregó 600 µL de tampón CTAB (Bromuro

de hexadeciltrimetilamonio al 2% (p/v), NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM y Tris 100 mM (pH 8)), precalentado a 60°C, y 4 µL de mercaptoetanol. La mezcla se transfirió a un tubo de 1.5 mL (Eppendorf) y se incubó con agitación ocasional durante 20 min a 60°C. Posteriormente, se agregaron 400 µL adicionales de tampón CTAB y se continuó incubando la mezcla a 70°C durante 15 minutos. Luego se agregaron 400 µL de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min. La fase acuosa superior donde se encuentra soluble el ADN, fue transferida a un nuevo tubo de 1,5 mL donde se precipitó con un volumen de isopropanol durante 10 min a -80°C. Luego de centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min, se obtuvo el precipitado de ADN, que posteriormente fue lavado con etanol 75% (v/v), secado y resuspendido en 50 µL de agua nanopura. La integridad y la pureza del ADN obtenido fueron verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa.

#### **2.6.1.4 Extracción de ARN a partir de tejido vegetal.**

La extracción de ARN vegetal se realizó utilizando el reactivo TRIzol® (Invitrogen), el cual permite la extracción fenólica del ARN para su posterior precipitación con isopropanol. El procedimiento se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 100 mg de tejido fueron pulverizados en morteros estériles, en presencia de nitrógeno líquido. Luego se agregó 1 mL del reactivo TRIzol®. La mezcla homogenizada se transfirió a un tubo de 1,5 mL (Eppendorf) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 200 µL de cloroformo y se agitó suavemente durante 15 segundos antes de incubar por 3 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 12.000 xg durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se rescató en un tubo de 1,5 mL limpio y se agregaron 500 µL de

isopropanol para luego dejar precipitando por 10 min a temperatura ambiente. Luego de centrifugar durante 10 min a 12.000 xg y una temperatura de 4°C, se lavó el precipitado obtenido con 1mL de etanol 75% (v/v, en agua DEPC libre de nucleasas). Finalmente el precipitado ya seco se resuspendió en agua nanopura libre de RNAsas. La integridad del ARN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa (sección 2.6.5). Utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™, se determinó la concentración y los índices de absorbancia 260/280 y 260/230, indicativos de la pureza del ARN respecto a proteínas y sales y solventes respectivamente. Razones  $\geq 1,8$  indican una alta pureza de la muestra.

#### **2.6.1.5 Pureza y calidad del ARN vegetal.**

En aquellas muestras donde las razones de absorbancia 260/280 y 260/230 detectadas en el equipo NanoDrop™ no fueron satisfactorias para utilizar el ARN purificado como templado en la síntesis de ADNc (razones  $\geq 1,8$ ), éste se limpió agregando un volumen de cloroformo frío y agitando en vórtex durante 5 min. Luego de centrifugar a 10.000 xg durante 5 min a 4°C, la fase superior acuosa donde se encuentra el ARN se precipitó con 3 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M (pH 4.8), durante 30 minutos a -80°C. Luego de centrifugar a 10.000 xg durante 30 min a 4°C el precipitado de ARN se lavó con 1mL de etanol 75% (v/v, en agua libre de nucleasas). Una vez seca la muestra, ésta se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y se determinó su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa. Finalmente, se verificó la concentración y pureza del ARN mediante espectrofotometría en un equipo NanoDrop™.

## 2.6.2 Digestiones enzimáticas.

Se realizaron ensayos de restricción con endonucleasas para linearizar el vector pETBlue-1 utilizado en los experimentos de complementación heteróloga para el clonamiento del fragmento *DcLcyb2*. También se realizaron reacciones de digestión para confirmar la identidad y orientación de fragmentos de interés clonados en los vectores de expresión y destinación utilizados en esta Tesis, tales como pGWB2, pGWB5, pMDC32, pCR®8. Todos los ensayos de restricción se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl, siguiendo las instrucciones del fabricante (Fermentas, Invitrogen), en un baño termoregulado a 37°C a distintos intervalos de tiempo según la enzima utilizada. En la sección de Resultados se detallan las características de cada enzima utilizada así como el tamaño esperado de los fragmentos resultantes de la digestión.

## 2.6.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

### 2.6.3.1 Diseño de partidores

Los partidores utilizados fueron diseñados manualmente y analizados mediante el programa OligoAnalyzer (IDT) [<https://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>] para determinar la temperatura de disociación, el contenido de GC y descartar aquellos con alta probabilidad de formación de homodímeros y heterodímeros. Adicionalmente, para determinar la especificidad de los partidores diseñados, éstos fueron analizados utilizando la herramienta BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Todos los partidores resultaron ser específicos para la secuencia blanco. Posteriormente, los oligos diseñados fueron sintetizados por IDT (<https://www.idtdna.com/site>). Los partidores

fueron resuspendidos en agua nanopura y se almacenaron a una concentración de 250  $\mu\text{M}$  a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para las reacciones de PCR todos los partidores fueron utilizados a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ . El detalle de los partidores utilizados en esta Tesis de Magister se muestra en la tabla III.

<b>Tabla III.</b> Partidores utilizados en esta Tesis para experimentos de PCR convencional, PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) y RT-PCR.				
Partidor	Secuencia del partidor	Ta ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tamaño (pb)	Descripción
<b>FORF ccs</b> sentido	5'-ATG GAG ACC CTT AAA TTT ATC AG-3'	52	1612	Amplificación de marco de lectura abierto de <i>DcLcyb2</i> a partir de ADNg de <i>Daucus carota</i> (Gen Bank: DQ192191.1).
<b>RORF c/t ccs</b> antisentido	5'-GAT AAT ACA TGG TTA CAA ACA TTG-3'			
<b>FORF ccs</b> sentido	5'-ATG GAG ACC CTT AAA TTT ATC AG-3'	52	1474	Amplificación de marco de lectura abierto de <i>DcLcyb2</i> sin codón de término de la traducción (GenBank: DQ192191.1).
<b>R lcyb2 ST</b> antisentido	5'-AAT AGT CTC AAC AGC TAA ATT ACC-3'			
<b>Flcyb2q</b> sentido	5'-GCT TGC GAT GCT TAG CTT GTC ACT C-3'	60	151	Cuantificación de los niveles de transcrito del gen <i>DcLcyb2</i> (GenBank: DQ192191.1).
<b>Rlcyb2q</b> antisentido	5'-CAA TAC CAC CAT TCA CCA ACT CCC-3'			
<b>FNtpsy1q</b>	5'-GGA ACC AAG CTA ATG ACC CCA GAG A-3'	67	164	Cuantificación de los niveles de transcrito del gen <i>Ntpsy1</i> (GenBank: HM345582.1).
<b>RNtpsy1q</b>	5'-GGC CGC CCA CTG AAA ATA TCT TCC-3'	65		
<b>FNtpsy2q</b>	5'-TCA GAG ATG TAG GAG AAG ATG C-3'	60	262	Cuantificación de los niveles de transcrito del gen <i>Ntpsy2</i> (GenBank: KC484704.1).
<b>RNtpsy2q</b>	5'-GCT TCA ATC TCG TCC AAT ATC TTG-3' GCTTCAATCTCGTCC AGA ATC TTG	59		
<b>FNtlcyb1q</b>	5'- CGG TGT TAA ATT CCA CCA CGC CAA-3'	65	121	Cuantificación de los niveles de transcrito del gen <i>Ntlcyb1</i> (GenBank: KC484706.1).
<b>RNtlcyb1q</b>	5'-GAA GCC AGT TGC ATC AAG CAC CAC-3'	66		
<b>M13F</b> sentido	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'	50	----	Secuenciación de las construcciones pCR <sup>®</sup> 8/ <i>DcLcyb2</i> y pCR <sup>®</sup> 8/ <i>DcLcyb2</i> s/t
<b>M13R</b> antisentido	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'			
<b>T7 promoter</b>	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	48	----	Secuenciación de la construcción Blue1/ <i>DcLcyb2</i> .

<b>18s F</b> sentido	5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3'			55	196	Amplificación de un fragmento del gen ribosomal 18S de <i>Daucus carota</i> para verificar la integridad tanto del ADN genómico como del ADNc (Gen Bank: GQ380561.1).
<b>18s R</b> antisentido	5'-ACA ATG ATC CTT CCG CAG GT-3'					
<b>hpt F</b> sentido	5'-TTT GTG TAC GCC CGA CAG T-3'			59	624	Amplificación de un fragmento del gen de resistencia a higromicina para identificación de las construcciones pMDC32/ <i>DcLcyb2</i> y pGWB2/ <i>DcLcyb2</i> .
<b>hpt R</b> antisentido	5' AAG ACC TGC CTG AAA CCG A 3'					
<b>Oligo AP</b>	5'- CGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T-3			61,5	----	Reacciones de RT-PCR para la síntesis ADNc

### 2.6.3.2 PCR convencional

Las reacciones de PCR convencional se llevaron a cabo para amplificar diversos genes y fragmentos génicos utilizados o analizados en esta Tesis (*DcLcyb2*, *hptII*, *18S*) a partir de muestras de ADN genómico, ADN plasmidial o ADNc utilizadas como templado. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25  $\mu$ L, cuya composición fue de 2,5  $\mu$ L del tampón correspondiente a la enzima ADN Polimerasa utilizada para la reacción (Elongasa®, Taq, Paq, Pfu), 1  $\mu$ L de  $MgCl_2$  50 mM, 0,5  $\mu$ L de dNTPs 10 mM, 0,5  $\mu$ L partidor sentido 10 uM, 0,5  $\mu$ L de partidor antisentido 10 uM, 1U de la enzima ADN polimerasa, 30 a 50 ng de ADN o ADNc blanco y agua nanopura hasta completar el volumen total de reacción. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador MyCycler™ de BIO RAD.

Como control negativo de la amplificación por PCR, se realizó una reacción utilizando agua nanopura como muestra blanco. Así también, en la mayoría de los ensayos se incorporó un control positivo utilizando una muestra blanco verificada previamente.

Las condiciones de amplificación de cada uno de los fragmentos mencionados se detallan en la tabla IV. La temperatura de hibridación es específica para cada par de

partidores y se determinó en función de la menor temperatura de fusión (TM) entre cada partidador (tabla III). Por otra parte, el tiempo de extensión (72°C, segmento 3) de cada reacción fue calculado según el tamaño del fragmento a amplificar y la procesividad de la enzima ADN polimerasa utilizada (aprox. 1kb/min).

Todos los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis y posteriormente fueron visualizados en geles de agarosa.

### **2.6.3.3 PCR de colonia.**

Para la identificación de los clones positivos de cepas de *E.coli* y *Agrobacterium tumefaciens* que portan el gen *DcLcyb2* clonado en el vector de entrada pCR®8, en el vector de expresión pETBlue-1 y en los vectores de destinación pMDC32, pGWB2 y pGWB5, se realizaron reacciones de PCR a partir de suspensiones de bacterias provenientes de colonias crecidas en placas Petri con medio LB sólido (sección 2.3.1.3) luego de la transformación celular (secciones 2.4.3 - 2.4.5 y 2.4.8). Para ello, se resuspendió una porción de cada colonia formada en una alícuota de 10 µL de agua nanopura estéril, utilizando una punta de micropipeta p10 (Axygen). De esta suspensión se tomó 1 µl y se agregó como blanco o templado a la mezcla para la reacción de PCR. Las células remanentes en la punta de pipeta utilizada para picar las colonias fueron crecidas en medio LB líquido suplementado con los antibióticos adecuados para *E.coli* o *A.tumefaciens* (secciones 2.4.1 y 2.4.6). Posteriormente, y de acuerdo a los resultados de PCR de colonia obtenidos, cada clon transformado exitosamente con el gen o fragmento de interés fue identificado en las muestras de cultivo líquido preparadas para purificar el ADN plasmidial y continuar con análisis de

restricción enzimática. Las colonias positivas fueron finalmente almacenadas en glicerol 85% estéril (Merck) a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La reacción de PCR de colonia se llevó a cabo en 25  $\mu\text{L}$  de una mezcla de agua nanopura, 1 unidad de Paq ADN polimerasa (Stratagene), Tampón 1X de Paq ADN polimerasa, dNTP's (200  $\mu\text{M}$ ), partidor sentido (200 nM), partidor antisentido (200 nM), 1  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana. Las condiciones de amplificación se detallan en el programa "PCR de colonias" de la Tabla IV. Se consideró una procesividad de la enzima de 1kb/30s. Los partidores utilizados fueron específicos para cada fragmento analizado y los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

#### **2.6.3.4 Adición de residuos de adenosina para clonamiento en pCR<sup>®</sup>8**

Luego de amplificar con Pfu la secuencia codificante completa del gen *DcLcyb2*, se generaron amplicones de extremos romo. Para clonar este producto de PCR en el vector pCR<sup>®</sup>8, se agregó enzimáticamente un residuo de adenosina en el extremo 3' de cada amplicón. La mezcla de reacción estuvo compuesta por 1 $\mu\text{L}$  de tampón de reacción enzimática 1X con  $\text{MgCl}_2$  50mM, dATPs 0,2 mM, 5 unidades de Taq DNA polimerasa, 200ng del fragmento de PCR purificado a partir de un gel de agarosa (sección 2.6.1.1), agua nanopura hasta completar un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . La mezcla se incubó a  $70^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Se utilizaron 1-2  $\mu\text{L}$  de la mezcla en la reacción de ligación con pCR<sup>®</sup>8.



### 2.6.3.5 Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Con el objetivo de generar la hebra de ADN complementario (ADNc) al ARN mensajero, se llevó a cabo la reacción de transcripción reversa (RT). Primero, para eliminar posibles remanentes de ADN genómico producto de la extracción, se incubaron 2  $\mu\text{g}$  de ARN y se añadieron 50 unidades de DNasa I libre de RNAsa (Fermentas), 1  $\mu\text{L}$  de tampón DNasa I 10X (Fermentas), 20 unidades de inhibidor de RNAsa (Ribolock, Fermentas) y se completó hasta 10  $\mu\text{L}$  con agua libre de nucleasas previamente tratada con DEPC (Winkler). Esta mezcla se incubó durante 35 min a 37°C y luego se mantuvo en hielo por 3 min. Finalmente, se agregó 1  $\mu\text{L}$  de EDTA 25 mM para detener la reacción de transcripción inversa, mediante quelación del cofactor ( $\text{Mg}^{+2}$ ). Para una inactivación enzimática total de la enzima Dnasa I, la mezcla fue incubada a 65°C durante 10 min.

Para la síntesis del ADNc se añadió 1  $\mu\text{L}$  de Oligo AP (5'TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGCTTCG3') 10 mM a 5,5  $\mu\text{L}$  (1 $\mu\text{g}$  de ARN) del ARN tratado con DNasa I. Esta solución se incubó en tubos de 0,2mL en el termociclador durante 5 min a 70°C, dando inicio al programa "RT-PCR" (Tabla IV). Luego, se detuvo el programa y los tubos se dejaron en hielo por 5 min. Posteriormente, se añadieron 13,5  $\mu\text{L}$  de una mezcla de 0,5  $\mu\text{L}$  (20 unidades) de inhibidor de RNAsa (Ribolock, Fermentas), 1  $\mu\text{L}$  de la enzima transcriptasa reversa RT Improm II (Promega), 4  $\mu\text{L}$  de tampón 5X de la enzima RT Improm II, 2,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 mM disueltos en agua tratada con DEPC, 4,5  $\mu\text{L}$  de agua tratada con DEPC. Los 20  $\mu\text{L}$  de mezcla final se incubaron a 25°C por 5 min para la hibridación entre el partidor Oligo AP y el ARN, con lo que se reanudó el programa "RT-PCR" en el termociclador. Luego,

se elevó la temperatura a 42°C por 60 min para la extensión de la cadena de ADNc y finalmente se mantuvo a 70°C por 15 min para inactivar la enzima transcriptasa reversa.

Para verificar la integridad del ADNc generado se amplificó mediante PCR el gen *18S* utilizando 1 µL del ADNc sintetizado como molde, incluyendo por cada muestra analizada un control denominado "sin RT" (RT-) de la reacción de transcripción inversa, correspondiente a ARN tratado con Dnasa I como templado, sin haber agregado la enzima RT Improm II. De este modo, se descartó una eventual contaminación ADNc sintetizados con ADN genómico. Posteriormente, se amplificó el gen de interés (ejemplos: *DLcyb2*, *Dclcyb1*, *DcPsy1*, *DcPsy2*, *Ntlcyb*) a partir de 1 µL de cada una de las muestras de ADNc obtenidas empleando PCR convencional o PCR cuantitativo.

#### **2.6.3.6 PCR en Tiempo Real o RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR).**

Para cuantificar los niveles de transcrito de los genes de interés (*18S*, *DcLcyb2*, *Ntpsy1*, *Ntpsy2*, *Ntlcyb*) en las distintas muestras de ADNc de las hojas de tabaco analizadas, se utilizaron reacciones de PCR en tiempo real utilizando la sonda fluorescente SYBR green.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mx3000P (Stratagene), empleando el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR<sup>®</sup>-Green QPCR Master Mix (Stratagene), para los análisis de plantas silvestres y transgénicas de *N. tabacum*. Todas las reacciones se llevaron a cabo en 20 µL de una mezcla de 0,6 µL de partidor en sentido (10uM), 0,6 µL de partidor en antisentido (10uM), 0,3 µL de una dilución 1:500 de la sonda pasiva ROX (incluida en el kit), 8 µL de agua nanopura libre de nucleasas, 0,5 µL de ADNc y 10 µL de *Master Mix* lista para usar según instrucciones del fabricante y que contiene Taq DNA polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y la sonda SYBR Green. Las

condiciones de la reacción programadas en el equipo termociclador se detallan en la tabla IV, en el programa “PCR cuantitativo”, y son independientes de las características físico-químicas de los partidores utilizados. Luego de cada programa de amplificación se realizó una curva de disociación (Tabla IV), donde se cuantificó la cantidad de fluorescencia durante todo el proceso de denaturación y renaturación del producto de PCR. La presencia de una señal única en la curva generada en un gráfico de Fluorescencia vs. T° es indicativo de la especificidad de la reacción.

Todas las reacciones se llevaron a cabo incluyendo dos réplicas biológicas por cada reacción, y fueron realizadas en triplicado técnico analizándose posteriormente las dos réplicas técnicas de mayor similitud. Previo a la utilización de los partidores con la muestra de interés, se determinó la eficiencia (E) de los éstos de acuerdo a la metodología matemática de Pfaffl (2001) descrita en función de la pendiente de la recta generada entre la concentración de templado y el valor Ct (threshold cycle) detectado, siendo:

- $E = (10^{-1/\text{Pendiente}} - 1) \quad (1)$

Todas las cuantificaciones de los genes objetivo analizados en esta Tesis, como por ejemplo los genes *DcLcyb2*, *Ntlcyb*, *Ntpsy1* y *Ntpsy2*, fueron normalizados frente a los niveles de expresión de un gen normalizador, en este estudio el gen ribosomal 18S, de expresión constitutiva en las plantas de tabaco (genes tipo *housekeeping*), con el fin de eliminar posibles diferencias dadas por eventuales diferencias de concentración o calidad del ADNc analizado. Adicionalmente, los datos también fueron relativizados, es decir, comparados con un control o “calibrador”, que

corresponde a una condición de máxima o mínima expresión, o bien cuya expresión es nula o no se detecta, considerando, por ejemplo, el caso de plantas silvestres.

Para representar los resultados de abundancia de transcritos se utilizó la fórmula de Pfaffl (2001):

- Expresión relativa = 
$$\frac{(1+E_{\text{gen objetivo}})^{-(Ct_{\text{gen objetivo}}-Ct_{\text{calibrador gen objetivo}})}}{(1+E_{\text{gen normalizador}})^{-(Ct_{\text{normalizador}}-Ct_{\text{calibrador}})}} \quad (2)$$

A continuación, la Tabla IV muestra un breve resumen con las condiciones de reacción en cadena de la polimerasa descritas en la sección 2.6.3.

**Tabla IV. Programas de PCR utilizados.**

<b>1. Amplificación con <i>Pfu</i> ADN pol. de la secuencia codificante del gen <i>DcLcyb2</i> (1612 pb).</b>			
<b>Segmento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Nº de ciclos</b>
<b>1</b>	94°C	5 min	<b>1</b>
<b>2</b>	94°C	1 min	<b>35</b>
	52°C	1 min	
<b>3</b>	72°C	3 min	<b>1</b>
	72°C	10 min	
	10°C	∞	
<b>2. Amplificación con Elongasa del fragmento <i>DcLcyb2</i> sin codón de término de la traducción (1474 pb).</b>			
<b>Segmento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Nº de ciclos</b>
<b>1</b>	94°C	5 min	<b>1</b>
<b>2</b>	94°C	30 s	<b>35</b>
	52°C	1 min	
<b>3</b>	72°C	4 min	<b>1</b>
	72°C	10 min	
	10°C	∞	
<b>3. PCR de colonia. Amplificación del fragmento <i>DcLcyb2</i> (1612 pb)</b>			
<b>1</b>	94°C	2 min	<b>1</b>
<b>2</b>	94°C	50 s	<b>35</b>
	52°C	55 s	
<b>3</b>	72°C	1 min	<b>1</b>
	72°C	5 min	
	10°C	∞	
<b>4. Amplificación del fragmento de <i>18S</i> (196 pb)</b>			
<b>Segmento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Nº de ciclos</b>
<b>1</b>	94°C	5 min	<b>1</b>
<b>2</b>	94°C	30 s	<b>30</b>
	55°C	1 min	
<b>3</b>	72°C	30 s	<b>1</b>
	72°C	10 min	
	10°C	∞	

<b>5. Amplificación del fragmento del gen <i>hptII</i> (624 pb) a partir de ADNg y ADNc de <i>N.tabacum</i>.</b>			
<b>Segmento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Nº de ciclos</b>
1	94°C	5 min	1
2	94°C	30 s	33
	59°C	1 min	
3	72°C	45 s	1
	72°C	10 min	
	10°C	∞	
<b>6. PCR cuantitativo. Amplificación de los fragmentos génicos <i>DcLcyb2</i> (151 pb), <i>Ntpsy1</i> (pb), <i>Ntpsy2</i> (pb) y <i>Ntlcyb</i> (pb). Cada reacción incluye una curva de disociación.</b>			
<b>Segmento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Nº de ciclos</b>
1	95°C	3 min	1
2	95°C	10 s	40
	60°C	20 s	
3	95°C	1 min	1
	72°C	30 s	
	10°C	30 s	
<b>7. Transcripción Reversa (RT-PCR).</b>			
<b>Segmento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Nº de ciclos</b>
1*	70°C	5 min	1
	25°C	5 min	
2	42°C	60 min	1
	70°C	15 min	
3	10°C	∞	
*Al finalizar el segmento 1 se detiene la reacción para agregar la enzima RT Improm II y otros reactivos de la mezcla de RT-PCR.			

## **2.6.4 Construcciones genéticas.**

### **2.6.4.1 Clonación de los fragmentos de interés en el vector de entrada pCR<sup>®</sup>8.**

La amplificación de los fragmentos de interés para su secuenciación y posterior clonación en un vector de destinación se llevó a cabo utilizando el vector de entrada pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO (sección 2.3.1.2) (Figura 6).

Los productos de PCR correspondientes al marco de lectura abierto de *DcLcyb2* amplificados con Pfu, a los cuales previamente se les agregó un residuo de adenosina en el extremo 3' (sección 2.6.4.4), fueron ligados en el vector pCR<sup>®</sup>8. Esta reacción se llevó a cabo en 6  $\mu$ L de una mezcla de ligación compuesta por 0,5-4  $\mu$ L de producto de PCR purificado, 50 ng del vector de entrada pCR<sup>®</sup>8 y 1  $\mu$ L de solución salina (NaCl 1,2 M, MgCl<sub>2</sub> 0,06 M). Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas para luego transformar células electrocompetentes de *E.coli* DH5  $\alpha$  (sección 2.4.3).

Los clones positivos obtenidos del análisis de PCR de colonia (sección 2.6.4.3) y digestión enzimática (2.6.2) fueron secuenciados y recombinados con los vectores de destinación pGWB2, pGWB5 o pMDC32 utilizados en esta Tesis.

### **2.6.4.2 Clonación de los fragmentos de interés en el vector de expresión pETBlue-1.**

Los fragmentos de PCR obtenidos de la amplificación con Pfu fueron purificados con el kit Wizard<sup>®</sup>SV gel & PCR clean-up system (Promega) y luego fueron clonados en el vector pETBlue-1 (Novagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cantidad de inserto se calculó en función de su tamaño y de la relación

molar requerida (proporción estándar 3:1 inserto:plásmido, recomendada por ambas marcas comerciales). La mezcla de reacción se preparó en frío en un tubo de 0,5 mL y su composición fue 1  $\mu\text{L}$  de T4-DNA ligasa (Fermentas, 5U/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de tampón de reacción 10X (suministrado por la marca comercial), 0,5-2  $\mu\text{L}$  de vector de ligación (50 ng/ $\mu\text{L}$ ), X  $\mu\text{L}$  de inserto (150 ng) y agua hasta completar un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . Con el fin de optimizar la reacción de ligación, se incubó durante la noche (15 hrs) en tubos independientes a 4°C y a 20°C.

#### **2.6.4.3 Clonación de los fragmentos de interés en los vectores de destinación pGWB2, pGWB5 y pMDC32 por recombinación Gateway®.**

La reacción de recombinación se realizó entre el vector de entrada pCR®8 y los vectores pGWB2, pGWB5 o pMDC32 de acuerdo a los distintos objetivos específicos a desarrollar en esta Tesis de Magíster.

Para esto, la recombinación se llevó a cabo en una mezcla compuesta por 180 ng de vector de entrada (1-7  $\mu\text{L}$ ), aproximadamente 300 ng del vector de destinación (en 1  $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de una mezcla con la enzima LR Clonasa™II (Invitrogen) y tampón TE hasta completar un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ , pH: 8. Esta mezcla se incubó durante 1 hr a 25°C hasta que la reacción se detuvo agregando 1  $\mu\text{L}$  de proteinasa K a 37°C durante 10 minutos.

La mezcla de recombinación obtenida fue introducida mediante transformación en células de *E.coli* One Shot® Mach1™ quimiocompetentes. Los clones positivos por PCR de colonias (sección 2.6.4.3) y análisis de restricción (sección 2.6.2) fueron posteriormente incorporados en *A. tumefaciens* (sección 2.4.8) para la transformación de tejido vegetal.

### **2.6.5 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.**

Los ácidos nucleicos fueron visualizados en geles de agarosa al 1%-1,5%, según tamaño esperado del fragmento de ácido nucleico, los cuales fueron sometidos a electroforesis en tampón de corrida TAE 1X (sección 2.3.1.3) y posteriormente fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio (BrEt) 20 mg/L durante 20 min. Previo a ser cargadas en el gel, las muestras fueron mezcladas con el tampón de carga (sección 2.3.1.3) en proporción 5:1 de manera de identificar el frente de migración durante la electroforesis. Para la resolución de bandas de ADN se utilizó 5 V/cm durante 45 min, mientras que para separar moléculas de ARN se utilizaron 3,5 V/cm durante 25 min. Las bandas de ácidos nucleicos fueron visualizadas mediante exposición del gel de agarosa a luz UV en un transiluminador. El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó por comparación con los marcadores de peso molecular (Fermentas). Las imágenes fueron capturadas con el equipo Dark Room Multigenius Syngene utilizando el programa Gene Snap de Syngene. Para los análisis de restricción enzimática y clonamiento, la fluorescencia de las bandas fue cuantificada utilizando el programa ImageJ para calcular la concentración de las muestras analizadas. Así también, para clonar algunas de las bandas visualizadas, éstas fueron separadas del gel utilizando un bisturí y luego fueron purificadas con el kit Wizard®SV gel & PCR clean-up system (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **2.7 Determinación de la cantidad y la composición de los carotenoides.**

### **2.7.1 Extracción de carotenoides a partir de cultivo líquido de bacterias de *E. coli*.**

La extracción de carotenoides a partir del cultivo líquido de *E. coli* se realizó para llevar a cabo los ensayos de complementación heteróloga. Inicialmente, la cepa BL21 pDS1B- $\Delta crtY$  fue cotransformada por electroporación con 100ng de la construcción pETBlue-1/*DcLcyb2* (clon 4) o 100 ng del vector sin inserto pETBlue-1 (control negativo). Por otra parte, la cepa BL21 pDS1B, productora de  $\beta$ -caroteno, fue utilizada como control positivo de la complementación. Las células cotransformadas se sembraron en placas Petri con medio LB sólido suplementado con el inductor de la transcripción, IPTG (1 mM), y los antibióticos ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y cloranfenicol (34  $\mu$ g/mL) (sección 2.4.1). Paralelamente, la cepa BL21 pDS1B fue sembrada en presencia de IPTG (1mM) y ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Luego de inducir con IPTG en oscuridad a 30°C, se seleccionaron y analizaron por PCR 5 colonias con las que se preparó un pre-inóculo (5 mL) a partir del cual se traspasó 1 mL de cultivo por cada 100 mL de medio LB a un matraz con 200 mL de LB líquido con los antibióticos respectivos. Se determinó la D.O. a 600 nm hasta alcanzar un valor entre 0,5 y 0,8, donde 100 mL se traspasaron a un matraz suplementado con IPTG y los otros 100 mL, a otro matraz sin IPTG. Se dejó incubando entre 1-3 días en oscuridad.

Se utilizaron 85 mL para la extracción de pigmentos y los 15 mL restantes, para medir biomasa (peso seco).

Los carotenoides fueron extraídos por triplicado y se comenzó centrifugando los 85 mL de cultivo original durante 10 minutos a 5.000 RPM. Para lavar las células, luego de eliminar el sobrenadante se agregaron 10 mL de agua destilada, donde se obtuvo

una mezcla que se homogenizó y centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm. Tras descartar el sobrenadante se agregaron perlas de vidrio (diámetro: 0,1  $\mu\text{m}$ ) y 1 mL de agua destilada para después agitar en vortex a máxima velocidad por 8 minutos. Posteriormente, se agregó 1 mL de acetona, se agitó en vórtex durante 8 minutos más, se centrifugó por 5 minutos a 4000 RPM y se colectó la fase acuosa en tubos nuevos. Se agregó acetona cada vez hasta decolorar completamente el *pellet* con perlas de vidrio. Consecutivamente, a la fase acuosa colectada se agregaron 2 mL de acetona, para agitar en vórtex por 8 minutos y luego centrifugar durante 5 minutos a 4000 RPM. Tras 3 repeticiones sucesivas de extracción con acetona, se agregaron 2 mL de éter de petróleo (1:4) al sobrenadante colectado y se agitó en vortex por 5 minutos para finalmente centrifugar a 4.000 RPM otros 5 minutos. La fase superior orgánica fue colectada y en cada muestra obtenida se agregó éter de petróleo hasta un mismo volumen conocido. A partir de este volumen final se utilizaron 100  $\mu\text{L}$  para cuantificar los pigmentos totales mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm. Luego las muestras fueron secadas en una atmósfera inerte con nitrógeno gaseoso para finalmente resuspender en 200  $\mu\text{L}$  de acetona y medir por RP-HPLC según el método de Thayer y Björkman (1990).

Para determinar la cantidad de biomasa, 15 mL de cultivo original fueron distribuidos en 3 tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL para luego centrifugar a 12.000 RPM durante 5 min. Luego de descartar el sobrenadante y repetir este procedimiento hasta concentrar 5 mL por tubo, el *pellet* colectado, se dejó secar en una estufa a 80°C durante toda la noche para pesar al día siguiente. De este peso obtenido se restó el peso del tubo vacío para obtener el valor de peso seco final.

### **2.7.2 Extracción de carotenoides a partir de tejido vegetal.**

Para cada una de las líneas transgénicas analizadas se tomaron 100 mg de tejido obtenido de 3 hojas de tabaco de similar tamaño y edad. En el caso de las líneas silvestres que se analizaron, se colectaron aproximadamente 33 mg por cada hoja, utilizando 3 plantas distintas, hasta completar 100 mg de tejido foliar. El tejido recolectado fue macerado en un mortero previamente esterilizado y frío en presencia de N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente, se homogenizó en presencia de 4 mL de una solución de hexano/acetona/etanol (2:1:1 v/v). El homogenizado se traspasó a un tubo de 1,5mL, se agitó en vortex durante 2 min y se mantuvo en hielo y oscuridad por otros 2 min. Luego, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min a 4°C. Los carotenoides se recuperaron de la fase superior y fueron colectados en un tubo tipo Falcon de 15 mL. Durante todo el proceso de extracción el homogenizado se mantuvo en oscuridad y hielo. La solución con los carotenoides extraídos se secó con N<sub>2</sub> gaseoso y se resuspendió en 1mL de éter de petróleo para cuantificar los pigmentos totales mediante espectrofotometría a 474 nm. Posteriormente las muestras fueron secadas nuevamente en una atmósfera inerte con nitrógeno gaseoso para luego resuspender en 200 µL de acetona y medir por RP-HPLC.

### **2.7.3 Cuantificación de los pigmentos totales mediante espectrofotometría.**

Las muestras de pigmentos obtenidos del cultivo líquido de *E. coli* que fueron llevadas a un mismo volumen agregando éter de petróleo (sección 2.7.1), así como los pigmentos extraídos a partir de tejido vegetal resuspendidos en 1 mL de éter de petróleo fueron utilizadas para determinar la concentración de pigmentos totales mediante la determinación de absorbancia en un espectrofotómetro (Shimadzu). Para

esto, se tomó una alícuota de 100 µL de pigmentos resuspendidos y se añadieron 400 µL de éter de petróleo. Esta mezcla se trasladó a una cubeta de cuarzo y se midió la absorbancia a 474 nm para el caso de extractos obtenidos a partir del cultivo líquido de *E. coli*, y a 450 nm para los pigmentos obtenidos de tejido vegetal. Luego de determinar este parámetro, la mezcla fue devuelta al tubo falcon del cual provenían los pigmentos y se secó la extracción nuevamente utilizando N<sub>2</sub> gaseoso. Las muestras fueron guardadas a -80 ° C para su posterior análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa (RP-HPLC). La ecuación que se utilizó para determinar la concentración de carotenoides totales cumple la ley de Lambert-Beer y es la siguiente:

$$\text{Carotenoides totales (ug/g peso seco)} = \frac{\text{Volumen resuspensión} \times \text{D.O} \times 100}{21 \times \text{g peso seco}} \quad (3)$$

En el caso de la manipulación de tejido vegetal fresco, la transformación de peso fresco a peso seco se realizó multiplicando el peso fresco de la muestra por un factor de conversión. Este factor de conversión se determinó mediante la diferencia de peso de 3 gramos de tejido vegetal y el peso obtenido de estas muestras al secarlas durante 48 horas a 60°C, tiempo suficiente para deshidratar estos tejidos. El factor de conversión obtenido para hojas de tabaco fue de 0,11 g peso seco/g peso fresco.

#### **2.7.4 Composición de los pigmentos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC).**

La fracción de carotenoides se resuspendió en 200 µL de acetona (MERCK). Se utilizaron 20 µL de esta solución para el análisis mediante HPLC en Fase Reversa.

Este análisis fue realizado en una columna Hipersy C18 de fase reversa de 15 cm. La fase móvil utilizada fue acetonitrilo/metanol/isopropanol (85/10/5 v/v), con un flujo de 1 mL/min. Mediante el registro de los tiempos de retención detectados en los cromatogramas a 474 nm, y los espectros de absorción obtenidos para cada pico, se determinó la composición de carotenoides presentes de manera predominante en las muestras (licopeno,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, luteína). La concentración de cada tipo de carotenoide se realizó según el método de Thayer y Björkman (1990). Brevemente, se determinó el porcentaje de área bajo la curva descrita por cada pico detectado en un cromatograma y se determinó el porcentaje respecto al área total dada por la suma de las áreas de todas las señales detectadas. Bajo el supuesto de que el área total se correlacionó con la cantidad de carotenoides totales, se determinó la concentración de cada pigmento en función de su composición porcentual.

## **2.8 Análisis bioinformático.**

### **2.8.1 Análisis y alineamiento múltiple de secuencias.**

Las búsquedas de homología de secuencias se llevaron a cabo utilizando el programa BLAST en el sitio web de NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>]. Los alineamientos múltiples de secuencia se dedujeron con el programa CLUSTALW [<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>] (Thompson y col., 1994).

### **2.8.2 Análisis “*in silico*” de la localización subcelular de la proteína DcLCYB2 de *Daucus carota* L.**

El análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica DcLCYB2 para la predicción de un péptido de importación a plastidios se realizó utilizando las

herramientas ChloroP v1.1 [<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>] (Emanuelsson y col., 1999), PCLR [<http://www.andrewschein.com/cgi-bin/pclr/pclr.cgi>] (Schein y col., 2001) y Plant-mPLoc [<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>] (Kuo-Chen y Hong-Bin 2007; 2010). Estos servidores se utilizaron paralelamente para verificar y validar los resultados de localización sub-celular, considerando los distintos criterios utilizados en la generación de algoritmos basados ya sea en bases de datos, ontología génica, dominios funcionales, entre otros.

### **2.8.3 Otros programas y aplicaciones para el análisis bioinformático.**

Durante el desarrollo de esta Tesis de Magíster se utilizaron principalmente los siguientes programas informáticos:

-Vector NTI® (Life Technologies): Análisis de secuencias

-GraphPad Prism: Análisis estadístico de datos y elaboración de gráficos.

También se utilizaron las aplicaciones on line:

-PSIpred: Predicción del perfil de hidrofobicidad y de la estructura secundaria de secuencias proteicas <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> (Jones, 1999).

-ProDom: Reconocimiento de motivos en secuencias proteicas. <http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php> (Bru y col., 2005).

-TMHMM: Predicción de hélices transmembrana en proteínas. <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

## **2.9 Microscopía de fluorescencia confocal.**

Todas las preparaciones de hojas de tabaco transformadas transitoriamente fueron visualizadas previamente con un microscopio de epifluorescencia (Nikon,

ECLIPSE TE2000-S) a los 3 días post-infiltración, con el objetivo de identificar las principales estructuras celulares y evaluar *a priori* la funcionalidad de la construcción pGWB5/*DcLcyb2 s/t* que codifica para la proteína de fusión DcLCYB2-GFP. Como control positivo se utilizó la construcción 35SCaMV::*recA::yfp* (Salinas y col., 2006), gentileza de la Dra. Lee Meisel. El péptido de destinación de *recA* se encuentra clonado río arriba de la secuencia completa de ADNc de *yfp* en el vector pBI2 (*recA* se localiza exclusivamente en cloroplastos). Una vez confirmada la funcionalidad de los clones de *Agrobacterium* transformados con esta construcción, se colectaron explantes de hojas, de zonas próximas al punto de infiltración, los cuales fueron montados en medio MS líquido para ser visualizados con un microscopio de fluorescencia confocal (Zeiss, model Axiovert 135M, Germany) equipado con un láser de ión Argón (Leica, Heidelberg). Las señales de fluorescencia fueron detectadas luego de excitar a una longitud de onda de 488 nm y 543 nm específicas para identificar la señal correspondiente a la expresión del gen reportero *gfp* (fluorescencia verde) o a la señal emitida por la molécula de clorofila (fluorescencia roja) respectivamente. Las secciones confocales fueron colectadas usando ajustes/filtros de emisión de 498 a 525 nm (GFP) y de 640 a 720 nm (clorofila).

Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software Zeiss LSM Image.

## RESULTADOS

### 3.1 Objetivo específico 1. Aislar, expresar y caracterizar funcionalmente el gen *DcLcyb2* mediante complementación heteróloga en *Escherichia coli* BL21pDS1B- $\Delta$ crtY.

#### 3.1.1 Aislamiento y clonación del gen *DcLcyb2* en el vector de entrada pCR<sup>®</sup>8.

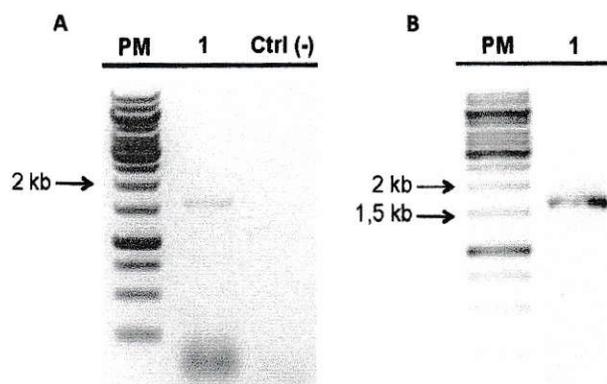
En *Daucus carota* L. (subespecie sativus), se ha descrito que existen dos copias del gen *Lcyb*: *DcLcyb1* y *DcLcyb2* (Just y col., 2007). Las secuencias codificantes completas de ambos genes se encuentran depositadas en la base de datos GenBank y fueron localizadas por Just (2007) en el grupo de ligamiento 3, de acuerdo al mapa descrito por Santos (2001) y Santos y Simon (2002, 2004).

No obstante, la secuencia del gen *DcLcyb2* (*Ccs*) se encuentra anotada en la base de datos (GenBank) como un candidato codificante para la enzima Capsantina-Capsorubina Sintasa (CCS) (Just y col., 2007). Considerando que CCS es miembro de una familia génica que incluye las licopeno  $\beta$ -ciclasas y considerando que en zanahoria no se ha detectado producción de capsantina o capsorubina, en 2007 Just sugiere que dicha secuencia correspondería al gen candidato *DcLcyb2*, considerando que es más probable que el producto génico participe en una reacción tipo  $\beta$ -ciclase y no de la conversión de anteraxantina y violaxantina en capsantina y capsorubina respectivamente. Lo anterior se señala a modo de enfatizar este antecedente como uno de los fundamentos que sustenta la hipótesis planteada en esta Tesis de Magíster.

Adicionalmente, se ha reportado que algunos genes carotenogénicos principalmente del tipo licopeno ciclasa o capsantina-capsorubina sintasa no presentan secuencias intrónicas en su estructura génica (Ronen y col., 2000; Ahrazem y col., 2009; Guzmán y col., 2010). Por lo tanto, para aislar y clonar el fragmento que contiene la región codificante completa del gen *DcLcyb2* de *Daucus carota* L., éste se amplificó mediante PCR directamente a partir de ADN genómico purificado de hojas de zanahorias silvestres de aproximadamente 12 semanas de edad (*Daucus carota* L. cv. Nantes), y se utilizaron partidores diseñados de manera sitio específica en los extremos 5' y 3' sobre la secuencia de ADNc del gen *DcLcyb2* (*Ccs*) de *Daucus carota* L. subesp. *sativus* (GenBank: DQ192191.1), que fue obtenida por Just el año 2007 (Just y col., 2007).

La extracción de ADN se realizó de acuerdo al método CTAB (sección 2.6.1.3). Luego de verificar la integridad y calidad del ADN (datos no mostrados), se amplificó el fragmento de interés utilizando la enzima Pfu y los partidores FORF ccs y RORF c/t ccs (Tabla I. Pizarro, 2008), que amplifican un fragmento de 1.612 pb correspondiente al marco de lectura abierto del gen *DcLcyb2* y parte de la región 3' no traducible (3'UTR).

El producto de la amplificación del gen *DcLcyb2* fue visualizado en un gel de agarosa al 1% (Figura 5). Se obtuvo una única banda de aproximadamente 1,6 kb, correspondiente al tamaño esperado del fragmento de interés (1.612 pb) (Figura 5A). Posteriormente, la banda de ADN obtenida fue purificada y el rendimiento y especificidad de la reacción se determinó mediante la visualización del producto de purificación en un nuevo gel de agarosa 1% (Figura 5B).

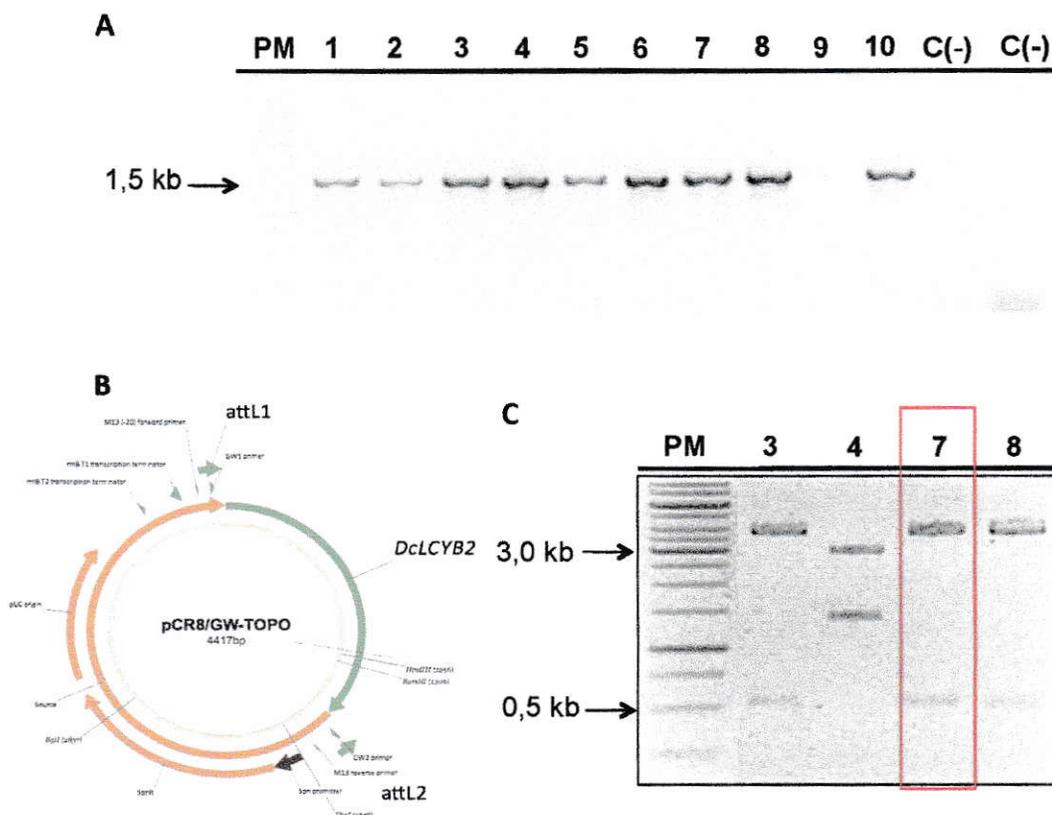


**Figura 5. Obtención del gen *DcLcyb2* a partir de *Daucus carota* L.** **A.** Amplificación del gen *DcLcyb2* a partir de ADN genómico de hojas de *D.carota* L.. Utilizando los partidores FORF ccs y RORF ccs se obtuvo una banda de un tamaño de 1.612 pb. **B.** Purificación del producto de PCR a partir de gel de agarosa visualizado en A. El fragmento purificado fue clonado en el vector de entrada pCR®8. Carril 1: Producto de PCR correspondiente al gen *DcLcyb2* amplificado a partir de ADN genómico de hojas de zanahoria de 12 semanas de edad. Ctrl (-): Control negativo de la reacción de PCR. PM: Estándar de Peso Molecular de 1kb.

Los productos de PCR purificados fueron ligados en el vector de entrada pCR®8. Para la multiplicación del producto de ligación se transformaron células de *E.coli* DH5α mediante electroporación. Diez colonias crecidas en presencia de espectinomicina (100 µg/mL) fueron analizadas por PCR de colonia con el fin de identificar el fragmento de interés (Figura 6A). Para ello se tomó una muestra directa de 10 colonias obtenidas producto de la transformación y se amplificó el gen completo usando los partidores FORF ccs y RORF c/t ccs. De las nueve colonias que resultaron ser positivas para la amplificación del fragmento de interés, cuatro de ellas (colonias 3, 4, 7 y 8) fueron seleccionadas para purificar ADN plasmidial (sección 2.6.1.2) para luego digerir con las enzimas de restricción HindIII y EcoRV durante un 3,5 hrs, de manera de verificar la identidad y orientación del fragmento clonado (Figuras 6B y 6C).

La enzima HindIII reconoce un sitio de corte en el inserto *DcLcyb2*, en la posición nt 1255, considerando el triplete ATG como los tres primeros nucleótidos del inserto. Por otra parte, el vector de entrada no contiene sitios de corte para Hind III. A su vez la enzima EcoRV corta una vez en el vector pCR®8, en la posición nt 809, mientras que no reconoce sitio de corte en el fragmento clonado. Por lo tanto, producto de la reacción de digestión doble de aquellos clones con una inserción en sentido respecto al origen de replicación pUC, se espera visualizar 2 fragmentos, de 482 pb y 3946 pb (Figura 6B). La visualización de bandas de 1381 pb y 3047 pb de tamaño indica la inserción antisentido. De las cuatro muestras de ADN plasmidial digeridas, 3 de ellas presentaron el patrón de bandas esperado (Figura 6C) lo que indicó la presencia del fragmento *DcLcyb2* clonado en fase respecto al origen de replicación pUC del vector pCR®8 (Figura 6B). Posteriormente, se envió a secuenciar el ADN plasmidial de los cuatro clones seleccionados anteriormente para los ensayos de restricción (Macrogen, USA) (sección 3.1.2). Los análisis de secuencia de los clones 3, 4, 7 y 8 presentaron una identidad nucleotídica de al menos un 98% respecto al ADNc del gen *DcLcyb2* de *Daucus carota* L. subesp. *sativus* anotado en bases de datos (Acceso GenBank DQ192191.1). Considerando que el tamaño del gen *DcLcyb2*, amplificado a partir de ADN genómico, es aproximadamente el mismo que el ADNc del gen anotado en bases de datos, los análisis de secuencia del fragmento clonado revelaron que el gen *DcLcyb2* no contiene intrones.

Los clones y los plásmidos recombinantes que contienen la región codificante del gen *DcLcyb2* se denominaron pCR®8/*DcLcyb2*. La construcción correspondiente al clon 7 se utilizó para la generación de todos los vectores de destinación recombinantes de tipo Gateway® descritos posteriormente en esta Tesis.



**Figura 6. Clonamiento del gen *DcLcyb2* en el vector pCR<sup>®</sup>8.** **A.** Amplificación del fragmento *DcLcyb2* mediante PCR de colonias de *E.coli* DH5- $\alpha$  para la identificación de transformantes de pCR<sup>®</sup>8/*DcLcyb2*. **B.** Representación esquemática de la digestión del vector pCR<sup>®</sup>8/*DcLcyb2* con las enzimas HindIII y EcoRV. **C.** Digestión de ADN plasmidial de los clones 3, 4, 7 y 8 con las enzimas HindIII y EcoRV. Los números de cada carril corresponden al clon analizado. Los clones 3, 7 y 8 presentan un patrón de migración de bandas de 482 pb y 3946 pb, indicando el clonamiento en fase del inserto respecto al origen de replicación pUC del vector. Se encuadra en rojo el carril correspondiente al clon 7, utilizado para la generación de las construcciones genéticas de tipo Gateway<sup>®</sup> descritas en esta Tesis. C(-): Control negativo de la reacción de PCR. C(+): Control positivo de la reacción de PCR utilizando ADN genómico como templado. PM: Estándar de Peso Molecular de 1 kb.

### 3.1.2 Análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína DcLCYB2.

Los cuatro clones pCR<sup>®</sup>8/*DcLcyb2* secuenciados presentaron un marco de lectura abierto de 1478 nt que, según predicción teórica, codifica un polipéptido de 492 aminoácidos con una masa molecular calculada *in silico* de 55.27 kDa.

Considerando que en *Daucus carota* L. se ha reportado la existencia del gen *DcLcyb1* (Just y col., 2007) cuya funcionalidad licopeno  $\beta$ -ciclasa fue demostrada en el sistema heterólogo de *E.coli* (Moreno y col., 2013), se realizó un análisis comparativo con esta secuencia aminoacídica (GenBank: ABB52071.1), denominada en esta Tesis como DcLCYB1, utilizando los programas BLAST y CLUSTAL W (sección 2.8.1).

Las secuencias aminoacídicas de DcLCYB1 y DcLCYB2 presentaron un porcentaje de identidad de 59%, localizándose la mayor parte de la variabilidad en el los primeros 100 residuos de aminoácidos del extremo amino (Figura 7; Anexo 1). En esta región, los programas ChloroP v1.1 (Emanuelsson y col., 1999), PCLR (Schein y col., 2001) y Plant-mPLoc (Kuo-Chen y Hong-Bin 2007; 2010) detectaron en la secuencia aminoacídica de DcLCYB2 la existencia de un péptido señal de importación a plastidios, con un sitio de corte entre Glutamina-42 y Cisteína-43 (Figura 8). Localizado en la región amino-terminal se detectó también un dominio, identificado como "Región conservada en LCYB's", que corresponde a una secuencia conservada en todas las LCYB's de plantas y que parece determinante para la asociación de estas proteínas a membrana (Hugueney y col., 1995; Cunningham y col., 1996). Adicionalmente se identificó en ambas proteínas un "Sitio de unión a dinucleótido" (Figura 7, recuadro en verde). Este motivo, definido por la secuencia "DX4GXGXAX4A" y una estructura secundaria característica (lámina  $\beta$ / hélice  $\alpha$ -loop/ lámina  $\beta$ . Figura 8) denominada conformación Rossman (Rossman y col., 1974), está presente en todas

las LCYB's de plantas (Wirenga y col., 1986; Cunningham y col., 1994). Los polipéptidos con este motivo unen dinucleótidos como NADP, NAD, ADP y FAD. En el caso de las ciclasas, esta secuencia se asemeja a la que se encuentra en el extremo N de las enzimas que unen FAD (Van Beeumen y col., 1991; Cunningham y col., 1994). Se ha demostrado mediante el uso de enzimas de bacterias recombinantes, que la ciclación de licopeno en  $\beta$ -caroteno requiere estrictamente NADPH (Schnurr y col., 1996; Hornero-Méndez y Britton, 2002), no obstante, la reacción procede sin ningún cambio redox neto del sustrato (las fórmulas moleculares de los productos son los mismos que los de los sustratos). Mediante el estudio de CCS de pimentón, utilizada como ciclasa modelo, se demostró que la proteína monomérica contiene un FAD unido de forma no covalente, que es esencial para la actividad de la enzima sólo en el presencia de NADPH, que funciona como reductor de FAD. La reacción procede sin transferencia de hidrógeno desde los cofactores de dinucleótidos a los productos enzimáticos  $\beta$ -caroteno o capsantina. Por lo tanto, se propone que FAD en su forma reducida podría estar implicado en la estabilización del carbocatión intermedio (Mialoundama y col., 2010).

De acuerdo al análisis comparativo de secuencia aminoacídica realizado en esta tesis (Figura 7), la región amino terminal identificada en DcLCYB2 se encuentra parcialmente conservada. Sin embargo, entre DcLCYB2 y las ciclasas CaCCS y SICYC-B (codificada por el gen *cyc B*), el grado de identidad en esta región es elevado (81.8%-95.5%. No mostrado).

Los dominios identificados como esenciales para la actividad catalítica de las LCYB's (Bouvier y col., 1997; Cunningham y col., 1996), y que aparecen subrayados en naranja en la Figura 7, se encuentran totalmente conservados entre DcLCYB1 y DcLCYB2. Destacan la serie de aminoácidos NNYGVW-DE cuya búsqueda de

homologías en bases de datos se ha descrito estar únicamente presente en LCYB's y LCYE's, sugiriendo que puede desempeñar un papel fundamental en la determinación de la actividad ciclasa (Krubasik y Sandmann, 2000; Alquézar, 2007).



Análisis comparativos múltiples entre distintas secuencias aminocídicas licopeno  $\beta$ -ciclasas disponibles en bases de datos indicaron que la secuencia proteica de DcLCYB2 es entre un 70% y un 77% idéntica a las LCYBs de otras plantas identificadas hasta la fecha (Anexo 1), tales como la LCYB de kiwi, *Actinidia deliciosa* (77%. GenBank: ACJ66629.1); la LCYB específica de cromoplastos de pomelo, *Citrus paradisi* (76%. GenBank: ACX37456.1); o la LCYB de frutilla, *Fragaria x ananassa* (73%. GenBank: AFR11777.1). Adicionalmente, DcLCYB2 posee un 55% de identidad aminoacídica con la enzima LCYB de tabaco (GenBank: CAA57386.1), codificada por el gen *Ntlcyb* (CrtL-1) cuyos niveles de transcrito fueron cuantificados en líneas transgénicas pMDC32/*DcLcyb2* generadas en esta Tesis de Magíster (sección 3.4.3).

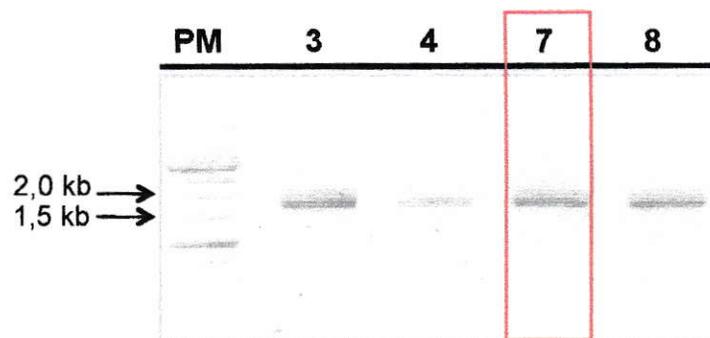
Las estructuras secundarias de DcLCYB1 y DcLCYB2 que fueron simuladas utilizando los servidores CFSSP (Chou y Fasman, 1974) y PSIPRED V3.3 (Jones, 1999) resultaron tener una alta similitud en regiones claves para la actividad de ciclación (Figura 8). En la estructura secundaria de ambas proteínas se aprecia la estructura lámina  $\beta$  /hélice  $\alpha$  /lámina  $\beta$  que daría lugar al dominio de unión a dinucleótido (NADP/NADPH), así como tres hélices  $\alpha$ , localizadas en el extremo carboxilo, señalando una posible localización transmembrana (Hugueney y col., 1995; Cunningham y col., 1996).



### 3.1.3 Clonación del gen *DcLcyb2* en el vector de expresión pETBlue-1 para los ensayos de complementación en *Escherichia coli* BL21 pDS1B- $\Delta$ crtY.

Para aislar el gen *DcLcyb2* y clonar en el vector de expresión pETBlue-1, se amplificó el fragmento clonado en el vector de entrada pCR<sup>®</sup>8 a partir ADN plasmidial correspondiente a los clones 3, 4, 7 y 8. En la reacción se utilizó la enzima *Pfu* y los partidores FORF ccs y RORF c/t ccs, que amplifican el fragmento de 1.612 pb que contiene el marco de lectura abierto del gen *DcLcyb2* y parte de la región 3' no traducible (3'UTR) (no mostrado). Una vez visualizado el producto de la amplificación (en triplicado para cada clon) éste fue purificado desde un gel de agarosa 1% utilizando el *kit* Wizard (Figura 9). Se seleccionó el producto de la purificación correspondiente al clon 7 y se ligó en el vector de expresión pETBlue-1 (3.476 pb) (sección 2.6.3.1), previamente linearizado por digestión con la enzima EcoRV de corte romo, que reconoce un sitio de corte único en la secuencia plasmidial (no mostrado).

Considerando la capacidad correctora de la enzima *Pfu* utilizada en la amplificación del fragmento *DcLcyb2*, se descartó la generación de mutaciones con respecto a la secuencia del fragmento clonado y secuenciado en primera instancia en el vector de entrada pCR<sup>®</sup>8 (clon 7).

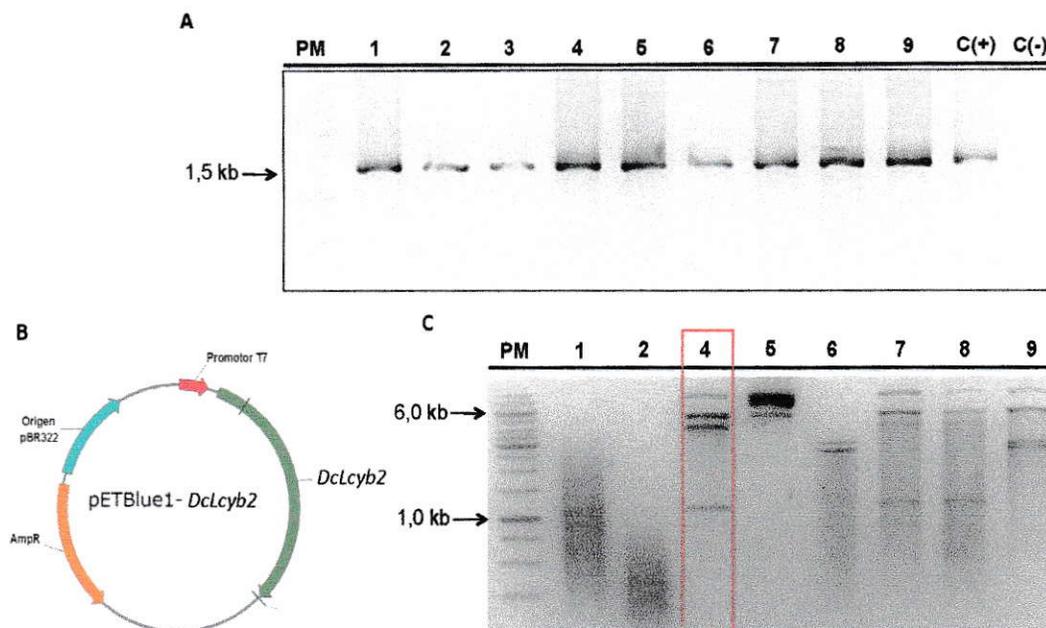


**Figura 9. Aislamiento del gen *DcLcyb2* para ensayos de complementación heteróloga.** Purificación del producto de PCR del gen *DcLcyb2* amplificado a partir de ADN plasmidial de los clones 3, 4, 7 y 8 transformados con el vector pCR<sup>®</sup>8/*DcLcyb2*. Los productos de purificación cargados en cada carril son identificados con el clon utilizado como fuente para la amplificación del gen. El recuadro en rojo indica el carril correspondiente al clon 7 utilizado para la clonación en el vector de expresión pETBlue-1. Electroforesis en gel de agarosa 1% con BrEt. PM: Estándar de Peso Molecular de 1 kb.

El producto de la ligación resultante se utilizó para transformar células electrocompetentes *E. coli* DH5 $\alpha$  (sección 2.4.3), las que se sembraron en medio LB sólido suplementado con el antibiótico ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y el compuesto X-gal (1 $\mu$ L/mL de una solución de 40 mg/mL en formamida, sección 2.4.1). Se seleccionaron 9 colonias blancas que fueron analizadas por PCR de colonia para la detección del fragmento *DcLcyb2* (Figura 10A). Posteriormente, se preparó un cultivo líquido de cada colonia seleccionada, y se purificó el ADN plasmidial de los 8 clones que resultaron ser positivos para la reacción de amplificación. Para verificar la orientación del inserto respecto al promotor T7 y al Operador lac del vector, el ADN plasmidial purificado se digirió con la enzima de restricción *Ssp* I (Invitrogen). Según el análisis predictivo de secuencia de la construcción generada (Figura 10B), existe un sitio de corte único para



la enzima Ssp I hacia la región 3' del fragmento clonado (nt 1582) mientras que en el vector pETBlue-1 también existe un sitio de corte único contenido en el origen de replicación *f1* (nt 1357). Por lo tanto, se espera obtener 2 bandas de 1108 pb y 3979 pb de tamaño como resultado de la digestión del vector recombinante con un fragmento clonado en sentido respecto al promotor T7. Por otra parte, la orientación antisentido del fragmento se identificó por medio de la obtención de dos bandas de 2661 pb y 2426 pb. Luego de realizar la reacción de digestión de los 8 clones seleccionados, se obtuvieron los fragmentos de 1108 pb y 3979 pb de tamaño en los clones 4, 7 y 8, indicando la orientación en sentido del fragmento de interés (Figura 10C). En algunas muestras se observó la aparición de bandas adicionales correspondientes al vector sin digerir (5087 pb) y al vector digerido parcialmente (vector linearizado, ≈10 kb). Los clones y los plásmidos recombinantes portadores del fragmento con la secuencia codificante del gen *DcLcyb2* se denominaron pETBlue-1/*DcLcyb2*.



**Figura 10. Clonamiento del gen *DcLcyb2* en el vector de expresión pETBlue-1. A.** Amplificación del gen *DcLcyb2*, mediante PCR de colonia, para la identificación de clones transformados con la construcción pETBlue-1/*DcLcyb2*. **B.** Representación esquemática de la digestión del vector pETBlue-1/*DcLcyb2* con la enzima *Ssp* I. Se muestra el tamaño y número de fragmentos obtenidos para la detección del inserto clonado en sentido (S) y en dirección antisentido respecto (AS) respecto al promotor T7. **C.** Digestión con *Ssp* I a partir del ADN plasmidial de clones positivos para la amplificación del gen *DcLcyb2* que se muestra en A. Los números de cada carril indican el clon analizado. Los clones 4, 7 y 8 muestran un patrón de migración de bandas de 1108 pb y 3979 pb de tamaño, indicando el clonamiento en fase del inserto respecto al promotor T7 del vector. Se encuadra en rojo el carril correspondiente al clon 4, utilizado en los experimentos de complementación heteróloga. C(+): Control positivo de la reacción de PCR utilizando como templado ADN plasmidial pCR<sup>®</sup>8/*DcLcyb2*(clon3). C(-): Control negativo de la reacción de PCR. PM: Estándar de Peso Molecular de 1 kb.

### 3.1.4 Complementación heteróloga de la cepa mutante *E.coli* BL21 pDS1B- $\Delta$ *crtY* con el gen *DcLcyb2*.

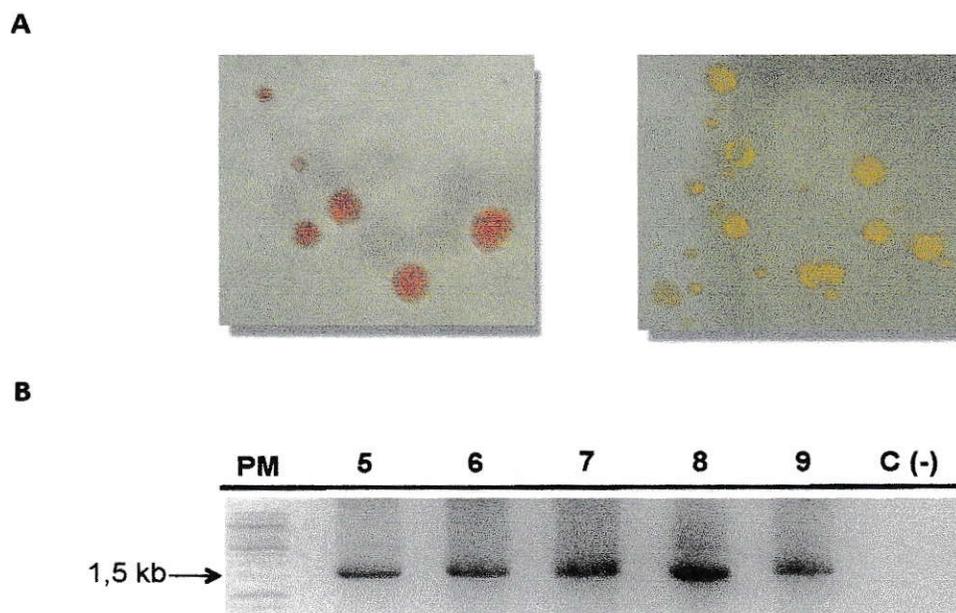
Para evaluar la funcionalidad del gen *DcLcyb2*, se utilizó la cepa bacteriana *E. coli* BL21 transformada con el vector pDS1B- $\Delta$ *crtY* (sección 2.3.1.2), que presenta un fenotipo de color rojo dado por la acumulación de licopeno, sustrato de la enzima licopeno  $\beta$ -ciclasa. La expresión de genes que codifiquen proteínas capaces de ciclar el licopeno generará el cambio de coloración de las colonias de esta cepa de rojo a anaranjado, consecuencia de la acumulación de  $\beta$ -caroteno. Con este objetivo, la cepa BL21 pDS1B- $\Delta$ *crtY* fue cotransformada por electroporación con la construcción pETBlue-1/*DcLcyb2* (clon 4) (sección 2.4.3). Como control negativo de la complementación se utilizó el clon pDS1B- $\Delta$ *crtY* transformado con el vector sin inserto pETBlue-1, mientras que como control positivo se utilizó el clon de *E.coli* BL21 pDS1B transformado con la ruta carotenogénica de *Erwinia uredovora* (sección 2.3.1.2), y en consecuencia acumula principalmente  $\beta$ -caroteno y la coloración de las colonias es anaranjada.

La orientación en fase del inserto respecto al promotor T7 promueve una transcripción exitosa del gen *DcLcyb2*, la cual se inicia tras la inactivación del represor lac en presencia de IPTG, un agente análogo de la lactosa. Por lo tanto, las células cotransformadas con la construcción pETBlue-1/*DcLcyb2*, se sembraron en medio LB sólido suplementado con el inductor de la transcripción, IPTG (1 mM), y los antibióticos ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y cloramfenicol (34  $\mu$ g/mL) (sección 2.4.1).

Cuando la cepa de *E.coli* BL21 pDS1B- $\Delta$ *crtY* fue co-transformada con pETBlue-1/*DcLcyb2* la coloración de las colonias transformadas cambió de rojo a naranja, indicando la conversión de licopeno a otros tipos de carotenoides (Figura 11A). Por

otra parte, no se observó un cambio de color al transformar la cepa mutante pDS1B- $\Delta crtY$  con el vector sin inserto pETBlue-1, considerado como un control negativo de la complementación (no mostrado).

Las colonias obtenidas luego de la transformación fueron analizadas por PCR de colonia (Figura 11B) demostrando que todas las colonias seleccionadas incorporaron la construcción que contiene el gen *DcLcyb2*.



**Figura 11. Transformación de la cepa mutante *E.coli* BL21 pDS1B- $\Delta crtY$  con el gen *DcLcyb2*.** **A.** Coloración de colonias de *E.coli* BL21 pDS1B- $\Delta crtY$  transformadas con el vector sin inserto pETBlue-1, usadas como control negativo de la complementación (Izquierda), y coloración de colonias co-transformadas con pETBlue-1/*DcLcyb2* (Derecha), cultivadas en medio suplementado con el inductor de la transcripción, IPTG (1 mM). Se observa el cambio de coloración de rojo a naranja indicando la conversión de licopeno en otros carotenoides producidos por la bacteria **B.** Amplificación del gen *DcLcyb2*, mediante PCR de colonia, para la identificación de clones transformados con la construcción pETBlue-1/*DcLcyb2*.

Para la identificación de los carotenoides producidos por los transformantes pETBlue-1/*DcLcyb2*, se analizó por HPLC el extracto de pigmentos acumulados por el clon 9 (Figura 11A).

### **3.1.5 Cuantificación y análisis de la composición de carotenoides purificados a partir de *E.coli* BL21 pDS1B- $\Delta$ crtY complementada con el gen *DcLcyb2* de *Daucus carota* L.**

Para determinar la correlación entre el color observado para los distintos tipos de clones empleados y el contenido de pigmentos, se determinó y cuantificó la composición de carotenoides. Con este objetivo, se realizó la extracción de pigmentos a partir de los cultivos líquidos de las cepas bacterianas según los métodos descritos (sección 2.7.1) y se realizó una medición por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) a 474 nm, longitud de onda a la que absorben todos los pigmentos de tipo carotenoides (sección 2.7.4).

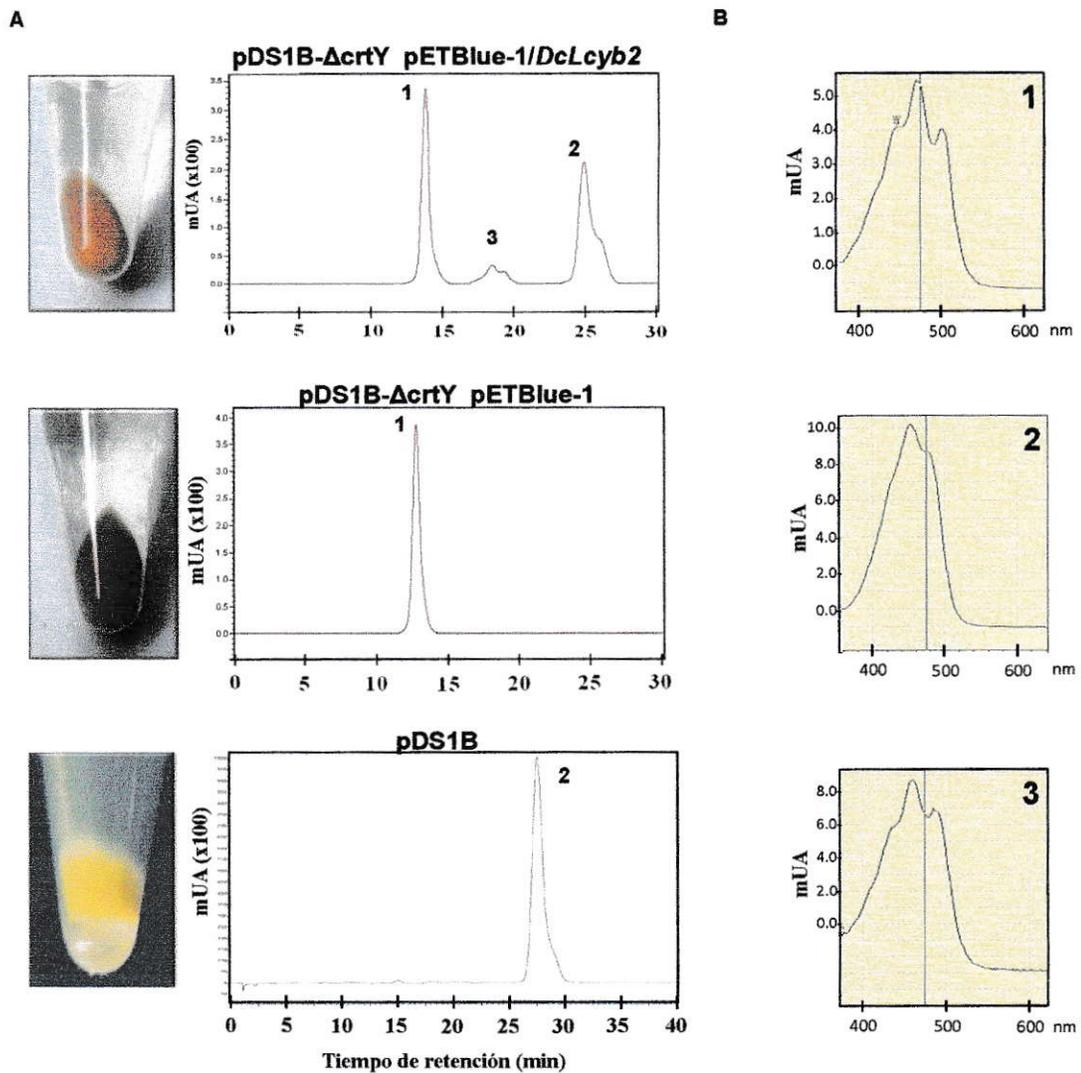
Se obtuvieron cromatogramas con picos cuyos tiempos de retención y espectros de absorción son característicos de los pigmentos licopeno y  $\beta$ -caroteno (Figura 12). En el cromatograma correspondiente a los pigmentos purificados del control positivo (pDS1B) se observó un único pico, cuyo tiempo de retención de aproximadamente 25 min indicó la presencia de  $\beta$ -caroteno. Para el control negativo (pDS1B- $\Delta$ crtY pETBlue-1 sin inserto) se observó también un único pico, con un tiempo de retención característico de 13 minutos, correspondiente al pigmento licopeno

Al analizar el cromatograma de la cepa mutante pDS1B- $\Delta$ crtY co-transformada con la construcción pETBlue-1/*DcLcyb2* se detectó un pico con un tiempo de retención

asociado a la presencia del compuesto licopeno presente en el control negativo, lo que indica que en esta cepa también se acumuló el pigmento. Adicionalmente fueron detectados al menos dos picos nuevos, a los 18 y a los 25 min de tiempo de retención (Figura 12A). Tanto el espectro de absorción así como el tiempo de retención del compuesto que eluyó a los 18 minutos son parámetros que caracterizan al compuesto  $\gamma$ -caroteno en perfiles de HPLC (Teramoto y col., 2003; Zhang y col., 2013). Por lo tanto, se sugiere que la cepa co-transformada acumule este compuesto como un intermediario de la reacción de ciclación del licopeno. No obstante, para confirmar la identidad del pico denominado en esta tesis como “otros carotenoides” (Figura 12), es preciso hacer análisis HPLC utilizando estándares puros o más aún, es preciso analizar las muestras eluidas correspondientes a este pico mediante espectrometría de masas.

Por otra parte, la aparición de un nuevo pico detectado aproximadamente a los 25 minutos de tiempo de elución presentó además un espectro de absorción, comparable con el espectro de absorción que caracteriza cromatográficamente al pigmento  $\beta$ -caroteno, identificado en el control positivo (Figura 12B). Esto demuestra que el fenotipo anaranjado que presentó esta cepa se debe a la acumulación de  $\beta$ -caroteno.

En el perfil de elución correspondiente al control negativo (*E. coli* pDS1B-  $\Delta$ crtY pETBlue-1 sin inserto) no se observa la presencia de un pico que indique acumulación de  $\beta$ -caroteno. Esto demuestra que el vector de expresión en sí mismo no genera algún producto que catalice la formación del pigmento de color naranja.



**Figura 12. Análisis por RP-HPLC de los carotenoides extraídos de las células de *E. coli* complementadas con el gen *DcLcyb2*.** A. Cromatogramas de carotenoides extraídos de células de *E. coli* BL21 pDS1B- $\Delta$ crtY transformadas con los plásmidos pETBlue-1 sin inserto (control negativo) o pETBlue-1/DcLcyb2. B. Espectros de absorción de cada pico detectado en A. 1: licopeno, 2:  $\beta$ -caroteno, 3: "otros carotenoides" ( $\gamma$ -caroteno). Los perfiles de elución de HPLC de los cultivos control que contienen el vector de clonación sin inserto muestran predominantemente un solo pico, cuyo tiempo de retención y espectro de absorción correspondió a licopeno. Los cromatogramas de la cepa co-transformada con el plasmidio pET-Blue1/DcLcyb2 muestran la aparición de al menos dos picos nuevos correspondientes  $\beta$ -caroteno y probablemente a  $\gamma$ -caroteno, definido como "otros carotenoides", de acuerdo al tiempo de retención y espectro de absorción obtenidos. El *pellet* bacteriano de cada cepa transformada se muestra a la izquierda de cada cromatograma. UA: Unidades de Absorbancia.

La cuantificación de cada tipo de pigmento identificado mediante RP-HPLC fue calculada aplicando ecuaciones previamente descritas (Lichtenthaler y Buschmann, 2001), para lo cual se determinó el área bajo la curva correspondiente a los distintos picos de cada perfil cromatográfico en presencia y ausencia del inductor IPTG (1mM). Estos valores fueron normalizados respecto al peso seco obtenido de una muestra de cultivo líquido de los clones analizados, previo a la extracción de pigmentos (sección 2.5.14.2.). Los resultados de la cuantificación fueron tabulados en la tabla V.

Clon	Carotenoides	IPTG (1mM)	Composición de carotenoides (%)	Cantidad de pigmento (ppm)
Clon 9 pETBlue-1/DcLcyb2	Licopeno	+	59,88 ± 15,83	110,7 ± 25,57
		-	43,45 ± 15,39	79,08 ± 35,95*
	β-caroteno	+	40,11 ± 15,83	75,16 ± 31,16
		-	56,55 ± 15,39	99,13 ± 29,16*
	Carotenoides totales	+	100	185,86 ± 6,817
		-	100	178,19 ± 38,19
Control (-) pDS1B-ΔcrtY	Licopeno	+	100	150,77
		-	100	183,77
	β-caroteno	+	0	0
		-	0	0
	Carotenoides totales	+	100	150,77
		-	100	183,79

Los asteriscos indican diferencias significativas de cada clon en comparación con su control negativo en condiciones con y sin inducción. Test-t pareado de dos colas (p <0,05).

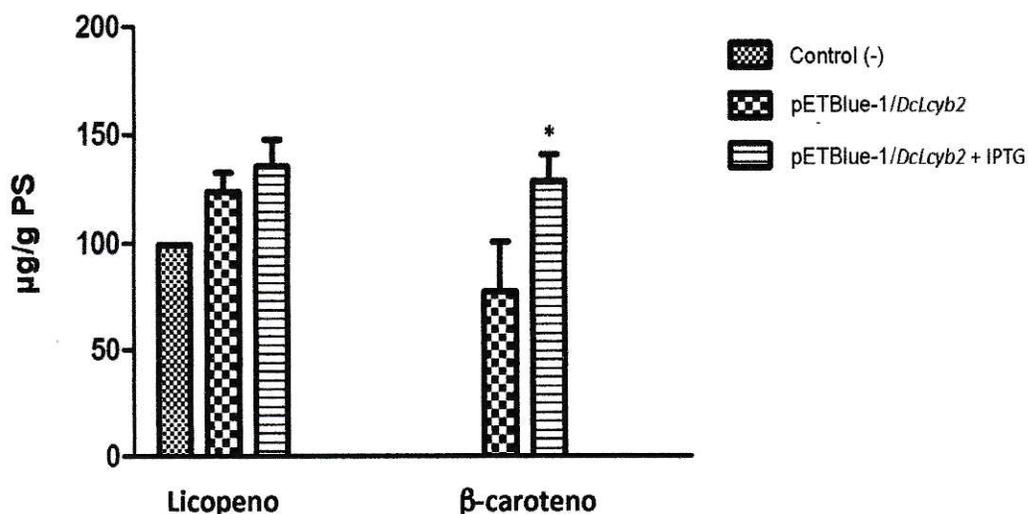
Los datos de concentración de β-caroteno y licopeno detectados en porcentajes preponderantes en los cromatogramas de RP-HPLC fueron graficados y analizados estadísticamente en presencia y ausencia del inductor IPTG (Figura 13).

En primera instancia, se observó que la cantidad de β-caroteno acumulado por la cepa pETBlue-1/DcLcyb2 es significativamente superior en presencia del inductor de IPTG respecto a una condición no inducida. A su vez esta diferencia significativa se

repite con respecto al control negativo co-transformado con el vector pETBlue-1 sin inserto, donde no se detecta formación de  $\beta$ -caroteno.

Por otra parte, la cepa transformada con la construcción pETBlue-1/*DcLcyb2* en presencia de IPTG, se puede observar que la cantidad relativa de licopeno con respecto al control negativo pDS1B- $\Delta$ crtY no es estadísticamente diferente, así como tampoco existen diferencias significativas con respecto al clon cotransformado en ausencia del inductor IPTG . No obstante, existe una mayor producción de  $\beta$ -caroteno a pesar de no existir una conversión total de licopeno a  $\beta$ -caroteno.

De los resultados anteriores se puede determinar que el gen *DcLcyb2* fue capaz de complementar el fenotipo de la cepa mutante transformada con pDS1B- $\Delta$ crtY, restituyendo la ruta de síntesis de  $\beta$ -caroteno. Esto sugiere que en *E. coli*, el gen *DcLcyb2* es funcional y codifica una enzima con actividad licopeno  $\beta$ -ciclase.



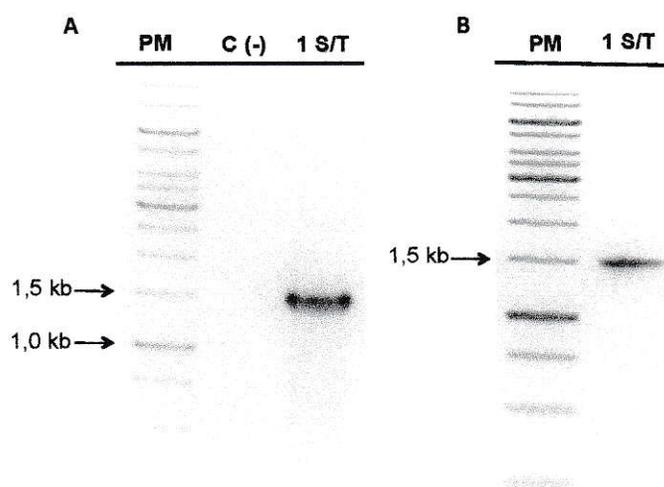
**Figura 13. Niveles de carotenoides producidos por LCYB2.** Niveles de carotenoides medidos mediante RP-HPLC y espectrofotometría en presencia y ausencia de IPTG (1mM). Control (-) representa los niveles de pigmento purificados a partir de un cultivo líquido del clon pDS1B- $\Delta$ crtY cotransformado con el vector sin inserto pETBlue-1. Los asteriscos indican diferencias significativas determinadas por un t-test pareado de una cola ( $p < 0,05$ ).

### 3.2. Objetivo específico 2. Determinar la localización subcelular de DcLCYB2 mediante la transformación transitoria de hojas de *Nicotiana tabacum*.

#### 3.2.1 Clonación del gen *DcLcyb2* s/t en el vector de entrada pCR<sup>®</sup>8.

La localización subcelular de la proteína DcLCYB2 fue determinada mediante la construcción del vector pGWB5/*DcLcyb2* s/t codificante para la proteína de fusión DcLCYB2-GFP. Para la generación de esta proteína recombinante, se amplificó por PCR convencional un fragmento de 1.474 pb utilizando los partidores FORF ccs y RORF s/t ccs (Tabla III) de manera de aislar y clonar en el vector de entrada pCR<sup>®</sup>8, el gen *DcLcyb2* de *D. carota* L. sin el codón de término de la traducción (*DcLcyb2* s/t).

Como hebra molde se utilizó el ADN plasmidial del vector pCR<sup>®</sup>8/*DcLcyb2* (clon 7) generado en esta Tesis de Magíster (sección 3.1.1), el cual contiene la secuencia completa del gen *DcLcyb2*. En la Figura 14 se muestra la amplificación del fragmento de 1.474 pb correspondiente al gen *DcLcyb2* sin el codón de término de la traducción (*DcLcyb2* s/t). El control negativo (carril C-, Figura 14) no presenta amplificado, lo que refleja una correcta manipulación de las muestras y un desarrollo apropiado de la técnica.



**Figura 14. Amplificación del gen *DcLcyb2* sin codón de término de la traducción.**

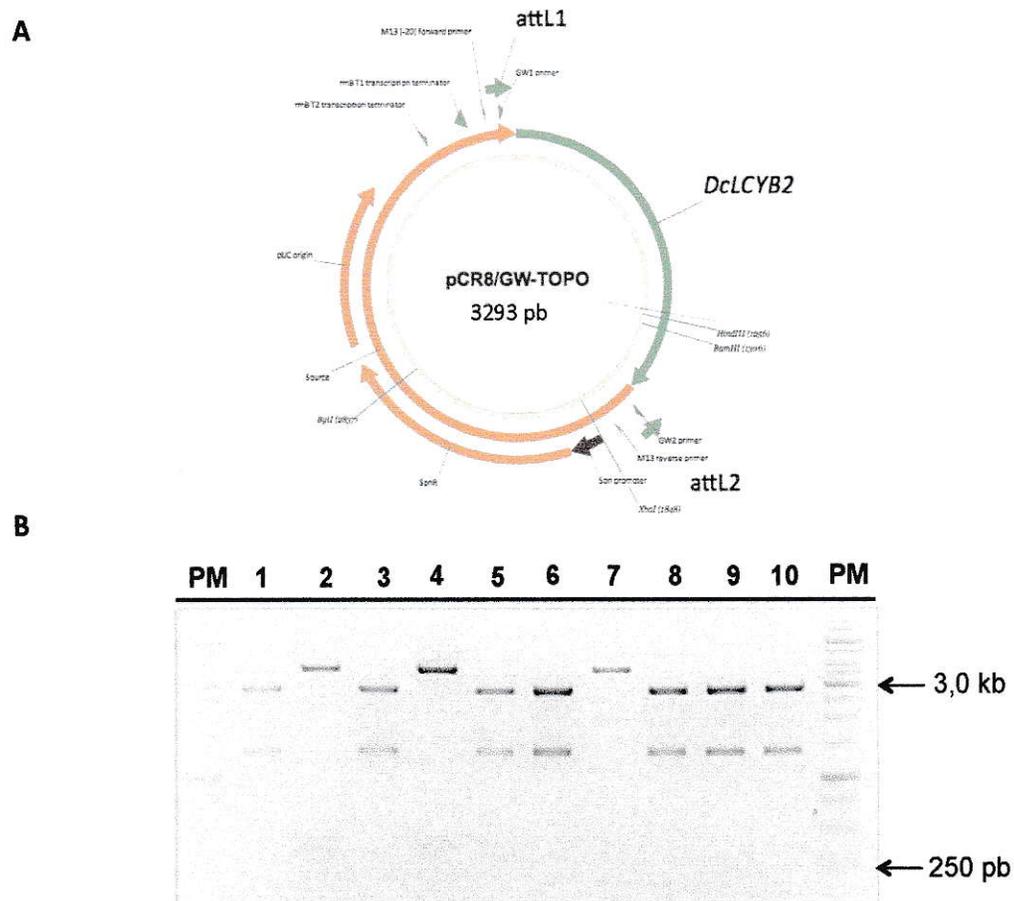
**A.** Se amplificó un fragmento de 1474 pb correspondiente al gen *DcLcyb2* de *D. carota* L. a partir de ADN plasmidial (vector pCR<sup>®</sup>8/*DcLcyb2* clon 7). La secuencia del fragmento amplificado no contiene el codón de término de la traducción (carril 1 S/T). Como control negativo de la reacción de PCR se usó agua nanopura como molde (carril C(-)). **B.** Purificación del producto de PCR a partir de gel de agarosa visualizado en A. El fragmento purificado fue clonado en el vector de entrada pCR<sup>®</sup>8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con BrEt. PM: Estándar de Peso Molecular de 1kb.

Una vez purificado el fragmento amplificado *DcLcyb2* s/t de *D. Carota* L. se llevó a cabo la reacción de ligación con el vector pCR®8 y la transformación de células de *E. coli* quimio-competentes One Shot® Mach1™ (sección 2.4.5).

Veinte colonias crecidas en presencia de espectinomicina (100 µg/mL) fueron analizadas por PCR de colonia con el fin de identificar el fragmento de interés. Un total de 17 colonias resultaron ser positivas para la amplificación del fragmento *DcLcyb2* s/t (no mostrado). En paralelo, se extrajo el ADN plasmidial de las veinte colonias seleccionadas inicialmente (sección 2.6.1.2) para luego digerir con las enzimas de restricción Hind III y Eco RV simultáneamente, de manera de verificar la identidad y orientación del fragmento clonado en pCR®8 (Figura 15A)

La enzima Hind III corta una vez en el inserto, mientras que la enzima Eco RV corta una vez en el vector pCR®8. De las veinte colonias cuyo ADN plasmidial fue digerido, se obtuvieron nueve clones que presentaron dos bandas de 337 pb y 3956 pb. Este patrón corresponde a lo esperado para un vector que porta el inserto *DcLcyb2* s/t en orientación sentido respecto al origen de replicación pUC y al sitio attL1. El patrón de bandas para el inserto en antisentido es de 1371 pb y 2922 pb.

La figura 15B muestra una digestión representativa del ADN plasmidial de 10 clones analizados, donde 3 de ellos presentan el inserto en fase respecto al sitio de recombinación attL1.



**Figura 15. Digestión enzimática de la construcción pCR<sup>®</sup>8/*DcLcyb2* s/t.** **A.** Esquema del vector pCR<sup>®</sup>8/*DcLcyb2* s/t donde se indica la ubicación del inserto *DcLcyb2* s/t (sin codón de término) y los sitios de corte de las enzimas Hind III y Eco RV. **B.** Carriles 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 y 10: Digestión de ADN plasmidial de diez clones que portan el vector pCR<sup>®</sup>8/*DcLcyb2* s/t con las enzimas Hind III y Eco RV. Los clones 2, 4 y 7 muestran el patrón de bandas de 337 pb y 3956 pb esperado para la inserción del fragmento clonado en fase respecto al sitio de recombinación attL1 y al origen de replicación pUC. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con BrEt. PM: Estándar de Peso Molecular de 1 kb.

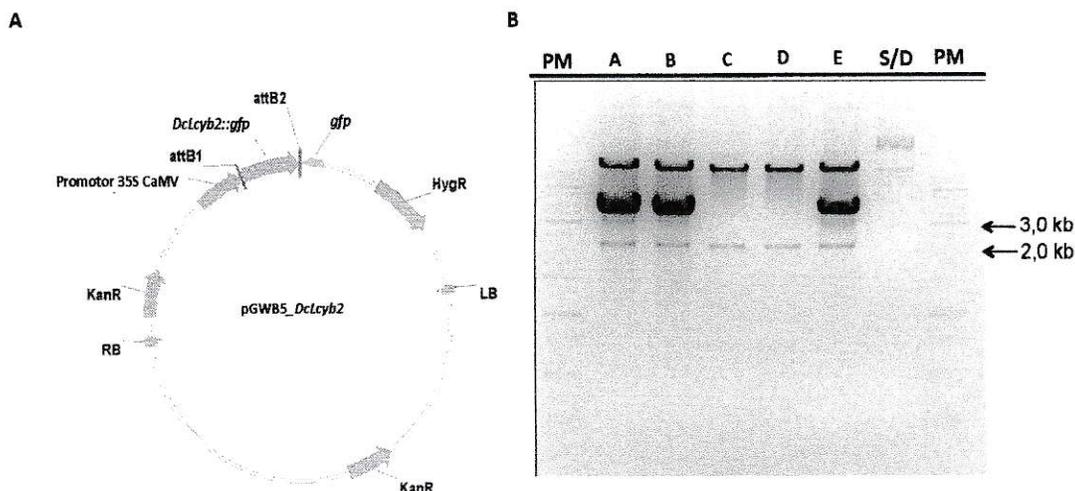
### 3.2.2 Construcción del vector binario pGWB5/*DcLcyb2 s/t*.

Una vez obtenidos los clones positivos de pCR<sup>®</sup>8 que portan el fragmento *DcLcyb2 s/t* en orientación sentido respecto a attL1, se generó la construcción pGWB5/*DcLcyb2 s/t* mediante recombinación sitio-específica con el vector pGWB5 (17961pb) (Tecnología Gateway<sup>®</sup>, sección 2.6.3.2), con el objetivo de fusionar el fragmento de interés al gen *gfp*, que codifica para una proteína fluorescente verde utilizada como reportera de la proteína recombinante DcLCYB2-GFP. Esta proteína reportera fue fusionada en el extremo carboxilo, con el objetivo de no alterar la configuración del péptido de destinación a plastidio, localizado en la región amino terminal de la secuencia aminoacídica de DcLCYB2, según se predijo en esta Tesis (sección 3.1.2) y cuyo sitio de corte se encuentra entre los residuos de aminoácidos Glutamina-42 y Cisteína-43 (Figura 8).

Los productos de la reacción de recombinación Gateway<sup>®</sup> se utilizaron para transformar células quimio-competentes One Shot<sup>®</sup> Mach1<sup>™</sup> (sección 2.4.5), las que se sembraron en medio LB sólido suplementado con el antibiótico kanamicina (100 µg/mL) como agente de selección de la transformación codificado en pGWB5. Como control de la recombinación se creció una alícuota de células transformadas en medio LB sólido suplementado con los antibióticos kanamicina (100 µg/mL) y cloranfenicol (40 µg/mL). Se seleccionaron 10 colonias que fueron analizadas por PCR de colonia para la detección del fragmento *DcLcyb2 s/t* utilizando los partidores FORF ccs y RORF s/t ccs (Tabla I). Todos los clones analizados resultaron ser positivos para la amplificación del inserto (no mostrado). Posteriormente se preparó un cultivo líquido de cada colonia analizada por PCR, y se purificó el ADN plasmidial que fue digerido con la enzima Hind III (Invitrogen), para verificar la orientación del inserto *DcLcyb2 s/t* respecto al promotor 35S CaMV presente en el vector pGWB5.

La enzima Hind III reconoce un sitio de corte único en el vector de expresión y otro en el fragmento *DcLcyb2 s/t* (Figura 16A). Como resultado de la digestión del ADN plasmidial de todos los clones analizados, se obtuvieron dos bandas de 2.128 pb y 15.714 pb. Como es de esperar en una reacción de recombinación sitio-dirigida, el patrón de bandas obtenido indicó el clonamiento en sentido del inserto *DcLcyb2 s/t* respecto al promotor 35S CaMV. La figura 16B muestra una digestión representativa del ADN plasmidial de 5 clones analizados, donde se observa el patrón de bandas de 2.128 pb y 15.714 pb. No obstante, en 3 de los 5 clones analizados se observa una banda adicional de ADN plasmidial. De acuerdo a las indicaciones de manufactura de la enzima LR clonasa II (Invitrogen) utilizada en la reacción de recombinación entre el vector de entrada y el vector de destinación (sección 2.6.3.2), se trataría de un exceso de ADN plasmidial del vector pCR<sup>®</sup>8/*DcLcyb2 s/t*.

Adicionalmente, el ADN plasmidial de los clones C y D (Figura 15B), fue digerido con las enzimas BstE II y SacI para corroborar la identidad y orientación del fragmento *DcLcyb2 s/t* (no mostrado). Luego de confirmar la identidad y orientación del inserto en ambos clones, las construcciones fueron secuenciadas y posteriormente fueron utilizadas para transformar *Agrobacterium tumefaciens* (sección 2.4.8).

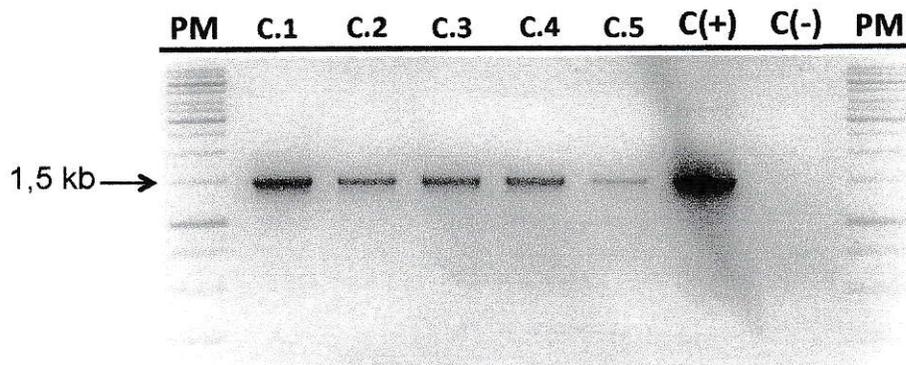


**Figura 16. Digestión de la construcción pGWB5/DcLcyb2 s/t con Hind III.** **A.** Esquema representativo del vector pGWB5/DcLcyb2 s/t (17.842 pb) digerido con la enzima de restricción Hind III donde se espera liberar un fragmento de 2.128 pb esperado para una orientación en sentido respecto al promotor 35S CaMV. **B.** Digestión con Hind III del ADN plasmidial de seis clones de *E.coli* One Shot® Mach1™ (carriles A, B, C, D, E) que portan el vector pGWB5/DcLcyb2 s/t (sin codón de término). Los clones C y D muestran la digestión completa del vector a partir de la cual se obtuvo el patrón de bandas de 2.128 pb y 15.714 pb, esperado para la inserción del fragmento clonado en sentido respecto al promotor 35S CaMV. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con BrEt. S/D: Vector pGWB5/DcLcyb2 s/t sin digerir. PM: Estándar de Peso Molecular de 1 kb.

### 3.2.2 Obtención de *Agrobacterium tumefaciens* transformado con el vector pGWB5/DcLcyb2 s/t.

Se obtuvieron colonias de *A. tumefaciens* GV3101 transformadas con la construcción pGWB5/DcLcyb2 s/t (sección 2.4.8) a partir de las cuales se hizo un PCR de colonias con los partidores FORF ccs y RORF s/t ccs, específicos para amplificar el inserto *DcLcyb2* s/t completo (Tabla I). Utilizando esta estrategia experimental se corroboró de manera temprana que la construcción con el fragmento de interés efectivamente se integró en el genoma de *A. tumefaciens*. La totalidad de los clones

analizados resultaron ser positivos para la amplificación del fragmento *DcLcyb2 s/t* (Figura 17).



**Figura 17. PCR de colonia de *A. tumefaciens* transformado con el vector pGWB5/*DcLcyb2 s/t*.** En los clones positivos se observa una banda de 1476 pb correspondiente al fragmento *DcLcyb2 s/t* de *D. Carota* amplificado sin el codón de término de la traducción. C(-): Control negativo de la reacción de PCR, se utilizó agua nanopura como templado. C(+): Control positivo de la reacción e PCR, se utilizó ADN plasmidial pCR®8/*DcLcyb2 s/t* como molde. PM: Estándar de Peso Molecular de 1kb. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt.

La confirmación de la correcta clonación e inserción del inserto *DcLcyb2 s/t* en el vector de expresión pGWB5 y en *A. tumefaciens*, permitieron proseguir con el proceso de transformación transitoria de plantas de *Nicotiana tabacum* (tabaco) (sección 2.4.8) para determinar la localización sub-celular de la proteína DcLCYB2-GFP. Con este objetivo se seleccionaron los clones C.3 y C.4 de *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 17) para la agroinfiltración de hojas de tabaco y posterior análisis mediante microscopía de fluorescencia confocal (sección 2.9).

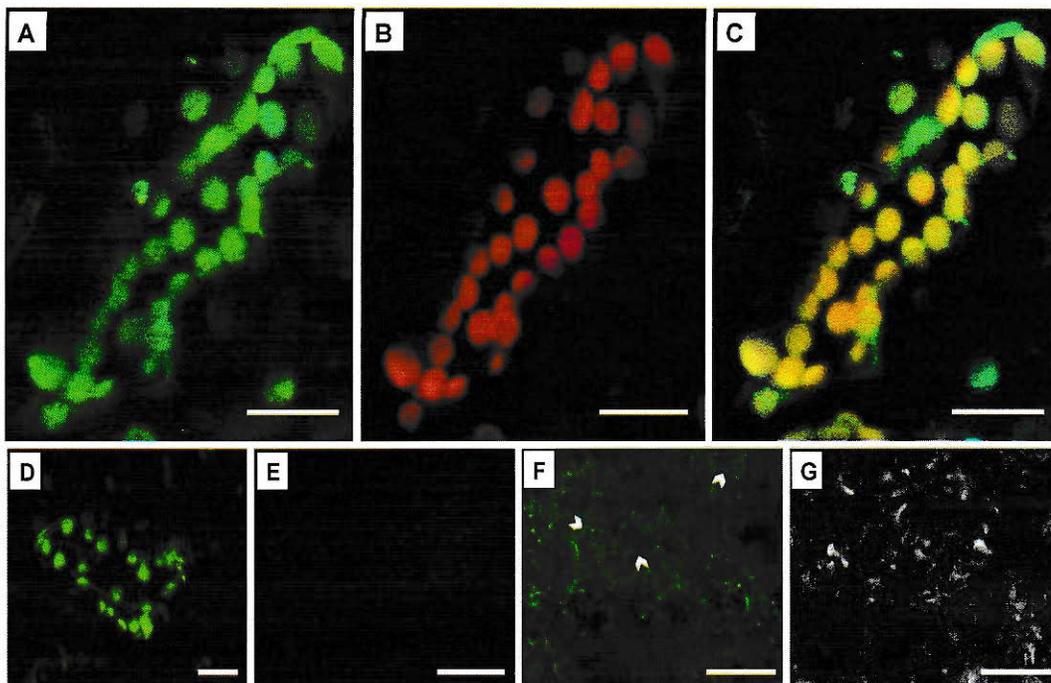
### 3.2.4 Determinación de la localización sub-celular de la proteína DcLCYB2 mediante microscopía de fluorescencia confocal.

Para evaluar la localización sub-celular se empleó la construcción pGWB5/*DcLcyb2 s/t*, que codifica una proteína DcLCYB2 fusionada a la proteína reportera GFP (DcLCYB2::GFP). Como control positivo se utilizó la construcción 35SCaMV::*recA::yfp* (gentileza de la Dra. Lee Meisel). En esta construcción el fragmento codificante para el péptido de destinación a cloroplastos de la proteína recA fue clonado en marco, río arriba de la secuencia completa del ADNc, codificante para la proteína YFP en el vector pBI2 (Salinas y col., 2006). Por otra parte, el vector pGWB5 sin inserto, portador de la secuencia 35S CaMV::*gfp* se utilizó como control negativo de la localización plastidial. Adicionalmente, la infiltración de hojas de tabaco con una solución de Agroinfiltración que no contiene la bacteria fue utilizada como control interno para descartar algún artefacto de la técnica. Los vectores mencionados anteriormente se emplearon para transformar de manera transitoria, mediante agroinfiltración, hojas de tabaco silvestres y al cabo de 4 días se realizaron cortes delgados de tejido que se observaron bajo un microscopio de fluorescencia confocal (sección 2.9) con el fin de detectar la fluorescencia emitida por la proteína reportera GFP.

En el citosol de las células epiteliales que fueron infiltradas con una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con el vector pGWB5/*DcLcyb2 s/t*, se observaron estructuras discretas, punteadas y de forma ovalada, cuyo patrón de fluorescencia es característico de los plastidios vegetales (Figura 18A). Este patrón de fluorescencia a su vez coincide con la emisión de autofluorescencia de la clorofila (rojo) (Figura 18B). Lo anterior fue verificado al detectar la señal de color amarillo resultante de la superposición de la fluorescencia emitida en verde (GFP) y la fluorescencia

emitida en rojo (clorofila) indicando la colocalización de las señales (Figura 18C).

Para demostrar que las estructuras punteadas que colocalizan con la autofluorescencia de la clorofila son cloroplastos, agroinfiltramos plantas con la construcción 35SCaMV::*recA::yfp* que contiene el péptido de destinación de *recA* (*recA* se localiza exclusivamente en cloroplastos). La Figura 18D muestra que el patrón de fluorescencia de *recA:YFP* también está definido por estructuras punteadas y discretas que fueron observadas previamente, tanto en preparaciones de hojas transformadas con pGWB5/*DcLcyb2* s/t así como en estructuras asociadas con la autofluorescencia de la clorofila. Esto se condice con lo observado en preparaciones de hojas infiltradas sólo con una solución de agroinfiltración, descartando que el patrón de fluorescencia observado en verde se trate algún artefacto (Figura 18E). Debido al tamaño pequeño de la proteína GFP (251 aa), en general ésta se encuentra soluble en el citoplasma y se distribuye hacia la membrana citoplasmática y el núcleo de las células de tejido transformado con 35S CaMV::*gfp* (Figura 18F). Este resultado concuerda con el campo claro donde se puede observar claramente el contorno celular, dado por la membrana y la pared celular (Figura 18G).



**Figura 18. Localización subcelular de la proteína DcLCYB2.** **A.** Fluorescencia de células epidermales de hojas de tabaco de dos meses de edad que fueron agroinfiltradas con *A. tumefaciens*, transformadas con la construcción pGWB5/*DcLcyb2* s/t para la expresión de la proteína de fusión DcLCYB2:GFP. Después de 4 días los explantes fueron observados por microscopía de fluorescencia confocal donde se detectó un patrón de fluorescencia punteado, de estructuras discretas, indicativo de la localización cloroplástica de DcLCYB2:GFP. **B.** Emisión de autofluorescencia de la clorofila contenida en los plastidios de las células de tabaco agroinfiltradas. **C.** Colocalización de las señales de fluorescencia detectadas en **A** y **B**. **D.** Control Positivo: Fluorescencia de las células epidermales de tabaco expresando recA:YFP. **E.** Control negativo: Tejido foliar infiltrado con medio de agroinfiltración. **F.** Control Negativo: Fluorescencia de células epidermales de tabaco transformadas con el vector sin inserto pGWB5 indicando la localización citoplasmática de GFP soluble. Las cabezas de flechas blancas muestran la membrana plasmática de la célula. **G.** Imagen de contraste de fases señalando la morfología y límites de las células epidermales de tabaco que fueron transformadas. Las imágenes fueron capturadas con un aumento de 40X (A-C) y 20X (D-G). La fluorescencia fue observada luego de la excitación a 489 nm. Barra de tamaño: 20µm (A-D) y 100µm (E-G).

Estos resultados fueron reproducidos utilizando dos clones distintos de *Agrobacterium tumefaciens*, por lo tanto concluimos que la proteína DcLCYB2 se localiza en los plastidios de la célula vegetal, compartimiento donde se lleva a cabo la biosíntesis de carotenoides y donde se ha reportado previamente que las enzimas carotenogénicas cumplen su función. Finalmente, estos resultados dan cumplimiento al objetivo específico 2 propuesto en esta Tesis de Magíster.

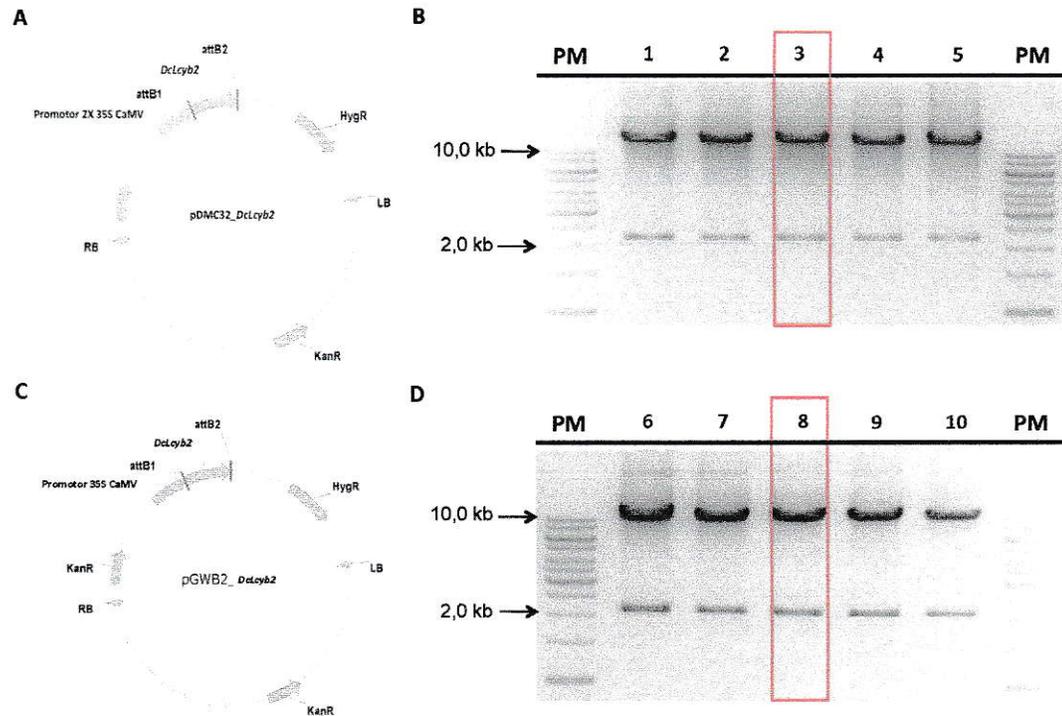
### **3.3 Objetivo específico 3. Expresión estable del gen *DcLcyb2* en *Nicotiana tabacum* (tabaco) mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens*.**

#### **3.3.1 Generación de los vectores de destinación pMDC32/*DcLcyb2* y pGWB2/*DcLcyb2* mediante recombinación Gateway®.**

Una vez obtenidos los clones positivos pCR<sup>®8</sup> que portan el fragmento de *DcLcyb2* clonado en fase respecto al origen de replicación pUC y al sitio de recombinación attL1 (sección 3.1.1), se generaron las construcciones pMDC32/*DcLcyb2* y pGWB2/*DcLcyb2* mediante recombinación sitio-específica (Tecnología Gateway®, sección 2.6.3.2) con los vectores pMDC32 (11752 pb; Curtis y Grossniklaus, 2003) y pGWB2 (17236 pb; Nakagawa y col., 2007) respectivamente. El vector pMDC32 contiene una copia doble del promotor 35S CaMV (2X35S) mientras que el vector pGWB2 contiene una copia única de este promotor. Se ha reportado que el uso de repeticiones en tándem del promotor 35S CaMV aumenta el nivel de la actividad promotora hasta 10 veces (Kay y col., 1987). Por lo tanto, el objetivo de generar dos construcciones cuya principal diferencia está en el número de copias del promotor 35S CaMV, es gatillar niveles de expresión diferenciales del gen que se vean reflejados en una diferencia en la cantidad o composición de carotenoides en el sistema heterólogo transformado. De esta manera, se espera que la construcción pMDC32/*DcLcyb2* genere un mayor contenido de carotenoides respecto al sistema transformado con la construcción pGWB2/*DcLcyb2*.

Los productos de la reacción de recombinación Gateway® se utilizaron para transformar células quimio-competentes One Shot® Mach1™ de acuerdo al capítulo de Materiales y Métodos de esta Tesis (sección 2.4.5). Por cada vector utilizado en la reacción de transformación se seleccionaron 5 colonias que fueron analizadas por PCR de colonia para la detección del fragmento *DcLcyb2* utilizando los partidores FORF ccs y RORF ccs c/t (Tabla III. Pizarro, 2008.) (no mostrado). Todos los clones analizados resultaron ser positivos para la amplificación del inserto. Posteriormente se preparó un cultivo líquido de cada colonia analizada por PCR, y se purificó el ADN plasmidial que fue digerido con la enzima Hind III (Invitrogen), para verificar la orientación del inserto respecto al promotor 2X35S CaMV, en el vector pMDC32, y respecto al promotor 35S CaMV en el vector pGWB2. Considerando que el clonamiento del fragmento de interés se realizó por recombinación sitio-específica entre los sitios attL que flanquean el fragmento en el vector de entrada y los sitios attR en el vector de destinación, se espera que todos los clones analizados presenten el fragmento *DcLcyb2* clonado en fase respecto al promotor de cada vector utilizado. Según el análisis predictivo de la secuencia de cada una de las construcciones generadas (Figuras 19A y 19C), existe un sitio de corte único para la enzima Hind III hacia la región 3' del fragmento clonado (nt 1255). Igualmente, en cada uno de los vectores de destinación existe un sitio de corte único para la misma enzima, que se encuentra río arriba de la región promotora 2X35S (nt 2846) en el vector pMDC32, y a su vez, se encuentra río arriba de la región promotora 35S (nt 4952) en el vector pGWB2. Por lo tanto, tal como se esperaba, se obtuvieron 2 bandas de 2208 pb y 13364 pb de tamaño como resultado de la digestión del vector recombinante pDMC32/*DcLcyb2* con un fragmento clonado en sentido respecto al promotor 2X35S (Figura 19B), mientras que se obtuvieron 2 bandas de 2255 pb y 16593 pb como resultado de la digestión del vector recombinante

pGWB2/*DcLcyb2* con un fragmento clonado en fase respecto al promotor 35S CaMV (Figura 19D). De este modo, contamos con cinco clones (1-5) que poseen el gen *DcLcyb2* clonado en sentido respecto al promotor 2X35S CaMV del vector pMDC32 y cinco clones (6-10) cuya secuencia *DcLcyb2* está en fase con el promotor 35S CaMV en el vector pGWB2. Los clones y los plásmidos recombinantes 1-5 y 6-10, se denominaron pMDC32/*DcLcyb2* y pGWB2/*DcLcyb2* respectivamente. Los clones 3 y 8 representativos de cada vector fueron seleccionados para transformar *Agrobacterium tumefaciens* (sección 2.4.8). Para identificar el fragmento *DcLcyb2* en los clones de *Agrobacterium* transformantes, por cada vector de expresión se analizaron por PCR de colonia cinco colonias crecidas en presencia de rifampicina (20 µg/mL), gentamicina (100 µg/mL) y kanamicina (100 µg/mL). Para ello se diluyó una muestra directa de las colonias obtenidas en 10 µL de agua nanopura y se amplificó un fragmento de aproximadamente 1,6 kb, usando los partidores FORF ccs y RORF c/t ccs (Tabla III. Pizarro, 2008). Todas las colonias analizadas resultaron ser positivas para la amplificación del gen *DcLcyb2* clonado en pMDC32, mientras que cuatro de cinco colonias resultaron ser positivas para la amplificación de *DcLcyb2* en pGWB2 (Datos no mostrados). Los clones de *Agrobacterium tumefaciens* 3.C, correspondiente a la construcción pMDC32/*DcLcyb2*, y 8.J transformante para la construcción pGWB2/*DcLcyb2*, fueron seleccionados para la transformación estable de *Nicotiana tabacum* (tabaco) (sección 2.5.2).



**Figura 19. Clonamiento del gen *DcLcyb2* en los vectores pMDC32 y pGWB2. A.** Representación esquemática de la digestión del vector pMDC32/*DcLcyb2* con la enzima HindIII. **B.** Digestión de ADN plasmidial de los clones pMDC32/*DcLcyb2* (1-5) con la enzima HindIII. Los números de cada carril corresponden al clon analizado. Todos los clones presentan un patrón de migración de bandas de 2208 pb y 13364 pb, indicando el clonamiento en fase del inserto respecto promotor 2X35S CaMV del vector. Se encuadra en rojo el carril correspondiente al clon 3, utilizado para la transformación de *Agrobacterium tumefaciens*. **C.** Representación esquemática de la digestión del vector pGWB2/*DcLcyb2* con la enzima HindIII. **D.** Digestión de ADN plasmidial de los clones pGWB2/*DcLcyb2* (6-10) con la enzima HindIII. Los números de cada carril corresponden al clon analizado. Todos los clones presentan un patrón de migración de bandas de 2255 pb y 16593, indicando el clonamiento en fase del inserto respecto promotor 35S CaMV del vector. Se encuadra en rojo el carril correspondiente al clon 8, utilizado para la transformación de *Agrobacterium tumefaciens*. P.M.: Estándar de peso molecular de 1 kb.

### **3.3.2 Transformación estable de *Nicotiana tabacum* con las construcciones pMDC32/DcLcyb2 y pGWB2/DcLcyb2.**

#### **3.3.2.1 Organogénesis somática de explantes de tabaco transformados con las construcciones pMDC32/DcLcyb2 y pGWB2/DcLcyb2.**

Luego de comprobar el clonamiento del gen *DcLcyb2* en los vectores pMDC32 y pGWB2, se procedió a transformar, mediante *Agrobacterium tumefaciens*, explantes de *Nicotiana tabacum* utilizando cada construcción de manera independiente (sección 2.5.2).

Todos los explantes fueron incubados con *Agrobacterium* y luego fueron depositados en medio MS sólido sin agente de selección durante 2 días (período de co-cultivo). Posteriormente, los explantes fueron lavados con MS líquido y el antibiótico cefotaxime para detener el crecimiento de la bacteria. Consecutivamente, los explantes de hojas fueron cultivados *in vitro* para la regeneración de planta completa mediante organogénesis somática de acuerdo a lo señalado en Materiales y métodos (sección 2.5.2).

Por cada experimento de transformación individual se realizó un control de la transformación utilizando explantes transformados mediante *Agrobacterium* con el vector sin inserto correspondiente. Los explantes resultantes fueron cultivados en medio MS con el respectivo agente de selección. Como control positivo de la regeneración mediante organogénesis se utilizaron explantes no transformados mediante *Agrobacterium* que fueron cultivados en medio MS sin agente de selección.

La concentración de cada antibiótico definida como crítica para la selección de transformantes fue determinada a partir de curvas de concentración generadas previamente en el laboratorio (Ocaez, 2009; Moreno 2012).

En la figura 20 se observan las principales etapas del cultivo *in vitro* de un explante de hoja de tabaco en presencia de distintos medios de cultivo (Tabla II) suplementados con higromicina para la selección de líneas transformadas con la construcción pMDC32/*DcLcyb2* o con kanamicina, para la selección de líneas transformantes pGWB2/*DcLcyb2*.

Aproximadamente después de 3-4 semanas de cultivo en medio *Nt.I* (Tabla II) se observó la aparición de brotes ubicados principalmente en los bordes de cada explante y en las zonas donde fueron inferidos cortes en la superficie de éste (Figura 20A). Previo a la aparición de los brotes se observó la nodulación de la zona que dió lugar a la formación de éstos (Figura 20B). Se observó la aparición de más de un brote por cada nódulo (Datos no mostrados).

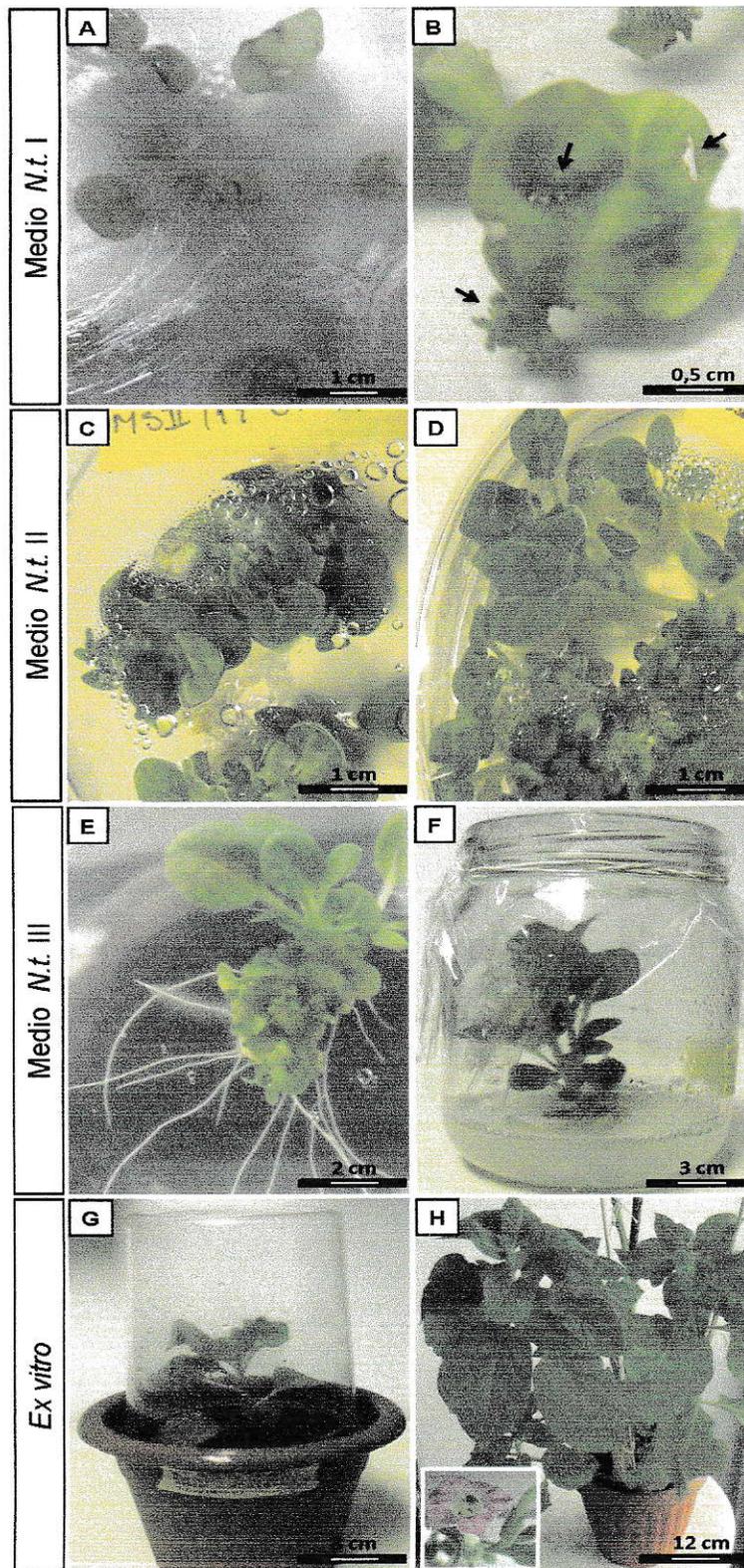
Los brotes generados fueron transferidos a medio *Nt.II* para promover su elongación (Figura 20C y 20D). Luego de 4-5 semanas los brotes se cortaron en la base y fueron transferidos a medio *Nt.III* para inducir el enraizamiento (Figura 20E). En esta etapa, fue posible identificar transformantes por su habilidad de formar raíces en medio suplementado con antibióticos.

Una vez que los explantes se encontraban en la cuarta semana en Medio *Nt. III*, luego de aproximadamente 14 semanas post-transformación, fueron depositados en frascos con medio *Nt.III* fresco (Figura 20F). Al cabo de 4 semanas, las plántulas generadas fueron traspasadas a tierra en maceteros que fueron cubiertos con receptáculos transparentes para evitar la evaporación excesiva y la sequedad (Figura

20G). Los maceteros se mantuvieron cubiertos en invernadero durante 2 semanas con el objetivo de aclimatar las plántulas.

Después de varios experimentos de transformación, el número de líneas generadas por cada vector recombinante con el inserto *DcLcyb2* alcanzó las 25 plantas aproximadamente. Por otra parte, fueron generadas dos líneas de plantas transformadas con el vector pGWB2 sin inserto y, 4 líneas de plantas transformadas con el vector pMDC32 sin inserto, las que fueron utilizadas como control en los experimentos posteriores junto con plantas silvestres que fueron propagadas *in vitro* para los mismos efectos.

Se observó que las plantas generadas y cultivadas en tierra no mostraron diferencias morfológicas en comparación con las plantas silvestres o aquellas transformadas con el vector de destinación sin inserto (Figura 20H).



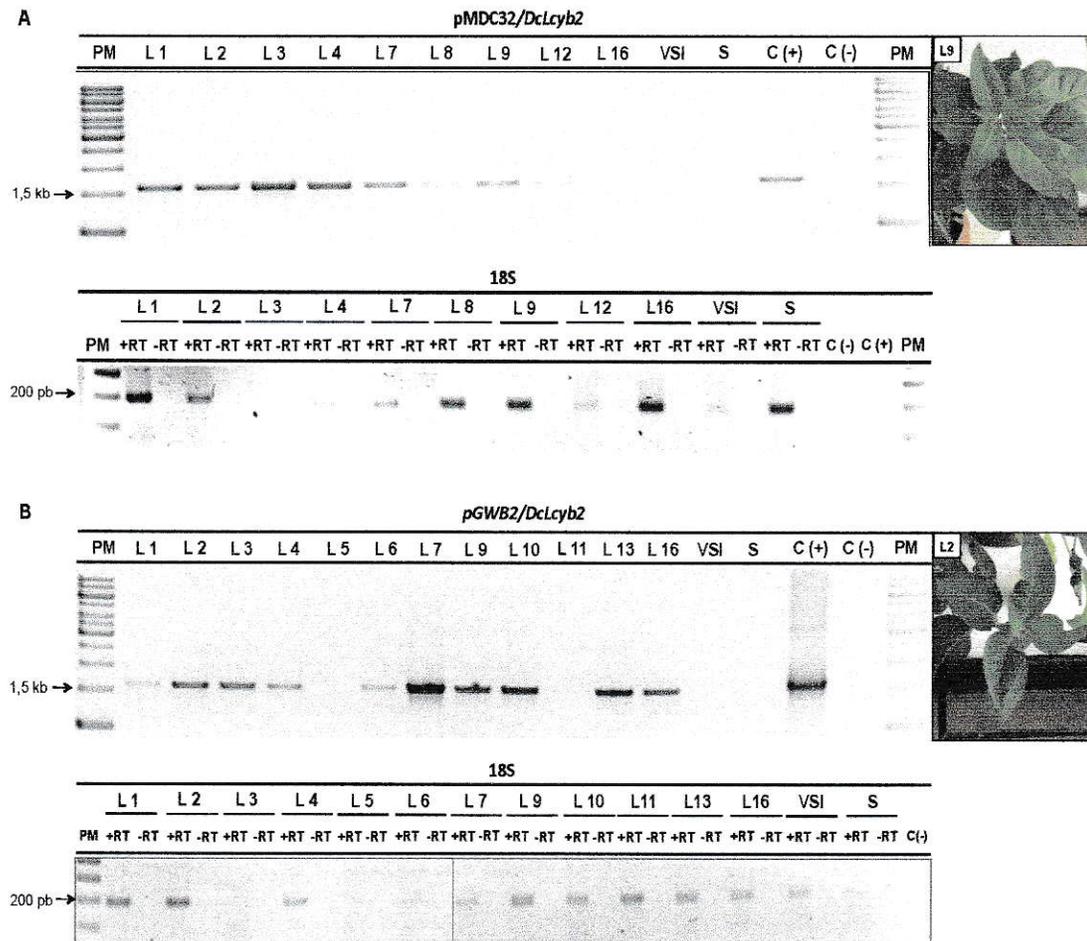
**Figura 20. Organogénesis somática de explantes de hojas de *Nicotiana tabacum*.** **A. Medio Nt. I Temprano.** Explantes de hojas de tabaco, con cortes en la superficie para la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, fueron cultivados *in vitro* en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con sacarosa 2% a pH 5,8, utilizado como medio basal para el cultivo de explantes, suplementado con 6-bencilaminopurina (BAP) para la producción de brotes y con ácido 3-indolbutírico (IBA) para la producción de raíces. **B. Medio Nt. I Tardío.** Formación de nódulos y brotes a partir de explantes de hoja transformados. Las flechas indican las zonas de formación de brotes que coinciden con los bordes del explante y con los puntos donde se hicieron cortes en la superficie del tejido. **C. Medio Nt. II Temprano.** Aumento en el número de hojas de aquellos brotes generados en medio Nt.I. **D. Medio Nt.II Tardío.** Elongación de brotes. **E. Medio Nt.III Temprano.** Rizogénesis a partir de brotes de tabaco transformados con *Agrobacterium tumefaciens*. **F. Medio Nt.III Tardío.** Separación y cultivo en frasco de brotes enraizados para promover una mayor elongación y el aumento en el número de raíces. **G. Cultivo *ex-vitro* temprano.** Plántulas de tabaco regeneradas mediante organogénesis somática en proceso de aclimatación en invernadero. **H. Cultivo *ex-vitro* tardío.** Morfología de una planta de tabaco aclimatada en invernadero 6 meses post-transformación con *Agrobacterium tumefaciens*. En la esquina inferior izquierda se muestra el fenotipo de la flor generada por la línea transformante. En la Tabla II se detalla la composición de cada medio MS utilizado en esta Tesis de Magíster.

### 3.3.2.2 Identificación de las líneas de *N. tabacum* portadoras del gen *DcLcyb2*.

Para determinar si las plantas regeneradas a partir de explantes de tabaco eran transgénicas, se extrajo ADN genómico (sección 2.6.1.3) a partir de las hojas de 18 plantas de tabaco regeneradas por cada construcción, incluyendo una línea control transformada con el vector sin inserto y una planta silvestre en cada caso, y se realizó un PCR convencional (sección 2.6.4.3) con los partidores hpt F y hpt R (Tabla III) para amplificar un fragmento de 624 pb que abarca una porción de la región codificante del gen *hpt* de resistencia al antibiótico higromicina. Adicionalmente, como control de la calidad del templado se realizó un PCR utilizando las mismas muestras de ADN genómico y los partidores 18S F y 18S R (Tabla III) que amplifican un fragmento de 196 pb del gen ribosomal 18S (Anexo. Figura suplementaria 3). De cada grupo de líneas transformado con la construcción pMDC32/*DcLcyb2* y pGWB2/*DcLcyb2* de manera independiente, 16 líneas resultaron haber incorporado en su genoma el gen de resistencia a higromicina. Consecutivamente se seleccionaron 9 y 12 líneas transgénicas para pMDC32/*DcLcyb2* y pGWB2/*DcLcyb2* respectivamente, que fueron analizadas por RT-PCR (sección 2.6.4.4) para determinar aquellas que portaban y expresaban el gen *DcLcyb2* de zanahoria. Con este objetivo se extrajo ARN mensajero y se sintetizó ADNc que se utilizó como templado para la reacción de PCR convencional utilizando los partidores FORF ccs y RORF ccs c/t (Figura 21). Como control positivo del PCR se utilizó ADN plasmidial correspondiente al vector pCR<sup>®</sup>8/*DcLcyb2* clon 7, mientras que como control negativo de la reacción se utilizó agua nanopura como templado. Adicionalmente, como control negativo de la transformación con el gen carotenogénico, se utilizó como templado ADNc extraído a

partir de hojas de tabaco silvestre (S) y ADNc purificado de hojas de tabaco transformado con el vector sin inserto (VSI). Como control de la calidad e integridad del ADNc sintetizado, una alícuota de cada muestra se amplificó por PCR utilizando los partidores 18S F y 18S R (196 pb) (Tabla III) que amplifican un fragmento del gen ribosomal 18S. A su vez, como control negativo de la reacción de retrotranscripción se utilizaron muestras de ARN tratadas con DNAsa I que no fueron sometidas a la reacción con la enzima Transcriptasa Reversa. Como control positivo de la reacción de PCR utilizando los partidores 18S F y 18S R, se amplificó ADN genómico de hojas de tabaco silvestre (Figura 21A).

En la figura 21A se observa que 8 de las 9 líneas transformadas con la construcción pMDC32/*DcLcyb2* resultaron ser positivas para la amplificación del tamaño de banda esperado, demostrando que el gen *DcLcyb2* se expresa exitosamente a nivel transcripcional. Por otra parte, la figura 21B muestra la amplificación, a partir de ADNc, del gen *DcLcyb2* en 10 de las 12 líneas transformadas con la construcción pGWB2/*DcLcyb2* indicando que en estas líneas el gen *DcLcyb2* es transcrito. Igualmente, estos resultados confirman la funcionalidad transcripcional de la construcción generada. En ambos grupos de líneas analizados se descartó una contaminación con ADN genómico y por ende la existencia de falsos positivos, pues no se detectó amplificación de las muestras control (-RT) correspondientes a muestras de ARN tratadas con DNAsa I que no fueron sometidas a la reacción de transcripción inversa. La amplificación positiva del fragmento 18S indicó la integridad y calidad óptimas de las muestras de ADNc.



**Figura 21. Identificación de líneas de tabaco transgénicas transformadas de manera independiente con las construcciones *pMDC32/DcLcyb2* y *pGWB2/DcLcyb2*.** **A.** Análisis RT-PCR de líneas de tabaco transformadas con la construcción *pMDC32/DcLcyb2*. Amplificación de un fragmento de 1612 pb correspondiente al gen *DcLcyb2* de zanahoria (arriba) y de un fragmento del gen ribosomal 18 S para verificar la calidad e integridad del templado (abajo). Todas las líneas excepto L16 expresan el fragmento clonado en el vector de destinación *pMDC32*. A la derecha se muestra la imagen representativa de hojas de la línea 9 que fueron usadas para los análisis moleculares. **B.** Análisis RT-PCR de líneas de tabaco transformadas con la construcción *pGWB2/DcLcyb2*. Amplificación del fragmento correspondiente al gen *DcLcyb2* de zanahoria (arriba) y de un fragmento del gen ribosomal 18S para verificar la calidad e integridad del templado (abajo). En las líneas L5 y L11 no se detectó expresión del gen *DcLcyb2*. A la derecha se muestra la imagen representativa de las hojas de la línea 2 que fueron muestreadas para los análisis moleculares. (-RT): Muestra de ARN tratada con DNasa I. +RT: Muestras de ARN sometidas a la reacción de transcripción reversa. VSI: Templado de ADNc de hojas de tabaco transformadas con el vector sin inserto. S: Muestras de ADNc de hojas de tabaco silvestre. C(-): Control negativo de la reacción de PCR utilizando agua como templado. C(+): Control positivo de la reacción de PCR. PM: Marcador de peso molecular.

**3.4 Objetivo específico 4. Determinar el efecto de la expresión del gen *DcLcyb2* en los niveles de carotenoides y en la expresión de genes endógenos claves de la ruta carotenogénica de *Nicotiana tabacum*.**

**3.4.1 Análisis del contenido y composición de pigmentos en líneas transgénicas de tabaco transformadas con las construcciones pMDC32/*DcLcyb2* y pGWB2/*DcLcyb2*.**

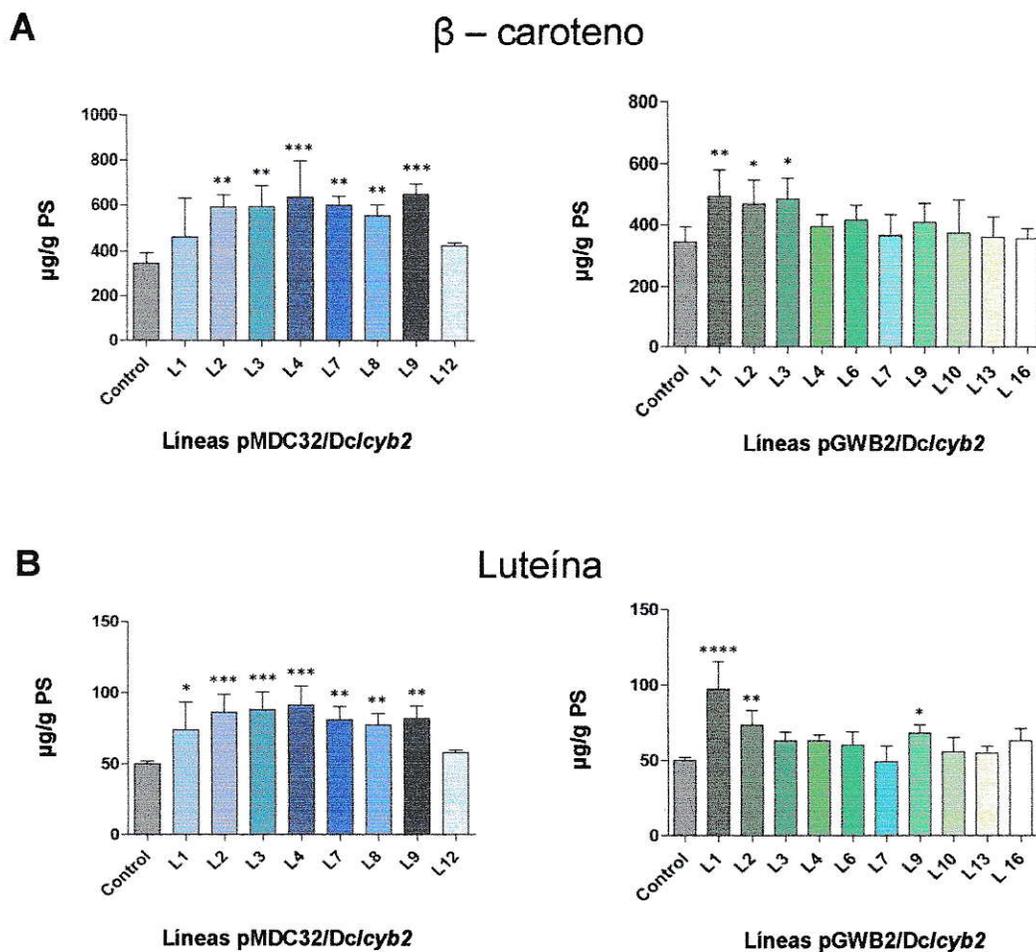
Luego de identificar las líneas transgénicas de *Nicotiana tabacum* que fueron transformadas con las construcciones pMDC32/*DcLcyb2* y pGWB2/*DcLcyb2*, se realizó la extracción de pigmentos a partir de hojas de todas las líneas que expresaron el gen *DcLcyb2* (sección 2.7.2). Como control negativo, se utilizó una planta silvestre (sin transformar) de manera de que ambos grupos de plantas fueran comparables en función del mismo control utilizando criterios comunes de selección de líneas transgénicas para realizar análisis posteriores que permitieron establecer la relación entre niveles de pigmento detectados y niveles de expresión del transgen. No obstante, también se realizó la extracción de pigmentos de muestras de plantas transformadas de manera independiente con los vectores sin inserto pMDC32 y pGWB2, donde los niveles de pigmentos cuantificados no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los de plantas silvestres utilizadas en este ensayo (datos no mostrados).

Los pigmentos extraídos fueron resuspendidos en éter de petróleo y posteriormente se midió la absorbancia de cada muestra a 474 nm. Finalmente se determinó la concentración de carotenoides y clorofila utilizando las fórmulas descritas en materiales y métodos (sección 2.7.3). Para evaluar el perfil de carotenoides de las

muestras de pigmentos extraídos a partir de las hojas de las líneas transgénicas para *DcLcyb2* (sección 3.4.2.2), se utilizaron 20uL de cada extracto y se analizaron mediante RP-HPLC (sección 2.7.4). En la figura 22 se grafican los niveles de  $\beta$ -caroteno y luteína obtenidos para los extractos de pigmentos de 8 líneas de *N. tabacum* transgénicas para la construcción pMDC32/*DcLcyb2* y de 10 líneas transgénicas para pGWB2/*DcLcyb2*. Se observó un aumento del contenido de  $\beta$ -caroteno en todas las líneas que expresaron el gen *DcLcyb2* (Figura 22A). Particularmente en 6 de las 8 líneas transgénicas para pMDC32/*DcLcyb2* se determinó un aumento significativo del contenido de  $\beta$ -caroteno en comparación con la línea silvestre utilizada como control, alcanzando un incremento de hasta 1,88 veces cuantificado en la línea L9. Por otra parte, 3 de 10 líneas transformadas con pGWB2/*DcLcyb2* presentaron un aumento significativo de este antioxidante con un aumento máximo de hasta 1,43 veces registrado en muestras de la línea L1.

Un comportamiento similar se observó al determinar el contenido de luteína (Figura 22B). En particular, se detectó un aumento significativo de los niveles de luteína en 7 de las 8 plantas transformadas con el vector pMDC32/*DcLcyb2*, con un máximo de 1,82 veces de aumento registrado en la línea L4. Por otra parte, 3 de 10 líneas transformadas con pGWB2/*DcLcyb2* presentaron un aumento significativo de luteína con un máximo registrado de hasta 1,94 veces en muestras de la línea L1. Una excepción se detectó en la línea L7 transformada con el vector pGWB2/*DcLcyb2*, donde se observó una leve disminución de la cantidad de luteína, que estadísticamente no es significativa. Adicionalmente, aquellas líneas transgénicas que presentaron un aumento significativo en el contenido de  $\beta$ -caroteno, también presentaron aumentos significativos en los niveles de luteína respecto a la muestra control, no obstante lo

observado en la línea L3, transformada con la construcción pGWB2/*DcLcyb2*, donde no se determinó un aumento significativo del contenido de luteína, a pesar de tener niveles significativamente superiores de  $\beta$ -caroteno en relación al control.

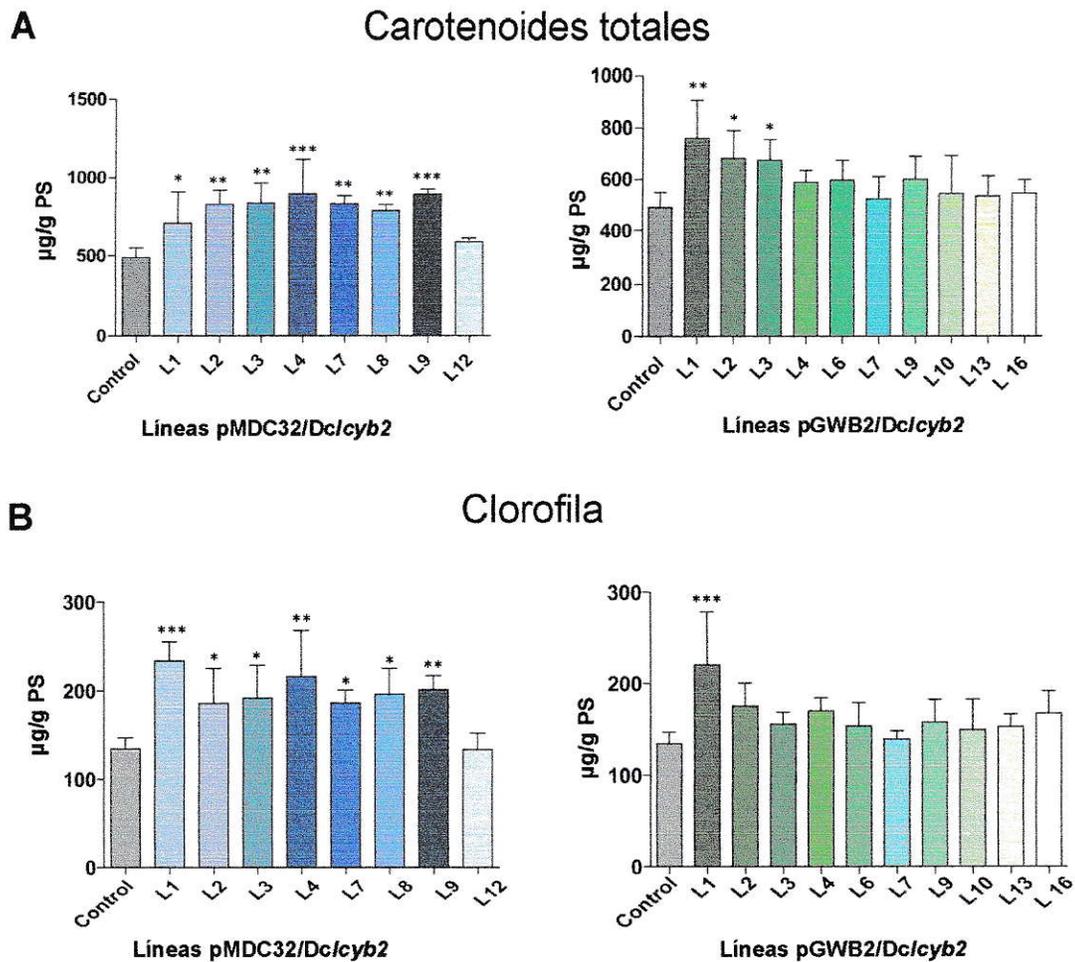


**Figura 22. Contenido de  $\beta$ -caroteno y luteína en líneas de tabaco transgénicas que expresan el gen *DcLcyb2* de zanahoria. A.** Niveles de  $\beta$ -caroteno determinados por RP-HPLC en dos grupos de líneas de tabaco, de aproximadamente 6 meses de edad, transformadas de manera independiente con las construcciones pMDC32/*DcLcyb2* y pGWB2/*DcLcyb2*. Las líneas transformadas con la construcción pMDC32/*DcLcyb2* muestran un incremento significativo de  $\beta$ -caroteno de hasta 1,88 veces en comparación con la muestra control (hojas de tabaco silvestre). **B.** Niveles de luteína determinados por RP-HPLC en los dos grupos de líneas de tabaco transgénicas analizadas en A que expresan el gen *DcLcyb2*. Las líneas transformadas con la construcción pMDC32/*DcLcyb2* muestran un incremento significativo de luteína de hasta 1,82 veces en comparación con la muestra control. Se observa una mayor fracción de líneas con incrementos significativos de  $\beta$ -caroteno y luteína en el grupo de plantas donde la expresión de *DcLcyb2* está comandada por el promotor 2X35S respecto al grupo de líneas pGWB2/*DcLcyb2*. Los valores promedio  $\pm$  DS están representados en forma de barras verticales. Los valores promedio indicados con asteriscos son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ , Test ANOVA de una vía. Post-test Bonferroni). \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

Considerando que el total de carotenoides detectados en las muestras analizadas estuvo compuesto principalmente por  $\beta$ -caroteno y luteína y que la ruta de síntesis de estos pigmentos tiene al compuesto geranil geranil pirofosfato (GGPP) como precursor común con la ruta de síntesis de fitol, que constituye la molécula de clorofila, se determinó la cantidad de carotenoides totales y clorofila en todas las líneas transgénicas analizadas previamente. En la figura 23 se observan los niveles promedio de carotenoides totales y clorofila de las líneas transgénicas agrupadas de acuerdo al tipo de vector utilizado para la transformación. En esta figura es posible apreciar que en todas las plantas de tabaco que expresaron el gen *DcLcyb2* se registró un aumento de los niveles de carotenoides totales (Figura 23A) y clorofila (Figura 23B), siendo de hasta 1,84 y 1,74 veces, respectivamente, en las líneas transformadas con la construcción *pMDC32/DcLcyb2*. En el caso de las plantas transgénicas *pGWB2/DcLcyb2* en la línea L1 se determinó el aumento máximo de carotenoides totales (1,56 veces) y clorofila (1,64 veces).

El aumento de los niveles de carotenoides totales fue estadísticamente significativo en todas aquellas líneas que presentaron un aumento significativo en los niveles de  $\beta$ -caroteno y luteína simultáneamente, aunque en el caso de la línea L1 transformada con el vector *pMDC32/DcLcyb2* este aumento se correlacionó con un aumento sólo de luteína, mientras que para la línea L3 transformada con la construcción *pGWB2/DcLcyb2* el aumento significativo de los niveles de carotenoides totales sólo se detectó en función de un incremento significativo de los niveles de  $\beta$ -caroteno. En la mayoría de las líneas transgénicas donde se detectó un aumento significativo de carotenoides totales, se detectó a su vez un aumento significativo del contenido de clorofila, alcanzando los 233,7  $\mu\text{g/g}$  de peso seco cuantificados para la

línea L1 (pMDC32/*DcLcyb2*) en comparación a los 134,3 µg/g de peso seco detectados en la muestra control. Además, la expresión de *DcLcyb2* comandada por el promotor 2X35S en el plásmido pMDC32 dio lugar a un mayor número de líneas con incrementos significativos de carotenoides totales y clorofila en comparación con el grupo de líneas transformadas con la construcción pGWB2/*DcLcyb2*



**Figura 23. Contenido de carotenoides totales y clorofila en líneas de tabaco transgénicas que expresan el gen *DcLcyb2* de zanahoria.** **A.** Carotenoides totales determinados por RP-HPLC en dos grupos de líneas de tabaco, de aproximadamente 6 meses de edad, transformadas de manera independiente con las construcciones pMDC32/*DcLcyb2* y pGWB2/*DcLcyb2*. Las líneas transformadas con la construcción pMDC32/*DcLcyb2* muestran un incremento significativo de carotenoides totales de hasta 1,84 veces en comparación con la muestra control (hojas de tabaco silvestre). **B.** Niveles de clorofila determinados por RP-HPLC en los dos grupos de líneas de tabaco transgénicas analizados en A que expresan el gen *DcLcyb2*. Las líneas transformadas con la construcción pMDC32/*DcLcyb2* muestran un incremento significativo de clorofila de hasta 1,74 veces en comparación con la muestra control. Los valores promedio  $\pm$  DS están representados en forma de barras verticales. Los valores promedio indicados con asteriscos son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ , Test ANOVA de una vía. Post-test Bonferroni). \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

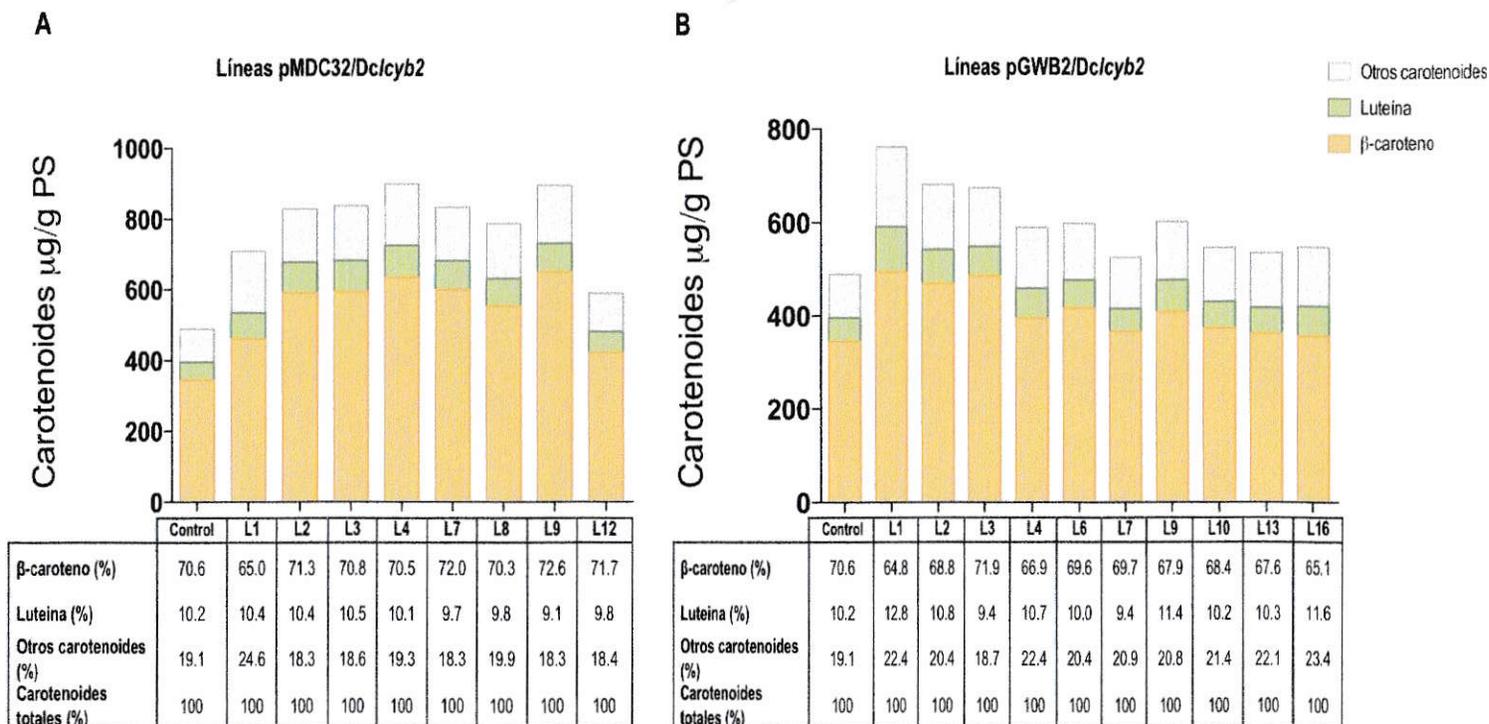
Un resumen de la cuantificación de carotenoides y clorofila para ambos grupos de líneas analizados se presenta en la Tabla VI, donde se destacan los valores máximos de veces de aumento de cada tipo de pigmento detectado en todos los grupos de líneas de tabaco que expresan el gen *DcLcyb2*. De los datos tabulados se infiere que en las plantas transformadas con la construcción *pMDC32/DcLcyb2* los niveles de  $\beta$ -caroteno y luteína aumentan en promedio 1,63 y 1,59 veces respectivamente en relación a las plantas silvestres, mientras que los niveles de carotenoides totales y clorofila aumentaron en promedio 1,63 y 1,44 veces cada uno. Las plantas de tabaco que fueron transformadas con la construcción *pGWB2/DcLcyb2* vieron aumentados sus niveles de  $\beta$ -caroteno y luteína en promedio 1,19 y 1,30 veces respectivamente, mientras que los niveles de carotenoides totales y clorofila aumentaron en promedio 1,24 y 1,22 veces cada uno, siempre en comparación con lo cuantificado para la línea control.

**Tabla VI.** Perfil de carotenoides determinado por RP-HPLC de hojas de tabaco transgénicas de 6 meses de edad, transformadas de manera independiente con las construcciones pMDC32/DcLcyb2 y pGWB2/DcLcyb2. Las líneas transgénicas expresan el gen de zanahoria DcLcyb2.

Líneas pMDC32/DcLcyb2												
Evento	β-caroteno		T/C	Luteína		T/C	Carotenoides totales		T/C	Clorofila		T/C
<b>Control</b>	345.6	± 48.02		50.09	± 2.018		489.2	± 62.02		134.3	± 12.3	
<b>L1</b>	461	± 169.6	1.33	73.9	± 19.6	1.48	709.3	± 203.1	1.45	233.7	± 21.36	1.74
<b>L2</b>	591.2	± 53.83	1.71	86.15	± 12.79	1.72	828.8	± 94.21	1.69	185.6	± 39.4	1.38
<b>L3</b>	593.5	± 92.36	1.72	88.22	± 12.36	1.76	837.7	± 128.7	1.71	191.9	± 37.04	1.43
<b>L4</b>	634.2	± 163.5	1.84	91.29	± 13.42	1.82	899.5	± 217	1.84	215.9	± 52.2	1.61
<b>L7</b>	600.2	± 39.19	1.74	81.03	± 9.282	1.62	833.4	± 52.45	1.70	186.1	± 14.5	1.39
<b>L8</b>	554.1	± 49.21	1.60	77.28	± 8.112	1.54	788	± 40.61	1.61	196.1	± 28.95	1.46
<b>L9</b>	649.6	± 43.31	1.88	81.77	± 9.002	1.63	895.2	± 36.51	1.83	200.8	± 16.13	1.50
<b>L12</b>	422.8	± 12.36	1.22	58.05	± 1.807	1.16	589.6	± 24.83	1.21	133.4	± 18.28	0.99
Líneas pGWB2/DcLcyb2												
Evento	β-caroteno		T/C	Luteína		T/C	Carotenoides totales		T/C	Clorofila		T/C
<b>Control</b>	345.6	± 48.02		50.09	± 2.018		489.2	± 62.02		134.3	± 12.3	
<b>L1</b>	493.5	± 87.29	1.43	97.32	± 18.13	1.94	761.6	± 146.2	1.56	220.4	± 58.15	1.64
<b>L2</b>	468.7	± 79.05	1.36	73.38	± 9.868	1.46	681.4	± 108.7	1.39	175	± 25.45	1.30
<b>L3</b>	485.2	± 66.91	1.40	63.17	± 5.742	1.26	674.5	± 81.96	1.38	155.2	± 12.86	1.16
<b>L4</b>	394.7	± 39.35	1.14	63.34	± 3.782	1.26	589.9	± 46.31	1.21	169.9	± 14.42	1.27
<b>L6</b>	416.5	± 48.89	1.21	60.13	± 9.012	1.20	598.6	± 76.97	1.22	153.2	± 25.64	1.14
<b>L7</b>	366.1	± 67.99	1.06	49.21	± 10.46	0.98	524.9	± 86.69	1.07	138.9	± 8.945	1.03
<b>L9</b>	408.2	± 63.12	1.18	68.26	± 5.313	1.36	601.4	± 87.06	1.23	157.6	± 24.77	1.17
<b>L10</b>	373.7	± 107.8	1.08	55.82	± 9.673	1.11	546.6	± 144.7	1.12	148.9	± 33.72	1.11
<b>L13</b>	362	± 65.18	1.05	54.89	± 4.722	1.10	535.3	± 79.24	1.09	152.3	± 13.75	1.13
<b>L16</b>	356.4	± 31.16	1.03	63.37	± 7.753	1.27	547.8	± 52.77	1.12	167.2	± 24.34	1.24

Gran parte de los eventos transgénicos obtenidos presentan un incremento en el contenido de β-caroteno, luteína y carotenoides totales respecto al control (hojas de tabaco silvestre), sólo se observa una excepción en los niveles promedio de luteína detectados en la línea 7 transformada con el vector pGWB2/DcLcyb2. Los niveles de pigmentos están dados en µg/g de peso seco (PS). Los datos representan el valor promedio ± DS de tres réplicas técnicas. T/C: Número de veces de aumento de los niveles de pigmentos cuantificados en líneas transgénicas (T) respecto al control (C). En rojo se destacan los valores máximos T/C.

Para determinar el patrón de composición de carotenoides en ambos grupos de líneas transgénicas, los valores promedio de β-caroteno, luteína y una fracción de otros carotenoides que no fueron identificados en esta Tesis, fueron graficados en un histograma de datos agrupados indicando la proporción en la cual cada pigmento está representado (Figura 24). Adicionalmente, se determinó la composición porcentual de los carotenoides totales cuantificados para cada línea transgénica analizada. Estos datos fueron tabulados y se adjuntan al pie de cada gráfico de la figura 24. En general, se observó que la mayoría de las líneas transgénicas analizadas presentaron un patrón de composición, y proporción en la que cada tipo de carotenoide está representado, que es comparable al control.



**Figura 24. Patrón de composición porcentual de carotenoides en plantas de tabaco transgénicas pMDC32/DcLcyb2 y pGWB2/DcLcyb2. A.** Histograma de datos agrupados representando la fracción de β-caroteno, luteína y otros carotenoides que componen los niveles de carotenoides totales de las líneas transgénicas pMDC32/DcLcyb2. **B.** Niveles de carotenoides totales representados en función de los niveles de β-caroteno, luteína y otros carotenoides, detectados en líneas transformadas con la construcción pGWB2/DcLcyb2 que expresan el gen DcLcyb2. Al pie de cada gráfico aparecen tabulados los datos de porcentajes de representación de β-caroteno, luteína y otros carotenoides detectados en cada línea transgénica analizada. Los porcentajes fueron calculados a partir del nivel promedio obtenido de tres réplicas técnicas por cada tipo de pigmento en cada línea.

Para determinar si la diferencia observada en la composición de  $\beta$ -caroteno entre los dos vectores utilizados, era significativa, se analizaron los 3 valores máximos de  $\beta$ -caroteno obtenidos en cada grupo de líneas transgénicas. Se observó que el grupo de líneas transformadas con la construcción *pMDC32/DcLcyb2* presenta de manera significativa un mayor contenido de  $\beta$ -caroteno en comparación con los niveles detectados en líneas transformadas con la construcción *pGWB2/DcLcyb2* (Test de T de una cola no pareado. P value: 0,0062. Datos no mostrados). De acuerdo a estos resultados y considerando que el grupo de plantas transformadas con la construcción *pMDC32/DcLcyb2* presentó un mayor porcentaje de líneas con un aumento significativo de la cantidad de  $\beta$ -caroteno y luteína en comparación a lo observado en el grupo de líneas *pGWB2/DcLcyb2*, se utilizó el grupo de plantas transformadas con la construcción *pMDC32/DcLcyb2* para los experimentos realizados posteriormente en esta Tesis.

El efecto de la transformación con los vectores *pMDC32/DcLcyb2* y *pGWB2/DcLcyb2* en los niveles de  $\beta$ -caroteno de las líneas transgénicas que expresan el gen *DcLcyb2*, determinó la generación de fenotipos contrastantes. Esto sería una primera aproximación que daría cuenta de la regulación del contenido de carotenoides mediante la expresión de *DcLcyb2* a nivel transcripcional, considerando que la expresión del gen *DcLcyb2* comandada por el promotor 2X35S está asociada a un incremento significativo de los niveles de  $\beta$ -caroteno, luteína y carotenoides totales. Este incremento a su vez es significativamente superior, y se detecta con mayor frecuencia, en comparación a lo observado cuando la expresión del gen *DcLcyb2* es comandada por una copia simple del promotor 35S, contenida en el vector *pGWB2*.

Los resultados obtenidos fueron considerados un antecedente preliminar para determinar el efecto de la regulación de la expresión génica en el contenido de

carotenoides en hojas de *Nicotiana tabacum*.

### **3.4.2 Análisis de la expresión del gen *DcLcyb2* en líneas transgénicas de tabaco transformadas con la construcción pMDC32/*DcLcyb2*.**

Para determinar si existe correlación entre los distintos niveles de  $\beta$ -caroteno detectados en las líneas de tabaco transformadas con el vector pMDC32/*DcLcyb2* y los niveles de expresión del gen *DcLcyb2*, los niveles de transcrito de 6 de las 8 líneas que fueron analizadas previamente por RP-HPLC (Tabla VI) fueron cuantificados por PCR en tiempo real (sección 2.6.4.5). Estas líneas fueron seleccionadas considerando los tres niveles más bajos de  $\beta$ -caroteno (líneas L1, L8 y L12) y los tres niveles más altos detectados (líneas L4, L7 y L9), de manera de evaluar los niveles de expresión génica en fenotipos contrastantes con un mismo *background* genético. En esta Tesis, los grupos de tres líneas seleccionadas fueron identificados como “ $\beta$ -mín” y “ $\beta$ -máx” en función de los niveles de  $\beta$ -caroteno mínimos y máximos cuantificados respectivamente.

Para analizar la expresión del gen *DcLcyb2* de zanahoria en las diferentes líneas transgénicas de *N.tabacum*, se extrajo ARN (sección 2.6.1.4) a partir de las hojas de plantas de aproximadamente 6 meses de edad. La síntesis de ADNc se realizó considerando los parámetros de calidad y pureza requeridos para los experimentos de PCR en tiempo real (2.6.1.5). La amplificación de un fragmento del gen *DcLcyb2* de zanahoria se realizó utilizando los partidores F1cyb2q y R1cyb2q (Tabla III), que amplifican un fragmento de 151 pb.

En la figura 25A aparecen graficados los niveles de transcrito del gen *DcLcyb2* de cada línea transgénica analizada. Éstos fueron relativizados a los niveles de

transcrito del gen *18S* y, calibrados en función de la expresión, considerada como 1, en la línea transformada con el vector sin inserto pMDC32. Utilizada como control negativo, dado que todas las líneas seleccionadas correspondientes a los grupos “ $\beta$ -mín” y “ $\beta$ -máx” fueron transformadas con la construcción pMDC32/*DcLcyb2*, por lo tanto se trata del control que mejor se ajusta al *background* genético de estas líneas en comparación a las plantas silvestres utilizadas como control negativo en experimentos de HPLC realizados previamente. Considerando además que los niveles de pigmentos cuantificados en líneas transformadas con el vector sin inserto pMDC32 no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los de plantas silvestres utilizadas en este ensayo (datos no mostrados), fue posible considerar ambos controles como equivalentes para este tipo de experimentos. Se observa que existen diferencias significativas entre los niveles de transcrito de las líneas analizadas. En 2 de las 3 líneas que poseen los niveles de  $\beta$ -caroteno más altos (L7 y L9), los niveles de transcrito superan significativamente los niveles de transcrito de las líneas L1 y L8 representativas de los niveles de  $\beta$ -caroteno más bajos. Por otra parte, las líneas L12 y L4 presentaron niveles de transcrito intermedios y ambas fueron significativamente diferentes respecto a los niveles de transcrito tanto máximos como mínimos que fueron detectados.

Se realizó un análisis estadístico comparativo entre los valores promedio de transcrito entre ambos grupos y se verificó que los niveles de transcrito del gen *DcLcyb2* en líneas del grupo “ $\beta$ -máx”, con alto contenido de  $\beta$ -caroteno, superan significativamente los niveles de mensajero en el grupo “ $\beta$ -mín” (Figura 25B). También realizamos un análisis estadístico comparativo entre los niveles promedio de  $\beta$ -caroteno de ambos grupos para determinar si existen diferencias significativas entre ambos. Es así como se validó la existencia de fenotipos contrastantes para el

contenido de  $\beta$ -caroteno (Figura 25C).

En ambos tipos de análisis se determinó que existe una diferencia significativa entre ambos grupos de líneas, lo que hace presuponer que un incremento significativo en el contenido de  $\beta$ -caroteno está regulado por un aumento significativo de los niveles de transcrito del gen *DcLcyb2*.

Por lo tanto, de acuerdo a lo observado en la figura 25, existe una correlación positiva entre los niveles de  $\beta$ -caroteno y los niveles de transcrito *DcLcyb2* detectados en las hojas de las líneas transgénicas que expresan el gen de zanahoria.

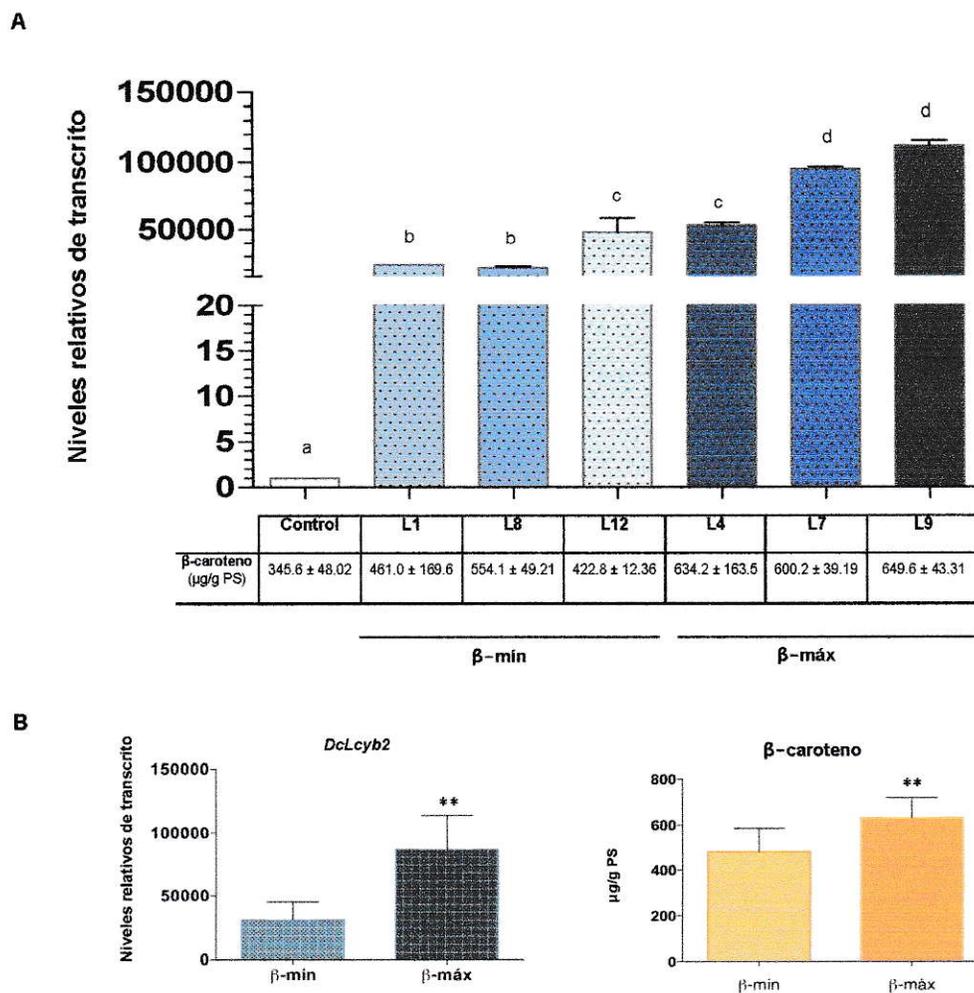
Considerando que la producción de  $\beta$ -caroteno es el producto directo de la actividad de la enzima Licopeno  $\beta$ -ciclase, estos resultados sugieren fuertemente que el gen *DcLcyb2* codifica para una enzima funcional en el sistema heterólogo *Nicotiana tabacum*.

Dado que la expresión del gen *DcLcyb2* en algunas líneas es significativamente mayor respecto a la línea L1, donde se registran los niveles más bajos de transcrito, para análisis posteriores realizados en esta Tesis, este incremento significativo de los niveles de transcrito fue definido como una sobre-expresión del gen *DcLcyb2*.

### **3.4.3 Efecto en la expresión de los genes carotenogénicos endógenos de plantas de tabaco transgénicas que expresan altos niveles de transcrito del gen *DcLcyb2* de *D.carota* L.**

Si bien se observó una correlación positiva entre los niveles de  $\beta$ -caroteno y los niveles de expresión del transgen *DcLcyb2* detectado en las hojas de las líneas analizadas, lo que presume la funcionalidad del gen *in vivo*, es importante determinar el efecto que puede causar el transgen sobre la expresión de genes endógenos claves de la ruta de síntesis de carotenoides tales como el gen fitoeno sintasa (*psy*) o licopeno  $\beta$ -ciclase (*lcyb*).

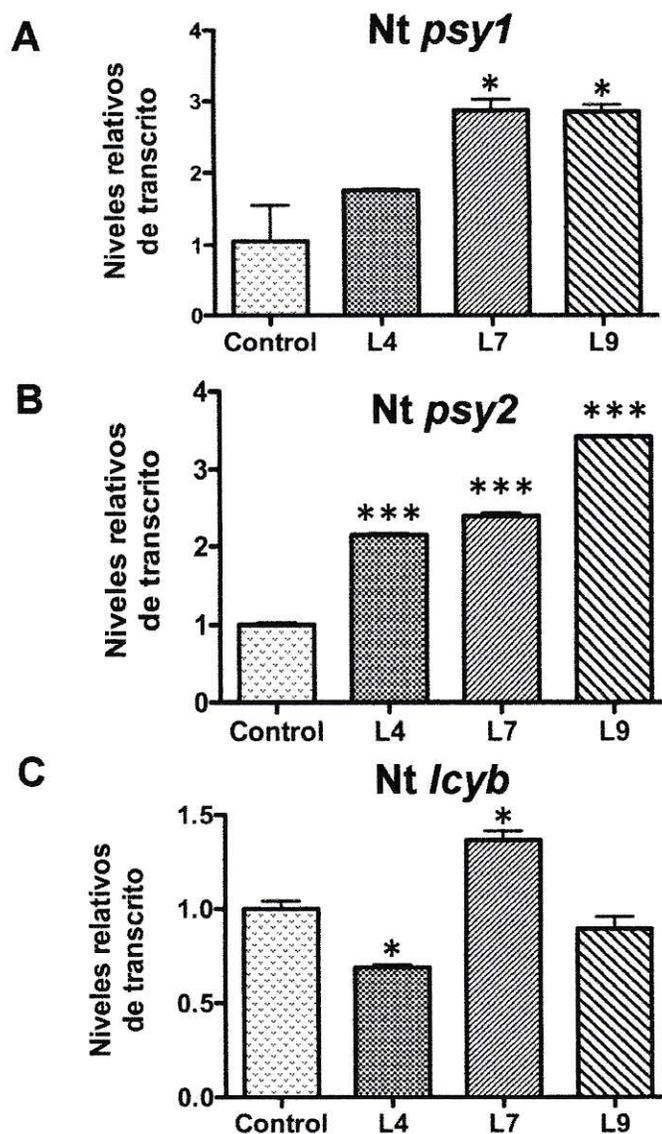
Esto podría ocurrir debido a una regulación positiva o negativa de la funcionalidad de genes endógenos ya sea a nivel transcripcional o post-transcripcional. Paralelamente esto podría explicar el aumento de los carotenoides totales que se



**Figura 25. Análisis de qRT-PCR de los niveles de transcrito de *DcLcyb2* en tabaco transgénico. A.** Niveles de transcrito del gen *DcLcyb2* en líneas de tabaco transgénicas  $T_0$  que expresan el gen *DcLcyb2* comandado por el promotor 2X35S CaMV. Los valores corresponden a duplicados técnicos para cada línea los cuales están normalizados frente a la expresión del gen *18S* y calibrados frente a la expresión de *DcLcyb2*, considerada como 1, en la planta control transformada con el vector sin inserto pMDC32. Los niveles de β-caroteno detectados previamente para cada línea fueron tabulados al pie del gráfico. **B.** Expresión promedio de *DcLcyb2* en las líneas L1, L8 y L12, representadas como “β-mín”, y en las líneas L4, L7 y L9 agrupadas en “β-máx”. **C.** Niveles de β-caroteno, expresados en μg/g de peso seco, de los grupos “β-máx” y “β-mín”, calculados a partir de cantidades detectadas previamente por HPLC en cada línea representativa. En líneas del grupo “β-máx” se observa un aumento de 2,8 veces en el nivel de expresión promedio para *DcLcyb2*, que está asociado a un aumento de 1,3 veces en la cantidad promedio de β-caroteno, respecto a lo observado en “β-mín”. Las barras verticales representan el promedio ± DS de las replicas técnicas. Las letras denotan diferencias significativas entre los promedios de expresión de cada línea frente a las demás líneas del análisis (ANOVA de una vía. Post-test Bonferroni). Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los grupos de líneas analizadas (Test de T de una cola, datos no pareados. \*\*:  $p < 0,01$ ).

detectó en el total de líneas que expresaron el gen *DcLcyb2*.

Con este objetivo se determinó la expresión de los transgenes endógenos *Ntpsy1* (GenBank: JF461341.1), *Ntpsy2* (GenBank: JX101475.1) y *Ntlcyb* (CrtL-1. GenBank: X81787.1), mediante PCR cuantitativo en tiempo real (sección 2.6.4.5) en 3 líneas (L4, L7 y L9) representativas del grupo “ $\beta$ -máx” que en esta Tesis fueron identificadas como líneas que sobre-expresan el gen *DcLcyb2*. En la Figura 26 se observan los niveles de expresión de los genes *Ntpsy1*, *Ntpsy2* y *Ntlcyb* de *Nicotiana tabacum* en las hojas de las líneas seleccionadas. Los niveles de expresión de estos genes se encuentran relativizados a los niveles de expresión del gen *18S*. En esta figura es posible apreciar que la expresión del gen *Ntpsy1* en las hojas de 2 de 3 líneas transgénicas (L7 y L9) aumenta significativamente con respecto a la línea transformada con el vector sin inserto pMDC32 (Figura 26A), mientras que la expresión de *Ntpsy2* aumenta significativamente en todas las líneas que sobre-expresan el gen *DcLcyb2* (Figura 26B). Por otro lado y en general, la expresión de *Ntlcyb* no aumentó significativamente en 2 de las 3 líneas analizadas (L4 y L9). No obstante en la línea L7 se detectó un incremento en los niveles de transcrito, en la línea L4 se detectó una disminución de éstos (Figura 26C).



**Figura 26. Expresión relativa de los genes carotenogénicos *Ntpsy1*, *Ntpsy2* y *Ntlcyb* en líneas de tabaco que sobre-expresan el gen *DcLcyb2* de zanahoria. A-C: genes *Ntpsy1*, *Ntpsy2* y *Ntlcyb*. Niveles de transcrito de genes endógenos en líneas de tabaco transgénicas  $T_0$  que sobre-expresan el gen *DcLcyb2* comandado por el promotor 2X35S CaMV. Los valores corresponden a los duplicados técnicos de dos réplicas biológicas para cada línea, los cuales están normalizados frente a la expresión del gen *18S* y calibrados frente a la expresión del gen de interés en la planta control transformada con el vector sin inserto pMDC32. Los asteriscos denotan diferencias significativas en comparación al control, determinado por Test de T no pareado de dos colas. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .**

Los niveles de transcrito de los genes carotenogénicos endógenos y el gen *DcLcyb2* de zanahoria detectados en las líneas transgénicas analizadas aparecen tabulados en la Tabla VII.

Tabla VII. Niveles de transcrito de genes carotenogénicos endógenos en tabacos que sobre-expresan el gen <i>DcLcyb2</i> de zanahoria.												
Evento	<i>Nt psy1</i>			<i>Nt psy2</i>			<i>Nt lcyb</i>			<i>DcLcyb2</i>		
Control	1.06	±	0.49	1.00	±	0.03	1.00	±	0.04	1	±	1
L4	1.75	±	0.02	2.15	±	0.02	0.69	±	0.01	53070	±	1974
L7	2.86	±	0.16	2.40	±	0.04	1.37	±	0.05	94900	±	1789
L9	2.84	±	0.10	3.42	±	0.01	0.90	±	0.06	111600	±	3883

Datos de PCR en tiempo real que corresponden al valor promedio ± DS de duplicados técnicos de dos réplicas biológicas obtenidas por cada línea, los cuales están normalizados frente a la expresión del gen *18S* y calibrados frente a la expresión del gen de interés en la planta control, transformada con el vector sin inserto pMDC32. En rojo se destacan los valores relativos máximos de transcrito.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta sección, que dan cumplimiento al objetivo específico número 4 planteado en esta Tesis, se observa que la expresión del gen *DcLcyb2* está asociada a un aumento significativo en los niveles de  $\beta$ -caroteno, luteína y carotenoides totales así como en general, la sobre-expresión del gen está asociada a un aumento de los niveles de transcrito endógenos de *Ntpsy1* y *Ntpsy2*, pero no de *Ntlcyb*, lo que sugiere fuertemente que el gen *DcLcyb2* tiene funcionalidad *in vivo* y codifica para una enzima con actividad licopeno  $\beta$ -ciclase en el sistema heterólogo *Nicotiana tabacum*.

## DISCUSION

### 4.1 Aislamiento y análisis de secuencia de DcLCYB2.

La ciclación del licopeno es un paso clave en la síntesis y en la regulación de la composición de carotenoides en plantas (Cunningham 2002; Bouvier y col., 2005). La enzima LCYB puede actuar sobre los dos extremos de la molécula o sobre el extremo lineal del  $\delta$ -caroteno, produciendo  $\beta$ - y  $\alpha$ -caroteno, respectivamente. Antes de iniciarse esta Tesis de Magíster, se había descrito en zanahoria la existencia de dos genes *lcyb* que se expresaban tanto en hojas como en la raíz modificada: un gen *DcLcyb1*, cuya expresión aumenta durante el desarrollo, predominando su expresión en hojas respecto a la raíz modificada de plantas adultas (Just y col., 2007; Fuentes, 2008; Ocarez, 2010; Moreno 2013) y un gen *DcLcyb2*, cuya expresión es mayor en raíz respecto a los niveles de transcrito detectados en hoja (Just y col., 2007; Ocarez 2010; Moreno y col., 2013). Sin embargo, únicamente se disponía de las secuencias anotadas de estos genes y la funcionalidad de éstos no había sido comprobada. El grupo de Just identificó y anotó el gen *DcLcyb2* como una enzima con motivos tanto Licopeno Ciclasa como Capsantina Capsorubina Sintasa (enzima que produce capsantina y capsorubina a partir de anteraxantina y violaxantina respectivamente).

En este trabajo se aisló la secuencia codificante completa de la licopeno  $\beta$ -ciclasa 2 a partir de material vegetal de *Daucus carota* var. Nantes.

Análisis comparativos de la secuencia aminoacídica de DcLCYB2 indican que esta proteína tiene entre un 70% y un 77% de identidad a nivel de secuencia primaria con las LCYBs de otras plantas identificadas hasta la fecha, tales como la LCYB de *Actinidia deliciosa* (77%. GenBank: ACJ66629.1), la LCYB específica de cromoplastos

de *Citrus paradisi* (76%. GenBank: ACX37456.1) o la LCYB de *Fragaria x ananassa* (73%. GenBank: AFR11777.1). A su vez, la secuencia aminoacídica DcLCYB2 caracterizada en esta tesis presentó un 59% de identidad con la correspondiente a DcLCYB1 de zanahoria y un 99% de identidad aminoacídica con la correspondiente a DcLCYB2 publicada por Just y col., el 2007. Un porcentaje de identidad aminoacídica superior al 50% sugieren una alta conservación de motivos proteicos presentes en enzimas de tipo licopeno  $\beta$ -ciclase cuya funcionalidad ya ha sido demostrada.

Analizando en detalle la secuencia aminoacídica de DcLCBY2, se detectó un péptido señal de importación a plastidios en la región amino-terminal (Figura 7), el cual incluye un motivo altamente conservado, marcado en la Figura 7 (sección 3.1.2) como "Región Conservada en LCYBs", que se ha propuesto como determinante para la asociación de estas proteínas a la membrana (Hugueney y col., 1995), requisito indispensable para la correcta actividad catalítica (Beyer y col., 1991). Adicionalmente, en la secuencia de DcLCYB2 se identificó un motivo de unión a dinucleótido (Figura 7), conservado en LCYBs vegetales y bacterianas. También se identificaron diversos motivos (MCI, MCII y región cargada, en la Figura 7) altamente conservados en LCYBs de plantas y cianobacterias y moderadamente conservados en LCYBs de bacterias. Adicionalmente, se identificó un "Motivo  $\beta$ -ciclase" altamente conservado en LCYBs de plantas. Estas regiones podrían constituir dominios implicados en la interacción enzima-sustrato y/o en la catálisis (Hugueney y col., 1995; Cunningham y col., 1996; Bouvier y col., 1997). Según estudios previos, las LCYBs de plantas poseen hélices  $\alpha$  con localización transmembrana (Hugueney y col., 1995; Cunningham y col., 1996). En particular, y de acuerdo con los resultados de Hoffman y Stoffel (2006), el paquete informático TMpred predice una localización transmembrana de las hélices  $\alpha$  del extremo carboxi-terminal de DcLCYB2 (no mostrado). Por lo tanto, la presencia de

estas hélices transmembrana sugiere que la enzima LCYB2 se encuentra anclada o asociada a la membrana. Es probable que la unión a la membrana de esta enzima sea un requisito fundamental para su funcionalidad, al igual que sucede en otras enzimas implicadas en la biosíntesis de carotenoides como PSY (Schledz y col., 1996; Welsch y col., 2000) y PDS (al Babili y col., 1996; Bonk y col., 1997).

Este análisis *in silico* fue considerado como un antecedente clave para determinar que el gen *DcLcyb2* codificaría para una enzima funcional.

#### **4.2 Caracterización funcional del gen licopeno $\beta$ -ciclase 2 de *Daucus carota* L. en *E.coli*.**

La actividad licopeno ciclase de la proteína DcLCYB2 aislada de *Daucus carota* se evaluó mediante ensayos de expresión heteróloga en una cepa de *Escherichia coli* productora de licopeno. La expresión de *DcLcyb2* en esta cepa de *E.coli* produjo un cambio en la coloración de las colonias, de rojo a naranja indicando que el gen codifica para una enzima capaz de convertir el licopeno en otro carotenoide (Figura 11). Al analizar los carotenoides presentes en los cultivos bacterianos transformados con el gen *DcLcyb2*, se detectó la aparición de dos nuevas señales o picos que fueron identificados como  $\beta$ -caroteno y, como un compuesto señalado como "otros carotenoides" (Figura 12 y Figura 13) el cual se presume correspondería a  $\gamma$ -caroteno, de acuerdo al tiempo de retención observado y al espectro de absorbancia obtenido (Teramoto y col., 2003; Zhang y col., 2013). Ambos parámetros coinciden con aquellos que caracterizan al carotenoide monocíclico. Considerando que el  $\gamma$ -caroteno es un carotenoide producido a partir de la  $\beta$ -ciclación de un único extremo de la molécula de licopeno (Figura 3), estos resultados sugieren fuertemente que *DcLcyb2* codifica para

una enzima con actividad licopeno  $\beta$ -ciclase catalizando la formación de licopeno a  $\beta$ -caroteno mediante la formación de  $\gamma$ -caroteno. Lo anterior difiere con lo observado en experimentos de complementación heteróloga de *DcLcyb1* (Moreno 2010; Moreno y col., 2013) donde no se detectó un pico similar indicando la formación de  $\gamma$ -caroteno. Sin embargo, estos resultados sugieren que ambas enzimas tendrían actividad licopeno  $\beta$ -biciclase. En 2010, Moreno propone en su tesis de pre-grado que esta diferencia en la generación del intermediario  $\gamma$ -caroteno (Figura 3) sería el resultado de una menor actividad de la enzima DcLCYB2 respecto de la enzima DcLCYB1, descartando la probabilidad de que ambas enzimas participen en mecanismos de ciclación diferentes, independientes y compartimentalizados en la vía carotenogénica. Para comprobar lo propuesto por Moreno (2010), sería interesante realizar ensayos comparativos de determinación de la actividad enzimática *in vitro* a partir de extractos de proteína purificada. Así también, es importante realizar ensayos adicionales que corroboren la identidad del compuesto indicado en esta tesis como “otros-carotenoides” (Figura 12), y que se presume corresponderían a  $\gamma$ -caroteno (Teramoto y col., 2003; Zhang y col., 2013). No obstante lo anterior, no se descarta que exista una diferencia en la actividad entre DcLCYB1 y DcLCYB2 considerando los cambios de aminoácidos detectados en DcLCYB2 en algunos de los motivos conservados en las LCYBs (Figura 7). Por ejemplo, en la “Región Conservada en LCYBs”, la conservación de la secuencia en DcLCYB2 es parcial, siendo éste un motivo importante para la asociación de estas proteínas a la membrana, determinando su funcionalidad (Beyer y col., 1991; Hugueney y col., 1995). Sin embargo, los cambios de aminoácidos citados no parecen alterar la estructura secundaria característica lámina  $\beta$ / hélice  $\alpha$ / lámina  $\beta$  del bolsillo de unión a NADH (Figura 8), cuya configuración también es un factor relevante en la actividad de las enzimas LCYB's. Por lo tanto, es importante ponderar el grado de

impacto que tendría cada uno de los cambios detectados de aminoácidos en relación a una mayor o menor actividad enzimática, considerando además que se ha reportado que incluso el cambio de un único aminoácido en la secuencia aminoacídica de LCYE, determina la actividad mono o biclasa e incluso la ausencia de actividad (Cunningham y Gantt, 2001). Considerando este antecedente, una estrategia alternativa para analizar los sitios activos de estas proteínas sería la realización de ensayos de mutación sitio dirigida o el modelamiento del mecanismo de unión de sustrato en función de cofactores descritos para las LCYB's. De esta manera es factible determinar un indicador de eficiencia en la actividad. Sin duda, la detección de la proteína DcLCYB2 obtenida de extractos de *E.coli* complementada corroborarían de manera directa que la expresión del gen *DcLcyb2* se traduce en la síntesis de una proteína. Para demostrar esto, uno de los ensayos más usados y prácticos es la realización de western blot, sin embargo, hasta la fecha no existen anticuerpos comerciales disponibles para la detección de enzimas Licopeno  $\beta$ -Ciclasas de plantas. Es importante señalar que la eficiencia de conversión de licopeno *in vivo* por parte de DcLCYB2 podría variar de la directamente cuantificada de los ensayos funcionales de complementación heteróloga realizados. Para sortear esta dificultad, generalmente se expresan proteínas de fusión con epítopes marcadores tales como "His-tag", para detectar y determinar la actividad de la enzima en estudio. En esta Tesis de Magíster se descartó la generación de proteínas de fusión, considerando que se ha reportado que la incorporación de estos fragmentos aminoacídicos puede alterar la actividad de la enzima en estudio (Araújo y col., 2000; Halliwell y col., 2001; Freydank y col., 2008), lo cual implica una condición fundamental al momento de detectar falsos negativos o falsos positivos. No obstante, los resultados de localización sub-celular de la proteína de fusión DcLCYB2-GFP que son discutidos más adelante (Sección 4.2) dan cuenta de

la detección del producto proteico de la expresión del gen *DcLcyb2*.

Dado que se ha demostrado que el citoplasma de *E.coli* es bioquímicamente similar a los plastidios (Gallagher y col. 2003), los ensayos de expresión heteróloga en *E.coli* son un sistema adecuado para evaluar la actividad licopeno ciclasa de proteínas de plantas, como ya se ha comprobado con anterioridad (Cunningham y col., 1993; Hugueney y col., 1995; Cunningham y col. 1996; Pecker y col., 1996; Ronen y col., 1999; Ronen y col., 2000; Bouvier y col., 2000; Cunningham y Gantt 2001; Inoue y col., 2006). Sin embargo, en este sistema experimental las enzimas no son ensambladas, procesadas, ni modificadas post-traduccionalmente del mismo modo en que lo serían en las células vegetales. Adicionalmente, existen una serie de factores que influyen claramente en los ensayos funcionales en *E.coli*, tales como el tipo de plásmido utilizado para la expresión heteróloga, el tiempo de incubación (Alquézar et al, 2009) y la temperatura de crecimiento de los cultivos, el vector utilizado para generar una cepa de *E.coli* productora de carotenoides e incluso la cepa de *E.coli* (Hanahan, 1983; Wurtzel y col., 1997). Estos factores alterarían la eficiencia de la actividad enzimática en cuestión en relación a su condición *in planta*, por lo tanto los rendimientos o niveles de pigmentos obtenidos aportan antecedentes aproximados para caracterizar la actividad de DcLCYB2 así como para establecer análisis comparativos con otras LCYB's.

Considerando que: 1) La ruta de síntesis de carotenoides introducida en la cepa de *E.coli* BL21-DS1B (Niklitschek y col., 2008), utilizada en esta Tesis como control positivo, está representada sólo por los genes que conforman los principales pasos enzimáticos de la vía, es decir, no existen otros genes que podrían interferir directamente con la acumulación de  $\beta$ -caroteno, y 2) Considerando que el gen mutado *AcrtY* introducido en el vector pDS1B genera la cepa *E.coli* BL21- $\Delta$ crtY que acumula

licopeno y presenta colonias de color rojo, y que en comparación al fenotipo de color de colonias anaranjado de la cepa control positivo, se concluye que el único factor que determina la diferencia de los fenotipos observados es la actividad de la enzima Licopeno  $\beta$ -ciclasa, por lo tanto, se concluye que en *E.coli* BL21- $\Delta$ crtY, el gen *DcLcyb2* codifica para un producto proteico que metaboliza licopeno para producir  $\beta$ -caroteno.

La existencia de dos genes que codifican  $\beta$ -LCYs, cada uno de ellos con un patrón de expresión característico, ha sido descrita en frutos como tomate, pimentón, papaya, naranja y sandía. En tomate, el gen que codifica la LCYB canónica ( $\beta$ -LCY1) se expresa en hojas y tejidos verdes del fruto, disminuyendo su expresión durante la maduración (Ronen y col., 2000; D'Ambrosio y col., 2004), mientras que el gen *B* (que codifica una LCYB2) se expresa de forma transitoria en frutos madurando y no se detecta en hojas (Ronen y col., 2000). En pimentón, el nivel de expresión del gen *lcyb* es mayor en hojas que en frutos, donde presenta un patrón de expresión constitutivo (Hugueney y col., 1995), mientras que el gen *CCS*, que codifica una enzima bifuncional (*CCS*/ $\beta$ -LCY), presenta una expresión específica de fruto y se induce durante la maduración (Bouvier y col., 1994). Las isoformas LCYB específicas de tejido cromoplástico identificadas hasta la fecha en frutos, como  $\beta$ -LCY2 de tomate (Ronen y col., 2000), *Cs $\beta$ -lcy2* de naranja (Alquézar et al, 2009) y *CCS* de pimentón (Hugueney y col. 1995) presentan similitudes importantes.

Los resultados obtenidos en este trabajo y por otros autores (Just y col., 2007) parecen indicar que *DcLcyb2* se encuentra en copia única en el genoma de *Daucus carota* var. Nantes y carece de intrones. Al igual que los genes LCYB2 de tomate, *Cs $\beta$ -LCY2* de naranja y *CCS* de pimentón, que también carece de intrones y al menos los dos primeros se encuentran en copia   nica (Deruere y col. 1994; Ronen y col. 2000, Alquézar y col., 2009). Además, se ha reportado que *DcLCYB2* presenta una relación

filogenética más estrecha entre LCYB's presentes en tejidos abundantes en cromoplastos que con las LCYBs canónicas correspondientes (Ocaez, 2009). Según análisis filogenéticos el grupo de las enzimas mencionadas arriba engloba también enzimas Neoxantina Sintasa (NSY) indicando un origen común de los genes *lcyb*, *ccs* y *nsy* (al Babili y col., 2000; Krubasik y Sandmann, 2000), que codifican enzimas con un mecanismo de reacción muy similar (Bouvier y col., 1997; Bouvier y col., 2000; al Babili y col., 2000). En efecto, LCYB cataliza una versión simplificada de las reacciones catalizadas por NSY y CCS, lo que sugiere que estas dos últimas enzimas se pudieron originar a partir de LCYB durante la evolución de las plantas superiores para dar lugar a nuevos carotenoides oxigenados (Bouvier y col., 2000). Otras evidencias que indican que *nsy* y *ccs* se originaron a partir de una duplicación génica de *lcyb* es que en las cianobacterias, los supuestos progenitores de los plastidios, no existen *nsy* ni *ccs*, pero sí *lcyb* (Bouvier y col., 2000; Krubasik y Sandmann, 2000). Al respecto y considerando que el gen *DcLcyb2* reúne características que lo clasificarían como un gen tejido específico que en términos filogenéticos el producto de la expresión génica está relacionado a enzimas del tipo CCS y según lo reportado previamente, se han identificado motivos que también lo hacen un candidato que codificaría para una enzima con actividad Capsantina-Capsorubina Sintasa, sería interesante determinar si DcLCYB2 es una enzima bifuncional, como lo reportado en pimentón (Bouvier y col., 1994). Esto complementaría los resultados generados en esta tesis de Magíster que caracterizan al gen *DcLcyb2* con el objetivo principal de demostrar que éste codifica para una enzima con función Licopeno  $\beta$ -Ciclase.

### **4.3 La proteína DcLCYB2 se localiza en los plastidios de las células vegetales.**

En el análisis realizado a partir de la secuencia aminoacídica deducida del gen *DcLcyb2* aislado en esta Tesis a partir de ADN genómico purificado de hojas de *Daucus carota* indican que DcLCYB2 presenta en el extremo amino un péptido señal de importación a plastidios (sección 3.1.2) que ha sido descrito en todas las enzimas implicadas en la biosíntesis de carotenoides en plantas (Fraser y Bramley 2004; Bouvier y col., 2005; Howitt y Pogson 2006; DellaPenna y Pogson 2006; Sandmann y col., 2006; Alquézar y col., 2009). En el caso de las LCYB's, esta señal de importación se encuentra en los primeros 50-100 aminoácidos de la secuencia aminoacídica (Hugueney y col., 1995; Krubasik y Sandmann, 2000). Se ha descrito que esta señal de importación a plastidios, no se encuentra en LCYBs de bacterias ni de cianobacterias (Hugueney y col., 1995), y no parece esencial para la actividad catalítica LCYB (Cunningham y col., 1996). Sin embargo, estudios bioquímicos previos establecen claramente que la ubicación de las enzimas de síntesis de carotenoides es fundamental para la actividad (Al-Babili y col., 1996; Schledz y col., 1996). Esto explica la importancia de determinar la localización sub-celular de DcLCYB2 como parte de su estudio y caracterización. Si bien en la secuencia aminoacídica de DcLCYB2 se identificó *in silico* una señal de destinación a plastidios utilizando los programas ChloroP v1.1 y Target P, se ha reportado que los péptidos de tránsito a plastidios no presentan características conservadas (Bruce, 2000; Bruce, 2001) e incluso se ha observado que presentan características similares a los péptidos de destinación a mitocondrias. A pesar de la diversidad de motivos, se han descrito algunas características y motivos consenso en términos de estructura secundaria que

facilitarían la clasificación de estos péptidos de destinación (Lee y col., 2008). Por ejemplo, no se han identificado la formación de estructura secundaria en péptidos de destinación a cloroplastos (Schwenkert y col., 2011).

Considerando lo anterior, en esta Tesis de Magíster se determinó la localización subcelular de la proteína DcLCYB2 fusionada a GFP, mediante microscopía de fluorescencia confocal, observando que tanto la localización de la señal de fluorescencia detectada, así como el patrón de distribución de ésta respondía al mismo patrón de localización y distribución de la señal emitida en rojo, correspondiente a la emisión de fluorescencia de clorofila. Por lo tanto se concluye que DcLCYB2 presenta un péptido de tránsito funcional que dirige la localización de la proteína a cloroplastos de hojas de *Nicotiana tabacum*. Descartamos la generación de artefactos en la localización, mediante el análisis microscópico de varias muestras montadas de tejido foliar provenientes de la transformación transitoria independiente con al menos dos clones distintos de *Agrobacterium*, transformantes para pGWB5/DcLcyb2 y con el control que solo expresa la proteína GFP

Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la localización subcelular de DcLCYB1 de *Daucus carota* donde también se demuestra que la proteína DcLYB1 es destinada a cloroplastos (Moreno y col., 2013).

De acuerdo con estudios proteómicos recientes sobre cloroplastos de *Arabidopsis thaliana* (Joyard y col., 2009; Ferro y col., 2010), muchas de las enzimas de la ruta de biosíntesis de carotenoides son exclusivamente localizadas en la envoltura de los cloroplastos. Sólo unas pocas enzimas carotenogénicas se encuentran en los tilacoides, como por ejemplo, las enzimas del ciclo de las xantofilas y la Fitoeno desaturasa (PDS). En cromoplastos de pimentón (*Capsicum annuum*), la mayoría de las enzimas que participan de la síntesis de carotenoides están localizadas en los



plastoglóbulos (Austin y col., 2006; Ytterberg y col., 2006). De modo excepcional, estudios proteómicos en maíz (*Zea mays*) detectaron sólo las enzimas PDS y  $\zeta$ -Caroteno Desaturasa en las fracciones de membrana de vaina del haz y de células del mesófilo, respectivamente (Friso y col., 2010). Esto coincidió con la detección de carotenoides en ambos tipos de células, sin embargo, otras enzimas de la biosíntesis de carotenoides no fueron detectadas.

De acuerdo a los antecedentes mencionados anteriormente, si bien la localización de DcLCYB2 se ha detectado en los cloroplastos, es muy interesante conocer cuál es la localización suborganelar en estos y otros plastidios. De acuerdo a lo indagado en la literatura y en base a las conjeturas realizadas en esta discusión que señalan que el gen *DcLcyb2* tendría expresión tejido específica, predominando en tejidos cromoplásticos, es muy probable que en los cromoplastos de zanahoria, la enzima DcLCYB2 se localice particularmente en los plastoglóbulos. Lo anterior sienta precedente respecto al contexto en el cual la enzima actúa *in planta*, considerando que la localización sub-organelar de la ruta de biosíntesis es una entidad de control de la localización espacial única de los carotenoides que son acumulados.

Otro antecedente importante reportado recientemente indica que distintas isoenzimas PSY de la ruta de síntesis de carotenoides en maíz (*Zea mays*), resultado de las variantes alélicas identificadas, difieren en la localización suborganelar en el cloroplasto (Shumskaya y col., 2012). Es importante mencionar que las distintas isoenzimas PSY median la carotenogénesis en tejidos determinados, en respuesta a señales fisiológicas y de desarrollo (Li y col., 2008a, 2008b, 2009). Por lo tanto, es probable que en *Daucus carota*, las isoenzimas DcLCYB1 y DcLCYB2, también presenten una localización suborganelar determinada. Es altamente probable también que estas isoenzimas se localicen en sub-compartimentos diferentes en el plastidio, y a

su vez, es probable que esta localización varíe dependiendo del tipo de tejido analizado. De existir una localización sub-organelar diferencial entre DcLCYB1 y DcLCYB2, esto reforzaría la idea propuesta en esta Tesis de Magíster en relación a que DcLCYB2 tiene una función tejido específica.

Es interesante reflexionar respecto al hecho de que las enzimas que participan de la síntesis de carotenoides y poseen una localización sub-organelar determinada, conformarían un complejo enzimático dinámico que responde a las señales ambientales y de desarrollo, para vincular los procesos de fotomorfogénesis, fotoprotección y respuestas frente a estrés, con la síntesis de carotenoides sitio-específica y la degradación de éstos. Lo anterior ha sido abordado recientemente por autores como Shumskaya y Wurtzel en una revisión del año 2013 (Shumskaya y Wurtzel, 2013). Adicionalmente, un estudio reciente ha demostrado que la capacidad de interacción de las enzimas carotenogénicas está asociada a un incremento de la actividad de la ruta de biosíntesis (Quinlan y col., 2012).

#### **4.4 La expresión del gen *DcLcyb2* provoca un aumento de los niveles de carotenoides en hojas de la planta modelo *Nicotiana tabacum*.**

Para determinar el efecto de la expresión del gen *DcLcyb2* en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* y con ello demostrar que el gen *DcLcyb2* es funcional *in planta*, se analizó el contenido y composición de carotenoides en las líneas transformadas con las construcciones pGWB2/*DcLcyb2* y pMDC32/*DcLcyb2*. Considerando que la principal diferencia entre los dos tipos de vectores utilizados está en el número de copias del promotor 35S CaMV, el cual dirige la expresión del inserto, donde el vector pMDC32 contiene una copia doble del promotor 35S CaMV, mientras que el vector pGWB2, contiene una copia única de este promotor y dado que se ha reportado que el uso de repeticiones en tándem del promotor 35S CaMV aumenta el nivel de la actividad promotora hasta 10 veces (Kay et al., 1987), decidimos utilizar esta estrategia experimental para gatillar niveles de expresión diferenciales del transgen que se vean reflejados en una diferencia en la cantidad o composición de carotenoides del sistema heterólogo transformado,

Los datos obtenidos demuestran que efectivamente existe un efecto diferencial entre el uso de ambas construcciones. En las plantas transformadas con la construcción pMDC32/*DcLcyb2* los niveles de  $\beta$ -caroteno y luteína aumentaron en promedio 1,63 y 1,59 veces, cada uno con respecto a las plantas silvestres, mientras que los niveles de carotenoides totales y clorofila aumentaron en promedio 1,63 y 1,44 veces respectivamente en comparación al control. Las plantas de tabaco que fueron transformadas con la construcción pGWB2/*DcLcyb2* vieron aumentados sus niveles de  $\beta$ -caroteno y luteína en promedio 1,19 y 1,30 veces, respectivamente, mientras que los niveles de carotenoides totales y clorofila aumentaron en promedio 1,24 y 1,22 veces,

cada uno respecto a la línea control. Por lo tanto, el gen *DcLcyb2* clonado en el vector pMDC32 generó niveles más altos de carotenoides totales y  $\beta$ -caroteno en comparación con el vector pGWB2. A su vez se registró un mayor porcentaje de líneas transgénicas con un aumento significativo en la cantidad de  $\beta$ -caroteno y carotenoides totales y mayor nivel de transcrito del transgen respecto al grupo de líneas pGWB2/*DcLcyb2*. Nuestros resultados coinciden con aquellos obtenidos por Ji et al (2009) al expresar *LbLCY-B* de *Lycium barbarum* en plantas de tabaco, donde se informó que los niveles de  $\beta$ -caroteno en las hojas aumentaron en promedio 1,5 veces (Ji et al, 2009).

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el aumento del contenido de carotenoides y principalmente  $\beta$ -caroteno, estaría modulado a nivel transcripcional por el gen *DcLcyb2* e indican que el gen codifica para una enzima que promueve la síntesis de carotenoides en *N. tabacum*.

La regulación a nivel transcripcional es uno de los principal factores que alteran el equilibrio metabólico de la composición de carotenoides, en función de estímulos como la luz (Bramley, 2002; Römer y Fraser, 2005), el desarrollo (Kita y col., 2007), distintos tipos de estrés abiótico (Li y col., 2008; Welsch y col., 2008), entre otros (Lu y Li, 2008; Cazzonelli y Pogson, 2010). Esto nos hace suponer que la acumulación y aumento del contenido de  $\beta$ -caroteno detectado en la raíz modificada de *Daucus carota* durante el desarrollo (Fuentes y col., 2012), podría ocurrir en respuesta a un aumento en los niveles de transcrito del gen *DcLcyb2*.

El uso de plantas modelo para determinar la funcionalidad de genes *lcyb* ha sido ampliamente utilizado y descrito en la literatura. Es el caso de la sobre-expresión de los genes *lcyb* de *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum* (tomate) en plantas

de tomate (Rosati et al, 2000; D'Ambrosio et al, 2004) lo cual generó un incremento del contenido de  $\beta$ -caroteno en hasta 7 veces.

En plántulas de *Arabidopsis*, la expresión del gen *CstLcyB2a* de *Crocus sativus* (azafrán) generó un aumento de los niveles de  $\beta$ -caroteno en 6 de 8 líneas transgénicas (Ahrazem y col., 2009) y la expresión en frutos de tomate del gen licopeno  $\beta$ -ciclase *CsLCYb1* de *naranja dulce* (*Citrus sinensis* L. Osbeck) producen un aumento significativo (entre 2 a 4,2 veces) de la producción de  $\beta$ -caroteno y la reducción concomitante de licopeno (Zhang y col., 2013).

En cuanto a los niveles de luteína detectados en las líneas pMDC32/*DcLcyb2*, se observó un incremento de hasta 1,82 veces (91,29  $\mu\text{g/g}$  PS) en comparación con la muestra control (50,09  $\mu\text{g/g}$  PS). Resultados similares fueron reportados por Ahrazem y col. (2009). Esto sugiere un aumento de la canalización del flujo metabólico hacia la vía de las  $\beta$ ,  $\epsilon$ -xantofilas en la ruta de biosíntesis de carotenoides en las hojas de tabaco transgénicas pMDC32/*DcLcyb2*, teniendo siempre en consideración que es altamente probable que el redireccionamiento de la vía esté dado por el contexto fisiológico del organismo estudiado en cuestión.

A su vez, en todas las plantas de tabaco pMDC32/*DcLcyb2* que expresaron el gen *DcLcyb2* se registró un aumento de los niveles de carotenoides totales de hasta 1,84 veces (899,5  $\mu\text{g/g}$  PS) respecto a lo detectado en la línea control. No obstante, el patrón de composición porcentual de carotenoides no se vió alterado, al igual como fue reportado en hojas de líneas de *Daucus carota* transgénicas que sobreexpresan el gen *DcLcyb1* (Moreno y col., 2013). No obstante, estos resultados difieren de lo reportado en frutos de tomate transformados con el gen *CsLCYb1* de naranja dulce, donde el contenido de carotenoides totales varió entre seis líneas transgénicas analizadas de manera independiente, detectándose incluso en la mayoría de éstas, niveles más bajos

que los niveles de carotenoides totales de la línea control (Zhang y col., 2013). Nuevamente es importante enfatizar en que estas diferencias pueden estar dadas por el tipo de tejido analizado.

En la mayoría de las líneas transgénicas donde se detectó un aumento significativo de carotenoides totales, se detectó a su vez un aumento significativo del contenido de clorofila, alcanzando los 233,7  $\mu\text{g/g}$  de peso seco cuantificados para la línea L1 (pMDC32/*DcLcyb2*) en comparación a los 134,3  $\mu\text{g/g}$  de peso seco detectados en la muestra control. Esto significó un aumento de 1,74 veces y concuerda con los resultados de sobre-expresión de un gen carotenogénico endógeno *psy*, en semillas de *Arabidopsis*, donde se observó el aumento de la síntesis de clorofila (Lingren y col., 2003) y también concuerda con resultados obtenidos en nuestro laboratorio al expresar el gen *DcPsy2* y *DcPsy1* en tabaco (Acevedo, 2011 y 2014).

El aumento simultáneo del contenido de carotenoides y clorofila detectado en esta Tesis estaría dado por la presencia del compuesto geranil geranil pirofosfato (GGPP) como precursor común de la síntesis de ambos tipos de pigmentos. Por ello, es posible que el efecto observado en las líneas de tabaco transgénicas analizadas se explique en base a mecanismos de co-regulación entre la síntesis de carotenoides y de clorofila, los cuales han sido reportados previamente en tabaco y *Chlamydomonas* (Härtel y Grimm, 1998; Bohne y Linden, 2002).

Es importante señalar que la eficiencia de producción de pigmentos está determinada, entre otros factores, por el organismo (planta) que se utiliza como receptor del transgen (Diretto y col., 2007; Maas y col., 2009), lo que explica la variabilidad del contenido de carotenoides en diversos modelos vegetales transformados con genes carotenogénicos de distintas especies vegetales.

No obstante, si bien en esta Tesis de Magíster se observó un aumento del

cotenido de  $\beta$ -caroteno, luteína y carotenoides totales, en la mayoría de las líneas transgénicas, los niveles de pigmentos detectados fueron variables entre dichas líneas. Tal variabilidad estaría dada principalmente por el mecanismo utilizado de transformación genética, mediante *Agrobacterium tumefaciens*, donde el ADN exógeno se integra al azar en el genoma de la planta y por lo general el loci transgénico alberga múltiples copias del ADN integrado (Tindland, 1996; Tzfira y col., 2004). Tales factores determinan los niveles de expresión del transgen y por ende el de los metabolitos asociados a la actividad de los productos proteicos obtenidos.

La inserción al azar de un transgen está asociada a niveles de expresión variables de acuerdo al estado de compactación de la cromatina, que a su vez está determinado por el grado de metilación del ADN transcripcional. Estos procesos también estarían asociados el tipo de explante utilizado (Tenea y Cucu, 2006). En base a lo anterior, es necesario generar un gran número de transgénicos independientes para demostrar los efectos directamente asociados a un transgen y eliminar aquellos no relacionados. Además, es importante seleccionar aquellas líneas que contienen sólo una copia única del transgen, las cuales son menos vulnerables a los mecanismos de silenciamiento génico en comparación a plantas con copias múltiples del mismo. Esto a su vez favorece la obtención de plantas homocigóticas.

Por otra parte, a pesar de que la transformación mediada por *Agrobacterium* conduce a la inserción de un menor número de copias del transgen (< 10) y una mayor incidencia de integrantes de una sola copia en comparación a otros métodos de transferencia de ADN, tales como electroporación y biobalística, donde incluso es posible obtener hasta 100 copias de ADN integrado de manera directa (Hansen y Wright, 1999; Koprek y col., 2001; Gelvin, 2003; Reddy y col., 2003; Butaye y col.,

2004), las copias integradas pueden cambiar tanto su interacción con el genoma del huésped en regiones específicas, así como su organización, lo que puede provocar el truncamiento, inversión, eliminación y otros reordenamientos cromosómicos además de otros cambios aparentemente menores, como los relacionados con la metilación del ADN. Las inserciones de copias múltiples se caracterizan a menudo por presentar patrones de integración complejos como consecuencia de la homología de secuencias, incluyendo arreglos de repeticiones en tándem (TR) o repeticiones invertidas (IR) (Jorgensen y col., 1987; Hobbs y col., 1993; Sijen y col., 1996; Jorgensen y col., 1996; De Neve y col., 1997; Depicker y Van Montagu, 1997; Stam y col., 1997; Muskens y col., 2000; Wang y Waterhouse, 2000).

Si bien, teóricamente se espera que el aumento en el número de copias lleve a un aumento en la expresión del transgen, varios estudios sugieren una relación inversa entre el número de copias de un gen integrado y el nivel de expresión del mismo (Kohli y col., 2003). Los múltiples patrones de integración de copia tales como las repeticiones en tándem (Sijen y col., 1996; Jorgensen y col., 1996; Wang y Waterhouse, 2000) y las estructuras de repeticiones invertidas (Hobbs y col., 1993; Depicker y Van Montagu, 1997; Stam y col., 1997; Muskens y col., 2000;) se asocian a menudo con una baja expresión del transgen como consecuencia de mecanismos de silenciamiento génico post- transcripcional.

Por lo tanto, los resultados que aquí se discuten demuestran que la expresión del gen *DcLcyb2* está asociada a un aumento en el contenido carotenoides, principalmente  $\beta$ -caroteno, y sugieren que la regulación de la vía de síntesis de carotenoides en hojas de tabaco podría estar dada por la expresión de *DcLcyb2* a nivel transcripcional.

#### **4.5 La sobre-expresión del gen *DcLcyb2* modula los niveles de expresión de genes carotenogénicos endógenos en hojas de *Nicotiana tabacum*.**

Existen reportes que describen mecanismos de regulación transcripcional de la ruta de biosíntesis de carotenoides mediante retroalimentación, tanto negativa como positiva. Por ejemplo, se sabe que la acumulación de fitoeno en una mutante de *Arabidopsis thaliana* en el gen *pds* provoca la represión de varios genes relacionados a las rutas metabólicas de los carotenoides y giberelinas, entre otras, e indicaría la presencia de mecanismos de retro-alimentación negativa mediada por fitoeno (Qin y col., 2007). Por otra parte, se ha demostrado que el ácido abscísico ABA induce la expresión de los genes *psy3* de maíz y arroz, lo cual a su vez podría tener un rol en el aumento de los carotenoides en respuesta al estrés abiótico (Li y col., 2008; Welsch y col., 2008).

Además, de acuerdo a lo reportado en la literatura, la transformación con genes carotenogénicos exógenos altera la expresión de genes endógenos de la misma ruta de síntesis (Römer y col., 2000; Römer y col., 2002; Jayaraj J y col., 2008; Moreno y col., 2013).

En esta Tesis comprobamos que la expresión del gen endógeno *Ntpsy1* en las hojas de 2 de 3 líneas transgénicas (L7 y L9), con los mayores niveles de expresión del gen *DcLcyb2*, aumentó significativamente con respecto a la línea transformada con el vector sin inserto pMDC32 (Figura 26.A). Por otra parte, la expresión del gen endógeno *Ntpsy2* aumentó significativamente en las líneas transgénicas L4, L7 y L9 (Figura 26.B). Sin embargo, no se observó un aumento significativo de la expresión de *Ntlcyb* en 2 de las 3 líneas analizadas (L4 y L9).

Se ha reportado que en hojas de zanahoria que sobre-expresan el gen *DcLcyb1* se indujo la expresión de los genes *DcPsy1* y *DcPsy2* endógenos (Moreno y col., 2013), lo cual en términos generales, concuerda con lo obtenido en esta Tesis. Sin embargo, los niveles de transcrito del gen *lcyb* endógeno cuantificados en tabacos con los mayores niveles de expresión del transgen se contraponen a lo reportado por Moreno en zanahoria, donde se reportó un aumento de los niveles de transcrito del gen endógeno *DcLcyb2*. Por otra parte, se ha descrito que la expresión en tomate del gen licopeno  $\beta$ -ciclase de *Arabidopsis*, *AtLcyb*, bajo el promotor del gen *Pds*, no afectó significativamente la expresión de los genes carotenogénicos endógenos (Rosati y col., 2000).

De acuerdo a estos resultados, se demuestra que altos niveles de expresión del gen *DcLcyb2* en tabaco están asociados a un aumento de los niveles de transcrito endógenos de *Ntpsy1* y *Ntpsy2*, pero no de *Ntlcyb*.

Adicionalmente, y de acuerdo a los resultados obtenidos en esta Tesis respecto a la relación directa observada entre los niveles más altos de transcrito *DcLcyb2* y los de  $\beta$ -caroteno detectados en las líneas transgénicas de tabaco analizadas (Figura 25), es posible que tal relación esté dada por una acumulación de la proteína DcLCYB2, dando cuenta de la tasa de traducción o de los mecanismos de regulación postranscripcional de la expresión génica, según lo descrito por Baerenfaller y col. (2008) quien reportó que en muestras representativas de diferentes órganos de *Arabidopsis*, en su mayoría existe una correlación positiva entre la acumulación de proteína y la abundancia del transcrito correspondiente, en un rango de 0,5 a 0,68. Posteriormente estos datos fueron corroborados por el grupo de Baginsky y col. (2010) quienes además han descrito que la correlación más alta se obtuvo en hojas, lo que

sugiere que las proteínas fotosintéticas más abundantes están reguladas predominantemente a nivel transcripcional.

En conclusión, estos antecedentes sugieren fuertemente que el gen *DcLcyb2* tiene funcionalidad *in vivo* y codifica para una enzima con actividad licopeno  $\beta$ -ciclase en el sistema heterólogo *Nicotiana tabacum*.

#### **4.6 Uso del gen *DcLcyb2* como herramienta biotecnológica para el desarrollo de especies vegetales mejoradas mediante ingeniería metabólica.**

Dado que la zanahoria naranja es una de las plantas que produce las mayores cantidades de carotenoides y  $\beta$ -caroteno, es que en esta Tesis de Magíster se propone al gen *DcLcyb2* como un gen candidato para aumentar la síntesis de carotenoides y  $\beta$ -caroteno en otras variedades vegetales de interés comercial ya sea a nivel nacional o mundial. Un ejemplo de lo expuesto anteriormente es el desarrollo en el laboratorio de la plataforma de transformación de *Actinidia deliciosa* var. Hayward (kiwi) para la expresión del gen *DcLcyb2*, con el fin de aumentar el contenido de carotenoides, y aumentar la tolerancia a estrés salino de las plantas transgénicas (Proyecto VIU 110046. Rosas y Stange, 2012-2013). Lo anterior ha sido propuesto considerando que en kiwis, la acumulación de  $\beta$ -caroteno y luteína es controlada y regulada a nivel transcripcional por el gen licopeno  $\beta$ -ciclase (*LCYb*) (Ampomah-Dwamena y col., 2009). Paralelamente, el aumento de la tolerancia a estrés salino se ha planteado como un antecedente complementario que viene a promover el uso del gen *DcLcyb2* y que particularmente en cultivos como el kiwi es un foco de interés importante. Esto, considerando trabajos que reportan que la transformación con los genes licopeno  $\beta$ -

ciclasa de *Salicornia europaea* y *Arabidopsis* confieren tolerancia a salinidad en plantas de *Arabidopsis* y tabaco (Chen y col., 2011), basado en las propiedades antioxidantes y de precursores de la síntesis de ABA de los carotenoides. También se ha reportado que el gen parólogo de *lcyb*, *cruP* (*Synechocystis sp.*), protege de las especies reactivas de oxígeno en especies fotosintéticas como *Arabidopsis* (Bradbury y col., 2012).

Hasta la fecha se ha logrado la expresión exitosa y constitutiva del gen *DcLcyb2* en plantas de kiwi cultivadas en tierra que fueron transformadas con *Agrobacterium tumefaciens* y que fueron regeneradas mediante organogénesis somática (Quiroz, 2014. Tesis de pre-grado). Las líneas transgénicas obtenidas presentan claros signos de tolerancia a condiciones de riego con sal (NaCl 200 mM) y actualmente son mantenidas en el laboratorio en espera de la generación de los primeros frutos para el análisis del contenido de carotenoides por HPLC.

## CONCLUSIONES

Del conjunto de resultados de esta Tesis de Magíster se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El gen *DcLcyb2* de *Daucus carota* codifica para una enzima con actividad Licopeno  $\beta$ -ciclase al complementar el fenotipo de la cepa mutante *E.coli* BL21DS- $\Delta$ crtY, mediante la formación de  $\beta$ -caroteno a partir de licopeno.
- La proteína DcLCYB2 se localiza en los plastidios de la célula vegetal. Por lo tanto, se demuestra la funcionalidad del péptido de importación a plastidios identificado *in silico* en el extremo amino de la secuencia aminoacídica de DcLCYB2.
- La expresión del gen *DcLcyb2* induce un aumento de los niveles de  $\beta$ -caroteno, luteína, carotenoides totales y clorofila en hojas de tabaco transgénicas que expresan dicho gen. El uso de una copia doble del promotor 35S CaMV, en el vector pMDC32, para la expresión del gen *DcLcyb2*, promueve la generación de un mayor número de líneas transgénicas con niveles de  $\beta$ -caroteno aumentados significativamente en comparación al uso de una copia simple del promotor en el vector pGWB2.
- Existe una correlación directa entre el nivel de transcrito del gen *DcLcyb2* y el incremento del nivel de  $\beta$ -caroteno en plantas de tabaco transgénicas pMDC32/*DcLcyb2*. Esto demuestra que el gen *DcLcyb2* es funcional *in planta*, sugiriendo fuertemente que éste codifica para una enzima con actividad Licopeno  $\beta$ -Ciclase.

- La sobre-expresión del gen *DcLcyb2* induce la expresión de los genes carotenogénicos endógenos *Ntpsy1* y *Ntpsy2* en plantas de tabaco transgénicas. Esto daría cuenta de mecanismos de regulación por retroalimentación positiva generados por la expresión del transgen, sugiriendo que el aumento de los niveles de carotenoides totales detectados en estas líneas estaría dado por un equilibrio entre los niveles de transcrito del gen *DcLcyb2* y los niveles de transcrito de genes claves de la ruta de biosíntesis de carotenoides, como son *Ntpsy1* y *Ntpsy2*.

Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran la hipótesis propuesta en esta Tesis de Magíster y permiten concluir en términos generales que:

El gen *DcLcyb2* de *Daucus carota* codifica para una proteína localizada en los plastidios de la célula vegetal, que tiene actividad licopeno  $\beta$ -ciclasa. Su expresión en la planta modelo *Nicotiana tabacum* induce un aumento en los niveles de  $\beta$ -caroteno, luteína, carotenoides totales y clorofila y a su vez induce transcripcionalmente la expresión de los genes carotenogénicos endógenos *Ntpsy1* y *Ntpsy2*, pero no de *Ntlcyb* de manera sustancial. Esto demuestra la funcionalidad del gen *DcLcyb2* *in planta*.

## REFERENCIAS

- Acevedo O. 2014. Caracterización de la función del gen fitoeno sintasa 2 (*DcPsy2*) de *Daucus carota* mediante expresión en *Nicotiana tabacum*. Tesis de Magíster. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Ahrazem O, Rubio-Moraga A, Lopez RC y Gomez-Gomez L. 2010. The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors. *Journal of Experimental Botany*, vol. 61: 105-119.
- Al-Babili S, Von Lintig J, Haubruck H y Beyer P. 1996. A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is Hsp70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation. *The Plant Journal*. 9: 601–612.
- Alquézar B, Zacar as L y Rodrigo MJ. 2009. Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene b-cyclase from Citrus and its relation to lycopene accumulation. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60(6): 1783–1797.
- Ampomah-Dwamena C, McGhie T, Wibisono R, Montefiori M, Hellens RP y Allan AC. 2009. The kiwifruit lycopene beta-cyclase plays a significant role in carotenoid accumulation in fruit. *Journal of Experimental Botany*. 60, 3765–3779.
- Arango J, Salazar B, Welsch R, Sarmiento F, Beyer P y Al-Babili S. 2010. Putative storage root specific promoters from cassava and yam: Cloning and evaluation in transgenic carrots as a model system. *Plant Cell Reports*. 29: 651–659.
- Araújo AP, Oliva G, Henrique-Silva F, Garratt RC, C ceres O y Beltramini LM. 2000. Influence of the histidine tail on the structure and activity of recombinant chlorocatechol 1,2-dioxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 272 (2): 480-484.
- Arscott SA, Tanumihardjo SA. 2010. Carrots of many colors provide basic nutrition and bioavailable phytochemicals acting as a functional food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Volume 9(2): 223–239.
- Attfeld EM y Evans PK. 1991 (a). Stages in the initiation of root and shoot organogenesis in cultured leaf explants of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. *Journal of Experimental Botany*. 42: 59-63.
- Attfeld EM y Evans PK. 1991 (b). Developmental pattern of root and shoot organogenesis in cultured leaf explants of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. *Journal of Experimental Botany* 42: 51-57.

- Aviezer D, Brill-Almon E, Shaaltiel Y, Hashmueli S, Bartfeld D, Mizrachi S, Liberman Y, Freeman A, Zimran A y Galun E. 2009. A plant-derived recombinant human Glucocerebrosidase enzyme—A preclinical and phase I investigation. *PLoS ONE* 4(3): e4792.
- Baerenfaller K, Grossmann J, Grobei MA, Hull R, Hirsch-Hoffmann M, Yalovsky S, Zimmermann P, Grossniklaus U, Gruissem W y Baginsky S. 2008. Genome-scale proteomics reveals *Arabidopsis thaliana* gene models and proteome dynamics. *Science* 320: 938–941.
- Baginsky S, Hennig L, Zimmermann P, Gruissem W. 2010. Gene expression analysis, proteomics, and network discovery. *Plant Physiology* 152: 402-410.
- Bai L, Kim EH, DellaPenna D y Brutnell TP. 2009. Novel lycopene epsilon cyclase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis. *The Plant Journal* 59: 588–599.
- Bang H, Kim S, Leskovar D y King S. 2007. Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in lycopene  $\beta$ -cyclase (LCYB) gene. *Molecular Breeding*. 20: 63–72.
- Banga O. 1957. Origin of the European cultivated carrot. *Euphytica* 6: 54–63.
- Banga O. 1963. Main types of the western carotene carrot and their origin. Zwolle: W.E.J. Tjeenk Willink. 153 p.
- Baranska M, Baranski R, Schulz H y Nothnagel T. 2006. Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta* 224(5): 1028-1037.
- Bhosale P y Bernstein PS. 2007. Vertebrate and invertebrate carotenoid-binding proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 458: 121-127.
- Björkman, O. 1981. Responses to different quantum flux densities. In: *Physiological Plant Ecology* 12: 57–107. Lange OL, Nobel PS, Osmond CB y Ziegler H, eds. Springer Berlin Heidelberg.
- Bohne F y Linden H. 2002. Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1579(1): 26-34.
- Bouvier F, d'Harlingue A y Camara B. 1997. Molecular analysis of carotenoid cyclase inhibition. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 346(1): 53–64.
- Bouvier F, Rahier A y Camara, B. 2005. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in Lipid Research* 44(6): 357-429.

- Bradbury LM, Shumskaya M, Tzfadia O, Wu SB, Kennelly EJ y Wurtzel ET. 2012. Lycopene cyclase paralog CruP protects against reactive oxygen species in oxygenic photosynthetic organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(27): E1888-1897.
- Bramley P. 2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *Journal of Experimental Botany* 53: 2107-2113.
- Bruce BD. 2000. Chloroplast transit peptides: Structure, function and evolution. *Trends in Cell Biology* 10: 440-447.
- Bruce BD. 2001. The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1541: 2-21.
- Butaye KJM, Goderis IJWM, Wouters PFJ, Poes JM-TG, Delauré SL, Broekaert WF, Depicker A, Cammune BPA y De Bolle MFC. 2004. Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. *The Plant Journal* 39: 440-449.
- Cazzonelli CI, Nisar N, D Hussain, Carmody ME y Pogson BJ. 2010. Biosynthesis and regulation of carotenoids in plants—micronutrients, vitamins and health benefits. *Plant Developmental Biology* 2: 117-137.
- Clotault J, Peltier D, Berruyer R, Thomas M, Briard M, Geoffriau E. 2008. Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *Journal of Experimental Botany* 59: 3563-3573.
- Cunningham FX, Sun Z, Chamovitz D, Hirschberg J y Gantt E. 1994. Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *The Plant Cell* 6 (8): 1107-1121.
- Cunningham FX, Pogson B, Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D y Gantt E. 1996. Functional analysis of the  $\beta$  and  $\epsilon$  lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *The Plant Cell* 8(9): 1613-1626.
- Cunningham FX, Chamovitz D, Misawa N, Gantt E y Hirschberg J. 1993. Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of  $\beta$ -carotene. *FEBS Letters* 328(1-2): 130-138.
- Cunningham FX y Gantt, E. 2001. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene epsilon-cyclases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 2905.
- Cunningham FX. 2002. Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure and Applied Chemistry* 74: 1409-1417.

- Curtis MD y Grossniklaus U. 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* Vol. 133 no. 2: 462-469.
- Chen WP y Punja ZK. 2002. Transgenic herbicide- and disease-tolerant carrot (*Daucus carota* L.) plants obtained through *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports* 20:929-935.
- Chen X, Han H, Jiang P, Nie L, Bao H, Fan P, Lv S, Feng J y Li Y. 2011. Transformation of  $\beta$ -lycopene cyclase genes from *Salicornia europaea* and *Arabidopsis* conferred salt tolerance in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell Physiology* 52(5): 909–921.
- Chou PY y Fasman GD. 1974. Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13 (2): 222–245.
- D'Ambrosio C, Giorio G, Marinol, Merendino A, Petrozza A, Salfi L, Stigliani AL y Cellini F. 2004. Virtually complete conversion of lycopene into  $\beta$ -carotene in fruits of tomato plants transformed with the tomato lycopene  $\beta$ -cyclase (*lcy-b*) cDNA. *Plant Science* 166: 207–214.
- Demmig-Adams B, Gilmore A y Adams WW. 1996. Carotenoids 3. In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB Journal* 10, 403-412.
- Demmig B, Winter K, Krüger A, Czygan FC. 1987. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves: A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiology* 84: 218–224.
- De Neve M, De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M y Depicker A. 1997. T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from ligation of separate T-DNAs. *The Plant Journal* 11: 15–29.
- Depicker A y Van Montagu M. 1997. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology* 9: 373-382.
- Devitt LC, Fanning K, Dietzgen RG y Holton T. 2010. Isolation and functional characterization of a lycopene  $\beta$ -cyclase gene that controls fruit colour of papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Experimental Botany* 61: 33-39.
- Diretto G, Tavazza R, Welsch R, Pizzichini D, Mourgues F, Papacchioli V, Beyer P y Giuliano G. 2006. Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber specific silencing of lycopene epsilon cyclase. *BMC Plant Biology* 6: 13.
- Diretto G, Al-Babili S, Tavazza R, Papacchioli V, Beyer P y Giuliano G. 2007. Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. *PLoS ONE* 2(4): e350.
- Doyle JJ y Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.

- Dudits D, Hadlaczky G, Bajszar GY, Koncz CS, Lazar G y Horvath G. 1979. Plant regeneration from intergeneric cell hybrids. *Plant Science Letters* 15: 101-112.
- Emanuelsson O, Nielsen H y Von Heijne G. 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* 8(5): 978-984.
- Fisher DK y Guiltinan MJ. 1995. Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: A seed to seed protocol. *Plant Molecular Biology Reporter Volume 13, Issue 3*. Pages: 278-289.
- Fleischer RM, Touwaide A, Appetiti E, Harbaugh D y Kress J. 2010. Composition of pharmaceuticals from a 1st century BC/AD Roman shipwreck based on chloroplast DNA sequences. Fourth International Symposium on Biomolecular Archaeology, Copenhagen. ([http://www.isba4.net/ISBA4\\_FINAL.pdf](http://www.isba4.net/ISBA4_FINAL.pdf)).
- Fraser PD y Bramley P. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* 43: 228-265.
- Fray RG, Wallace A, Frazer FD, Valero D, Hadden P, Bramley PM y Greison D. 1995. Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes cause dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *The Plant Journal* 8: 693-701.
- Freydank AC, Brandt W y Dräger B. 2008. Protein structure modeling indicates hexahistidine-tag interference with enzyme activity. *Proteins* 72:173-183.
- Fuentes P. 2009. Efecto del desarrollo y de la luz en los niveles de RNA mensajero de seis genes de la ruta carotenogénica en *Daucus carota* L. (zanahoria). Tesis de pre-grado. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Fuentes P. 2011. Identificación y análisis estructural y funcional de los promotores de los genes carotenogénicos *psy2* y *lcyb1* de *Daucus carota*. Tesis de Magíster. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Fuentes P, Pizarro L, Moreno JC, Handford M, Rodríguez-Concepción M y 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.
- Gelvin SB. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 16-37.
- Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, Beyer, P y Taylor MA. 2008. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnology* 26: 139-145.

- Gómez-Roldán V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot J-P, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais J-C, Bouwmeester H, Bécard G, Beveridge CA, Rameau C y Rochange SF. 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455: 189–194.
- Grzebelus D, Yau YY y Simon PW. 2006. Master: a novel family of P11-1Harbinger-like transposable elements identified in carrot (*Daucus carota* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 275: 450-459.
- Guzmán I, Hambly S, Romero J, Bosland P y O'Connell M. 2010. Variability of carotenoid biosynthesis in orange coloured *Capsicum* spp. *Plant Science* 179: 49-59.
- Halliwell CM, Morgan G, Ou CP y Cass AE. 2001. Introduction of a (poly)histidine tag in L-lactate dehydrogenase produces a mixture of active and inactive molecules. *Analytical Biochemistry* 295: 257-261.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166(4): 557-580.
- Hansen G y Wright MS. 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends in Plant Science* 4: 226-231.
- Hardegger, M y Sturm, A. 1998. Transformation and regeneration of carrot (*Daucus carota* L.). *Molecular Breeding* 4: 119-127.
- Härtel H y Grimm B. 1998. Consequences of chlorophyll deficiency for leaf carotenoid composition in tobacco synthesizing glutamate 1-semialdehyde aminotransferase antisense RNA: dependency on developmental age and growth light. *Journal of Experimental Botany* 49 (320): 535-546.
- Hartley JL, Temple GF y Brasch MA. 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research* 10: 1788-1795.
- Herrmann A, Schulz W y Hahlbrock K. 1988. Two alleles of the single copy chalcone synthase gene in parsley differ by a transposon-like element. *Molecular and General Genetics* 212: 93-98.
- Hirschberg, J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 210–218.
- Hobbs SLA, Warkentin TD y DeLong CMO. 1993. Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Molecular Biology* 21: 17-26.
- Hofmann K y Stoffel W. 1993. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 374,166.

- Hornero-Mendez D y Britton G. 2002. Involvement of NADPH in the cyclization reaction of carotenoid biosynthesis. *FEBS Letters* 515: 133-136.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG y Fraley RT. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
- Huguency P, Badillo A, Chen H-C, Klein A, Hirschberg J, Camara B y Kuntz M. 1995. Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *The Plant Journal* 8(3): 417-424.
- Imani J, Berting A, Nitsche S, Schaefer S, Gerlich WH y Neumann KH. 2002. The integration of a major hepatitis B virus gene into cell-cycle synchronized carrot cell suspension cultures and its expression regenerated carrot plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 71: 157-164.
- Iorizzo M, Senalik D, Ellison S, Grzebelus D, Cavagnaro PF, Allender C, Brunet J, Spooner D, Van Deynze A y Simon PW. 2013. Genetic structure and domestication of carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*) (Apiaceae) *American Journal of Botany* 100: 930-938.
- Ipek A, Masson P y Simon PW. 2006. Genetic transformation of an Ac/Ds-based transposon tagging system in carrot (*Daucus carota* L.). *European Journal of Horticultural Science* 71: 245-251.
- Itoh Y, Hasebe M, Davies E, Takeda J y Ozeki Y. 2002. Survival of Tdc transposable elements of the En/Spm superfamily in the carrot genome. *Molecular Genetics and Genomics* 269: 49-59.
- Jayaraj J, Devlin R y Punja, Z. 2008. Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants. *Transgenic Research* 17: 489-501.
- Jeong TH, Ji K y Kim YT. 2013. Overexpression and characterization of lycopene cyclase (CrtY) from marine bacterium *Paracoccus haeundaensis*. *Journal of microbiology and biotechnology* Vol.23 (2): 144-148.
- Jones, D. T. 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology* 292(2): 195-202.
- Jorgensen R, Snyder C y Jones JDG. 1987. T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Molecular and General Genetics* 207: 471-477.
- Jorgensen, RA, Cluster PD, English J, Que Q y Napoli CA. 1996. Chalcone synthase co-suppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Molecular Biology* 31: 957-973.

- Just BJ, Santos CAF, Fonseca, MEN, Boiteux LS, Oloizia B B y Simon PW. 2007. Carotenoids biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 693-704.
- Kay R, Chan A, Daly M y McPherson J. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 1987, 236: 1299-1302.
- Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, Stoger E y Christou P. 2003. Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Molecular Biology* 52: 247-258.
- Kita M, Kato M, Ban Y, Honda C, Yaegaki H, Ikoma Y y Moriguchi T. 2007. Carotenoid accumulation in japanese apricot (*Prunus mume Siebold & Zucc.*): Molecular analysis of carotenogenic gene expression and ethylene regulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 3414-3420.
- Klee HJ, Horsch RB y Rogers SG. 1987. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Annual Review of Plant Physiology*. 38:467-486.
- Koncz C y Schell J. 1986. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular Genetics and Genomics* 204: 383-396.
- Kopertekh L y Schiemann J. 2005. Agroinfiltration as a tool for transient expression of *cre* recombinase in vivo. *Transgenic Research* 14: 793–798.
- Koprek T, Rangel S, Mcelroy D, Louwerse JD, Williams-Carrier RE y Lemaux PG. 2001. Transposon-mediated single-copy gene delivery leads to increased transgene expression in barley. *Plant Physiology* 125: 1354-1362.
- Krinsky NI y Johnson EJ. 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 26, 459-516.
- Krubasik P y Sandmann G. 2000. Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochemical Society Transactions* 28(6): 806-810.
- Kuo-Chen Ch y Hong-Bin S. 2010. Plant-mPLOC: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. *PLoS ONE* 5: e11335.
- Kuo-Chen Ch y Hong-Bin S. 2007. Large-scale plant protein subcellular location prediction. *Journal of Cellular Biochemistry* 100: 665-678.

- Laufer B. 1919. The carrot. En: Sino-Iranica: Chinese contributions to the History of civilization in Ancient Iran with special reference to the History of cultivated plants and products. Chicago: Field Museum of Natural History. Vol. 15. 451–454.
- Lee DW, Kim JK, Lee S, Choi S, Kim S y Hwanga I. 2008. Arabidopsis nuclear-encoded plastid transit peptides contain multiple sequence subgroups with distinctive chloroplast-targeting sequence motifs. *The Plant Cell* vol. 20(6): 1603-1622.
- Li F, Vallabhaneni R y Wurtzel ET. 2008. PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiology* 146: 1333–1345.
- Lichtenthaler, H. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of photosynthetic membranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Lichtenthaler HK. 1999. The 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 47–65.
- Lichtenthaler HK y Buschmann C. 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry (CPFA)*. John Wiley & Sons, Madison: F4.3.1-F4.3.8.
- Lingren LO, Stalberg KG y Hoglund A. 2003. Seed-specific overexpression of an endogenous Arabidopsis phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll, and abscisic acid. *Plant Physiology* 132: 779-785.
- Lu S y Li L. 2008. Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 778–785.
- Maass D, Arango J, Wust F, Beyer P y Welsch R. 2009. Carotenoid crystal formation in Arabidopsis and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS One* 4: e6373.
- Mackevic VI. 1929. The carrot of Afghanistan. *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding* 20: 517–562.
- Moreno 2010. Evaluación de la funcionalidad del gen licopeno  $\beta$ -ciclase de *Daucus carota* (zanahoria) mediante complementación heteróloga. Tesis de pre-grado. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Moreno 2012. Caracterización funcional del gen *lcyb1* de *Daucus carota* mediante expresión en modelos vegetales. Tesis de Magíster. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

- Moreno JC, Pizarro L, Fuentes P, Handford M, Cifuentes V y Stange C. 2013. Levels of lycopene beta-cyclase 1 modulate carotenoid gene expression and accumulation in *Daucus carota*. PLoS One 8: e58144.
- Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-97.
- Mendes AFS, Chen Ch, Gmitter FG, Moore GA y Costa MGC. 2011. Expression and phylogenetic analysis of two new lycopene  $\beta$ -cyclases from *Citrus paradisi*. Physiologia Plantarum vol. 141 (1): 1-10.
- Mialoundama AS, Heintz D, Jadid N, Nkeng P, Rahier A, Deli J, Camara B y Bouvier F. 2010. Characterization of plant carotenoid cyclases as members of the flavoprotein family functioning with no net redox change. Plant Physiology 153(3): 970–979.
- Muskens MW, Vissers AP, Mol JN y Kooter JM. 2000. Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. Plant Molecular Biology 43: 243-260.
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T y Kimura T. 2007. Development of series of Gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. Journal of Bioscience and Bioengineering 104: 31–41.
- Niklitschek M, Alcaíno J, Barahona S, Sepúlveda D, Lozano C, Carmona M, Marcoleta A, Martínez C, Lodato P, Baeza M y Cifuentes V. 2008. Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Biological Research vol. 41 (1): 93-108.
- Nicolle C, Simon G, Rock E, Amouroux P y Remesy C. 2004. Genetic variability influences carotenoid, vitamin, phenolic, and mineral content in white, yellow, purple, orange, and dark-orange carrot cultivars. Journal of the American Society for Horticultural Science 129: 523– 529.
- Ocarez N. 2010. Desarrollo de herramientas moleculares para el estudio de la función del gen licopeno  $\beta$ -ciclase 2 (*LCYB2*) de *Daucus carota* (zanahoria). Tesis de pre-grado. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Pimenov MG y Leonov MV. 1993. The genera of the *Umbelliferae*. A nomenclator. Royal Botanical Gardens, Kew. UK, 156 pp.
- Pinheiro-Santana H, Stringheta P, Cardoso S, Páez H y Vitarelli V. 1998. Evaluation of total carotenoids, alpha- and beta-carotene in carrots (*Daucus carota* L.) during home processing. Food Science and Technology. Ciência e Tecnologia de Alimentos 18(1): 39-44.

- Pizarro L. 2008. Estudio de la función del gen licopeno B ciclasa (*lcyb*) en la biosíntesis de carotenoides en *Daucus carota*. Tesis de Magister. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Qin G, Gu H, Ma L, Peng Y, Deng XW, Chen Z y Qu LJ. 2007. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid and gibberellins biosynthesis. *Cell Research* 17: 471-482.
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E. 2010. ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science* 15 (7): 395 – 401.
- Rao AV y Rao LG. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research* 55: 207-216.
- Ramos, DMR. 1991. Assessing losses of carotenoids and vitamin A value during dehydration and industrial lyophilization of carrot and spinach. (MS Thesis). University of Campinas, Campinas, 106 p.
- Reddy MS, Dinkins RD y Collins GB. 2003. Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. *Plant Cell Reports* 21: 676-683.
- Rodríguez-Concepción M y Stange C. 2013. Biosynthesis of carotenoids in carrot: an underground story comes to light. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 539(2): 110-116.
- Rodríguez-Villalón A, Gas E y Rodríguez-Concepción M. 2009. Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* 60: 424-435.
- Roise D, Horvath SJ, Tomich JM, Richards JH y Schatz G. 1986. A chemically synthesized pre-sequence of an imported mitochondrial protein can form an amphiphilic helix and perturb natural and artificial phospholipid bilayers. *The EMBO Journal* 5(6): 1327–1334.
- Rojas-Anaya E, Loza-Rubio E, Olivera-Flores MT y Gomez-Lim M. 2009. Expression of rabies virus G protein in carrots (*Daucus carota*). *Transgenic Research* 18: 911–919.
- Römer S, Fraser PD, Kiano JW, Shipton CA, Misawa N, Schuch W y Bramley PM. 2000. Elevation of the pro-vitamin A content of transgenic tomato plants. *Nature Biotechnology* 18 (6): 666-669.
- Römer S, Lübeck J, Kauder F, Steiger S, Adomat C y Sandmann G. 2002. Genetic engineering of a zeaxanthin-rich potato by antisense inactivation and co-suppression of carotenoid epoxidation. *Metabolic Engineering* 4(4): 263–272.

- Römer S y Fraser PD. 2005. Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta* 221: 305-308.
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D y Hirschberg J. 2000. An alternative pathway to  $\beta$ -carotene formation in plant chromoplast discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(20): 11102–11107.
- Rossmann MG, Moras D y Olsen KW. 1974. Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding fold. *Nature* 250: 194-199.
- Rosati C, Aquilani R, Dharmapuri S, Pallara P, Marusic C, Tavazza R, Bouvier F, Camara B y Giuliano G. 2000. Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *The Plant Journal* 24(3): 413–420.
- Salinas P, Fuentes D, Vidal E, Jordana X, Echeverria M y Holuigue L. 2006. An extensive survey of CK2 alpha and beta subunits in Arabidopsis: Multiple isoforms exhibit differential subcellular localization. *Plant and Cell Physiology* 47: 1295–1308.
- Sambrook JF y Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Vols. 1,2 and 3. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2100 pp.
- Santos CAF. 2001. Biometrical studies and quantitative trait loci associated with major products of the carotenoid pathway of carrot (*Daucus carota* L.). PhD Thesis. University of Wisconsin, Madison, WI.
- Santos CAF y Simon PW. 2002. QTL analyses reveal clustered loci for accumulation of major provitamin A carotenes and lycopene in carrot roots. *Molecular Genetics and Genomics* 268(1): 122–129.
- Santos CAF y Simon PW. 2004. Merging carrot linkage groups based on conserved dominant AFLP markers in F2 populations. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129(2): 211–217.
- Schein AI, Kissinger JC y Ungar LH. 2001. Chloroplast transit peptide prediction: a peek behind the black box. *Nucleic Acids Research* Vol 29(16): e82.
- Schledz M, Al-Babili S, Von Lintig J, Haubruck H, Rabbani S, Kleinig H y Beyer P. 1996. Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering. *The Plant Journal* 10(5): 781–792.
- Schnurr G, Misawa N y Sandmann G. 1996. Expression, purification and properties of lycopene cyclase from *Erwinia uredovora*. *Biochemical Journal* 315: 869-874.
- Schwenkert S, Soll J y Bolter B. 2011. Protein import into chloroplasts—how chaperones feature into the game. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1808 (3): 901–911.

- Shinohara S. 1984. Introduction and variety development in Japan. En: Vegetable seed production technology of Japan elucidated with respective variety development histories, particulars. Tokyo: Shinohara's Authorized Agricultural Consulting Engineer Office 4-7-7, Vol. 1. 273–282.
- Sijen T, Wellink J, Hiriart, JB y Van Kammen A. 1996. RNA-mediated virus resistance: role of repeated transgenes and delineation of targeted regions. *Plant Cell* 8: 2277-2294.
- Skelton RL, Yu Q, Srinivasan R, Manshardt R, Moore PH y Ming R. 2006. Tissue differential expression of lycopene  $\beta$ -cyclase gene in papaya. *Cell Research* 16: 731–739.
- Skibsted LH. 2012. Carotenoids in antioxidant networks. Colorants or radical scavengers. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 60(10): 2409 - 2417.
- Simon PW y Goldman IL. 2007. Carrot. En: Singh, R.J. Genetic Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement Series. Volume 3. Boca Raton: CRC Press. p: 497- 517.
- Simon, PW. 2000. Domestication, historical development, and modern breeding of carrot. *Plant Breeding Reviews* 19: 147-190.
- Simon PW y Wolff XY. 1987. Carotenes in typical and dark orange carrots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35(6): 1017-1022.
- Stam M, De Bruin R, Kenter S, Van der Hoorn RAL, Van Blokland R, Mol JNM y Kooter JM. 1997. Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats. *The Plant Journal* 1: 63-82.
- Stange C, Fuentes P, Handford M y Pizarro L. 2008. *Daucus carota* as a novel model to evaluate the effect of light on carotenogenic gene expression. *Biological Research* 41(3): 289–301.
- Steward FC, Mapes MO, Kent AE y Holsten RD. 1964. Growth and development of cultured plant cells. *Science* 143: 20-27.
- Suenaga L. 1991. Basic studies on transfer of cytoplasmic male sterility by means of cytoplasmic hybridization in carrot. *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University* 65: 62-118.
- Sugiyama, M. 1999. Organogenesis *in vitro*. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 61–64.
- Surles RL, Weng N, Simon PW y Tanumihardjo SA. 2004. Carotenoid profiles and consumer sensory evaluation of specialty carrots (*Daucus carota*, L.) of various colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(11): 3417–3421.

- Teramoto M, Takaichi S, Inomata Y, Ikenaga H y Misawa N. 2003. Structural and functional analysis of a lycopene beta-monocyclase gene isolated from a unique marine bacterium that produces myxol. *FEBS Letters* 545(2-3): 120-126.
- Thompson JD, Higgins DG y Gibson TJ. 1994. Clustal-W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673-4680.
- Thayer SS y Björkman O. 1990. Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynthesis Research* 23(3): 331-343.
- Tenea G, Cucu N. 2006. The influence of T-DNA copy numbers on gene expression in primary transformants *Atropa belladonna* plants. *Romanian Biotechnological Letters* 11(2): 2661-2667.
- Tinland B. 1996. The integration of T-DNA into plant genome. *Trends in Plant Science* 1(6): 178-184.
- Van Beeumen JJ, Demol H, Samyn B, Bartsch RG, Meyer TE, Dolata MA y Cusanovich, MA. 1991. Covalent structure of the diheme cytochrome subunit and amine terminal sequence of the flavoprotein subunit of flavo cytochrome c from *Chromatium vinosum*. *Journal of Biological Chemistry* 266: 12921-12931.
- Van Sluys MA y Tempe J. 1989. Behavior of the maize transposable element Activator in *Daucus carota*. *Molecular Genetics and Genomics* 219(1-2): 313-319.
- Vavilov NI. 1926. Centres of Origin of Cultivated Plants. *Inst. Appl. Bot. Genet. and Plant Breed.* Leningrad, 248 pp.
- Vavilov NI. 1951. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *The Chronica Botanica* 13: 1-366 (Translated from Russian by Starr Chester).
- Von Heijne G. 1986. Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *The EMBO Journal* 5(6): 1335-1342.
- Wang MB y Waterhouse PM. 2000. High-efficiency silencing of a beta-glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. *Plant Molecular Biology* 43: 67-82.
- Welsch R, Wü F, Bär C, Al-Babili S y Beyer P. 2008. A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiology* 147(1): 367-380.
- Wirenga RK, Terpstra P y Hol WG. 1986. Prediction of the occurrence of the ADP-binding  $\beta'\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *Journal of Molecular Biology* 187(1): 101-107.

- Yildiz M, Willis DK, Cavagnaro PF, Iorizzo M, Abak K y Simon PW. 2013. Expression and mapping of anthocyanin biosynthesis genes in carrot. *Theoretical and Applied Genetics* 126(7): 1689-1702.
- Zhang J, Zhou W, Xu Q, Tao N, Ye J, Guo F, Xu J y Deng X. 2013. Two lycopene  $\beta$ -cyclases genes from sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) encode enzymes with different functional efficiency during the conversion of lycopene-to-provitamin A. *Journal of Integrative Agriculture* 12(10): 1731-1747.

ANEXOS

CpLCYB	1	N--F	LDLTPSEPEFLVFDLFWFHPSDRIRYDVIIIGTGPAGLRRLAQVSSSRHGKIKVCCV
FaLCYB	1	N--F	LDLTPSEPEFLVFDLFWFHPSDRIRYDVIIIGTGPAGLRRLAQVSSSRHGKIKVCCV
DcLCYB2	1	N--F	LDLTPSEPEFLVFDLFWFHPSDRIRYDVIIIGTGPAGLRRLAQVSSSRHGKIKVCCV
DcLCYB1	1	SSAL	LDLTPSEPEFLVFDLFWFHPSDRIRYDVIIIGTGPAGLRRLAQVSSSRHGKIKVCCV
NtLCYB	1	SSAL	LDLTPSEPEFLVFDLFWFHPSDRIRYDVIIIGTGPAGLRRLAQVSSSRHGKIKVCCV
consensus	1		.....*
CpLCYB	59	115	DPSPLSTWPNNGVWVDEFEDI
FaLCYB	58	110	DPSPLSMWPNNGVWVDEFQSLKLESCLDKTWPMAVHDDNKTKYLDLDPYGRVSR
DcLCYB2	58	104	DPSPLCVWPNNGVWVDEFAMGFQDCFDKTPMSSVYINEEKSKVLDLDPYGRVNR
DcLCYB1	60	119	DSPKLIWPNNGVWVDEFAMDLDCIDTWSAIVYDDQTKKLCRPIYGRVNR
NtLCYB	60	112	DSPKLIWPNNGVWVDEFAMDLDCIDTWSAIVYDDQTKKLCRPIYGRVNR
consensus	61		* .....
CpLCYB	115	NILK	175TKLLENQVLNGVRFHAKVWVHVNHOEFESSIVCDDGNEIKASLIVDASGFAS
FaLCYB	114	KKLR	170KLLMERGLSNGVKFLKAKVWVKIHKKEFSLIVCDDGNEIKASLIVDASGFAS
DcLCYB2	114	EKLK	164MRLGCGVSNVGFHAKVWVKVDHOEFESSIICDDGKEFKASLIVDASGFAS
DcLCYB1	116	KQLK	179SKMOKCISNGVKFHAKVWVKVHEEAKSLIICDDGVTTIQAAVLDAATGFSR
NtLCYB	116	KQLK	172SKMOKCISNGVKFHAKVWVKVHEEAKSLIICDDGVTTIQAATVLDATGFSR
consensus	121		* .....
CpLCYB	171	SFV	VDYDKP 235RNHGQIANGILAEVESHPPFLDKMVLMDWRDSSLGNPEYIRASNLKLL
FaLCYB	170	SFV	VDYDKP 230RNHGQIANGILAEVESHPPFLDKMVLMDWRDSSLGNPEYIRASNLKLL
DcLCYB2	170	TFV	VDYDKP 224RNHGQIANGILAEVESHPPFLDKMVLMDWRDSSLGNPEYIRASNLKLL
DcLCYB1	172	CLV	VDYDKP 239YNPGYQVAYGVAEVEHPPFDVNMIFMDWRDSSLGNPEYIRASNLKLL
NtLCYB	172	CLV	VDYDKP 232YKPGYQVAYGVAEVEHPPFDVNMIFMDWRDSSLGNPEYIRASNLKLL
consensus	181		.....*
CpLCYB	227	PTFLY	AMPFDSN 295LVSLNENTSGVSRPVLISYKEVKRRIMARLRHMGIIRVQRVIEDEKC
FaLCYB	226	PTFLY	AMPFDSN 290LVFLEETSLVSRPVLISYMEIKKRMVARLRHLGIRVKNILEVEKC
DcLCYB2	226	PTFLY	AMPFDSN 284LIFLEETSLVSRPALISYKEVKLRMARLRHLGIRVKNILEVEKC
DcLCYB1	228	PTFLY	AMPFSD 299RIFLEETSLVAREPGLAMGDIQERMVARLRHLGIRVKNILEVEKC
NtLCYB	228	PTFLY	AMPFSD 292KIFLEETSLVAREPGLRMDDIQERMVARLRHLGIRVKNILEVEKC
consensus	241		.....*
CpLCYB	283	LIPMGG	PLPVIPQSV 355AIGSTSGLVHPSTGYMVARTMALAPVLAIAIACCLG-STR
FaLCYB	282	VIPMGG	PLPRIPQSV 350AIGSTSGIHPSTGYMVARTMALAPVLAIAIACCLG-STR
DcLCYB2	282	LIPMGG	PLPRIPQDV 344AIGGSSGIVHPSTGYMVARTMALAPVLAIAIACCLG-STR
DcLCYB1	284	VIPMGG	PLPVLPQRV 359GIGGTAGVHPSTGYMVARTMAAPVVAIAIIVQLGCKK
NtLCYB	284	VIPMGG	PLPVLPQRV 352GTGTAAGVHPSTGYMVARTMAAPVVAIAIIVQLGCKK
consensus	301		.....*
<b>Motivo β-ciclasa</b>			
CpLCYB	338	MIRGR	PLHQKVVNGLWPIER 414RCNREFYSFGMETLLKLLDLCTRRFFDAFFDLDEHY
FaLCYB	337	MIRGK	SLHERRVWVWGLWATER 409RCVROQYISFGMETLLKLLDLCTRRFFDAFFDLDEHY
DcLCYB2	337	MIRGSS	LVRVWVWGLWPIES 403KCTREFYSFGMETLLKLLDLCTRRFFDAFFDLDEHY
DcLCYB1	340	GALGNEL	SAEVWVWGLWPIER 419RRRREFYFCGMDILLKLLDLCTRRFFDAFFDLDEHY
NtLCYB	339	DLLE	NELSAAVWVWGLWPIER 411RRRREFYFCGMDILLKLLDLCTRRFFDAFFDLDEHY
consensus	361		.....*
<b>Motivo β-ciclasa</b>			
CpLCYB	394	WHGFL	SSRLSLREL
FaLCYB	393	WHGFL	SSRLSLREL
DcLCYB2	393	WHGFL	SSRLSLREL
DcLCYB1	396	WHGFL	SSRLSLREL
NtLCYB	395	WHGFL	SSRLSLREL
consensus	421		.....*

Anexo 1. Alineamiento múltiple de secuencias aminoácidas de diferentes LCYBs. Los asteriscos indican los aminoácidos idénticos para todas las secuencias en una posición, mientras aquellos idénticos en más de un 70% de las secuencias analizadas están dados en texto blanco sobre un fondo negro. Aquellos residuos de aminoácidos similares en todas las LCYBs aparecen en fondo gris. Los números a la izquierda indican la posición del aminoácido que da inicio a la secuencia que se alinea. En púrpua se indica el motivo β-ciclasa como región clave para la actividad enzimática LCYB.