

UCH-FC  
MAG- BMCN  
F954  
C.1



Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

**“Identificación y análisis estructural y funcional de los promotores de los genes carotenogénicos *psy2* y *lcyb1* de *Daucus carota*.”**

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

**Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias**

**Facultad de Ciencias**

Por

**Paulina Andrea Fuentes Taladriz**

**Octubre, 2011**

Directora de Tesis: Dra. Claudia Stange K.

Co-Director de Tesis: Dr. Michael Handford

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

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

PAULINA ANDREA FUENTES TALADRIZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 12 de Octubre de 2011

Director de Tesis:  
Dra. Claudia Stange K.

  
.....  
  
.....

Co-Director de Tesis  
Dr. Michael Handford

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Liliana Cardemil

Dra. Madeleine Lamborot

  
.....  
  
.....



Esta tesis fue financiada por el Programa Formación de Capital Humano Avanzado,  
Becas para Estudios de Magíster en Chile, años 2009-2011, CONICYT.



*A mi papá y mi Omi. A mi familia, en especial a mi hermana. A mi amor; y a todos los que creyeron en mí y me apoyaron durante este proceso*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a todo mi team CSK: a la profe Claudia, por el apoyo y los consejos, y en especial por su amistad y cariño. A la Caro, Charlie, Orlando, Clio, Ariel, Daniel, Gonzalo, por la unidad y compañerismo que compartimos, y a JuanK, por compartir conmigo también esta parte tan importante de nuestras vidas.

Muchas gracias también a mis más grandes amigos del lab, Diego, Fran, Clio, Ariel, Koke y Lore, por su cariño y apoyo y por todas las veces que me han levantado el ánimo.

Muchas gracias además al Koke y la Lore por el coaching y las sesiones de terapia, porque de verdad son geniales y los quiero mucho.

Gracias también al profe Mike, la Profe Lore y la Profe Liliana, por tener la mejor disposición para ayudarme siempre que lo necesité y por todos los buenos momentos compartidos, y gracias por su alegría, cariño y simpatía a la Sofi, Carlitos R., Joel, Clio, Ariel y la Panchi.

Quiero agradecer especialmente a la Ange y al Seba, por todo su esfuerzo y trabajo para que hacer que el laboratorio logre funcionar bien, aún cuando somos muchos.

Muchas gracias a todos por hacer de todo el tiempo que he estado en el lab un conjunto de momentos felices, de grandes recuerdos, compañerismo y alegría.

Muchas gracias también a mis amigos de la vida. A la Gabi, Ine, Ceci, Mati y la Dani. Los quiero mucho y agradezco el que estén siempre ahí.

Gracias también a toda mi familia. De verdad estoy muy orgullosa de cada uno de ustedes y feliz de que sean una parte tan importante de mi vida.

Gracias a mi mamá, por impulsarme a abrir mis alas y a seguir mi propio camino. Gracias a mi Sol, por toda esta vida juntas, por tu cariño, por tu corazón inmenso y tu generosidad y por nuestra unión y apoyo mutuo. Por todo tu esfuerzo y por seguir luchando y tratando de estar bien y dar lo mejor. Gracias a todos mis tíos y primos, por creer en mí, por quererme y por hacerme sentir que nunca estoy sola. Muchas gracias mi Kuki por todo tu amor inmenso, por quererme tanto tanto, por cuidarme y regalarme cada vez que te voy a ver. Gracias también Abuelito, por cada detalle que refleja tu cariño. Muchas gracias al tío Neco y la tía Marti (y también al tío Rai), por ser los mejores padrinos del mundo, por acordarse siempre de mí, por recibirme siempre en su hogar con los brazos abiertos, por estar siempre a mi lado y por ser como papás para mí. Muchas gracias también a la tía Viviana, la tía Kena, la tía

Keka y el tío Fredy, por toda su preocupación y ayuda siempre, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos, por todas las risas y el amor infinito, y muchas gracias a mi tía Marta, por amarme como una hija desde que nací, por cuidarme y regalarme desde que era niña y por toda su paciencia y preocupación constantes.

Para mi amor, gracias infinitas por ser la persona excepcional que admiro y por ser el pololo más dulce, tierno y preocupado. Gracias porque me amas por todo lo que soy y a pesar de muchas cosas, porque me apoyas en todo y crees en mí incluso muchas veces más que yo misma, porque has estado en los momentos más difíciles de mi vida y has permanecido a mi lado, porque logras iluminar hasta mi día más triste y porque me enseñaste a amar y a ser más feliz de lo que nunca había sido.

Gracias también a toda mi familia postiza, al tío Oscar y la tía Beatriz, a Matiz y Oscar, por aceptarme y quererme como una hija más desde el primer día y por todo su cariño, preocupación, consejos y apoyo.

Y muchas gracias a Dios, por haberme dado la vida y tantas virtudes. Por todos los regalos que me ha dado en esta vida, por mi familia maravillosa, por todas las pruebas que ha puesto en mi camino y que me han hecho crecer y fortalecerme y en especial por bendecir mi vida con dos angelitos preciosos, mi papito y mi Omi, que estuvieron siempre a mi lado en este mundo y que ahora viven en mi corazón. Gracias Omi, por haber sido mi abuelita y mi mamá, por todo lo que me enseñaste, por ser la mujer excepcional que fuiste, por quererme, creer en mí e impulsarme a ser siempre mejor. Y gracias papito, por haber sido el mejor papá del mundo, por dedicar tu vida a amarnos incondicionalmente a mí y a la Sole, por tu corazón lleno de tanta luz y amor, por tus abrazos, por tus ojitos sonrientes, por tu alegría, por tus enseñanzas, por tu confianza ciega en mí, por todos tus sueños e ilusiones y porque siempre estuviste y estarás orgulloso de mí.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>vi</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xviii</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Características de los carotenoides, función y biosíntesis</i> .....	1
1.2 <i>Regulación de la ruta carotenogénica en plantas</i> .....	6
1.3 <i>Regulación transcripcional de la ruta carotenogénica en plantas</i> .....	7
1.3.1 <i>Regulación transcripcional mediada por luz</i> .....	8
1.3.2 <i>Regulación transcripcional durante el desarrollo y maduración de frutos</i> .....	9
1.3.3 <i>Regulación transcripcional en respuesta a estrés abiótico</i> .....	11
1.3.4 <i>Regulación transcripcional mediada por retro-alimentación</i> .....	11
1.3.5 <i>Regulación transcripcional mediada por fitohormonas</i> .....	12
1.4 <i>Regulación transcripcional de la ruta carotenogénica en zanahoria</i> .....	13
1.5 <i>Estudio de promotores carotenogénicos</i> .....	17
1.6 <i>Estrategia a utilizar</i> .....	19
1.7 <i>Hipótesis</i> .....	20
1.8 <i>Objetivo general</i> .....	20
1.9 <i>Objetivos específicos</i> .....	20
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
2.1 <i>Materiales Biológicos</i> .....	22
2.2 <i>Materiales de Biología Molecular y cultivo</i> .....	22
2.3 <i>Métodos de cultivo y transformación</i> .....	22
2.3.1 <i>Cultivos bacterianos de Escherichia coli Mach1 y de Agrobacterium tumefaciens</i> .....	22
2.3.2 <i>Preparación de células quimiocompetentes de A. tumefaciens</i> .....	23
2.3.3 <i>Transformación de células bacterianas quimiocompetentes</i> .....	24
2.3.4 <i>Cultivos y transformaciones vegetales</i> .....	25
2.3.4.1 <i>Cultivo, transformación y embriogénesis somática de Daucus carota</i> .....	25
2.3.4.2 <i>Cultivo, transformación y organogénesis somática de Nicotiana tabacum</i> .....	27
2.3.4.3 <i>Transformación transitoria de hojas de N. tabacum</i> .....	28
2.3.4.4 <i>Transformación transitoria de frutos de Solanum lycopersicum y Capsicum annum</i> ....	28
2.4 <i>Métodos de Biología Molecular</i> .....	29
2.4.1 <i>Construcciones genéticas</i> .....	29
2.4.1.1 <i>Clonación de los fragmentos de interés en el vector de entrada pCR<sup>8</sup></i> .....	29

2.4.1.2 Clonación de los fragmentos de interés en el vector de destinación pMDC111: Recombinación por tecnología Gateway® .....	30
2.4.2 Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos .....	33
2.4.2.1 Extracción de RNA de plantas .....	33
2.4.2.2 Purificación de RNA vegetal .....	33
2.4.2.3 Extracción de DNA genómico de plantas .....	34
2.4.2.4 Extracción de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> .....	35
2.4.3 Digestiones enzimáticas .....	35
2.4.4 Diseño de partidores .....	36
2.4.5 Electroforesis en geles de agarosa y purificación desde geles .....	36
2.4.6 Reacción en cadena de la polimerasa, PCR .....	37
2.4.6.1 RT-PCR.....	37
2.4.6.2 PCR convencional.....	38
2.4.6.3 PCR de colonias.....	39
2.4.6.4 PCR cuantitativo en Tiempo Real.....	40
2.4.7 Identificación de las regiones promotoras de los genes <i>psy2</i> y <i>lcyb1</i> de <i>D. carota</i> mediante GenomeWalker .....	41
2.5 Análisis bioinformático de las regiones promotoras.....	43
2.6 Microscopía.....	45
2.7 Tratamientos hormonales.....	45
2.7.1 Tratamiento de plántulas de zanahoria silvestres con ABA, auxina y ácido giberélico.....	45
2.7.2 Tratamiento de hojas de tabaco con fitohormonas.....	47
2.8 Tratamiento de luz en hojas de tabaco transgénicas .....	47
2.9 Secuencias de acceso de los genes analizados en este trabajo .....	48
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
3.1 Identificación de las regiones promotoras de <i>lcyb1</i> y <i>psy2</i> .....	50
3.2 Análisis bioinformático de los promotores de los genes <i>lcyb1</i> y <i>psy2</i> de <i>D. carota</i> .....	55
3.3 Generación de las construcciones portadoras de las regiones promotoras de los genes <i>lcyb1</i> y <i>psy2</i> dirigiendo la expresión de un gen reportero ( <i>gfp</i> ).....	62
3.3.1 Clonación de los promotores parciales (PP) y mínimos (Pm) de los genes <i>lcyb1</i> y <i>psy2</i> en el vector de entrada pCR <sup>8</sup> .....	62
3.3.2 Generación de los vectores de destinación mediante recombinación por tecnología Gateway y transformación de <i>A. tumefaciens</i> con las construcciones de expresión.....	65
Una vez obtenidos los clones de entrada para las 4 construcciones generadas, estos se recombinaron con el vector pMDC111, con el fin de generar los vectores de destinación donde cada promotor queda dirigiendo la expresión del gen reportero <i>gfp</i> , para el análisis de la funcionalidad de los promotores en plantas. ....	65
3.4 Transformación transitoria de hojas de <i>N. tabacum</i> y frutos de <i>S. lycopersicum</i> y <i>C. annuum</i> con <i>A. tumefaciens</i> portadoras de las construcciones generadas.....	69



3.5	<i>Transformación estable de plantas con A. tumefaciens portadoras de las construcciones para los promotores de lcyb1 y psy2</i> .....	73
3.5.1	Transformación de explantes de <i>D. carota</i> .....	73
3.5.2	Transformación de explantes de <i>N. tabacum</i> .....	74
3.6	<i>Identificación de las plantas de tabaco transgénicas y determinación de la expresión basal de gfp.</i> .....	75
3.7	<i>Análisis de la expresión de los genes lcyb1, lcyb2, psy1 y psy2 en plántulas de D. carota silvestres tratadas con diferentes fitohormonas</i> .....	81
3.8	<i>Análisis de la actividad de los promotores parciales y mínimos de los genes lcyb1 y psy2 en plantas de N. tabacum tratadas con las hormonas ABA, 2,4-D y GA3 y durante un tratamiento de inducción por luz</i> .....	86
3.8.1	Efecto del ABA en la expresión de <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas portadoras de los promotores parciales y mínimos de <i>psy2</i> .....	86
3.8.2	Efecto del 2,4-D en la expresión de <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas portadoras de los promotores parciales y mínimos de <i>psy2</i> .....	92
3.8.3	Efecto del ABA en la expresión de <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas portadoras del promotor parcial de <i>lcyb1</i> .....	98
3.8.4	Efecto del GA3 en la expresión de <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas portadoras de los promotores parciales y mínimos de <i>lcyb1</i> .....	101
3.8.5	Inducción por luz de la expresión de <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas portadoras de los promotores parciales y mínimos de <i>psy2</i> y <i>lcyb1</i> .....	106
<b>DISCUSIÓN</b>	.....	<b>111</b>
4.1	<i>Identificación de las regiones promotoras de lcyb1 y psy2</i> .....	111
4.2	<i>Los promotores de los genes lcyb1 y psy2 de D. carota presentan varios elementos de respuesta a luz, fitohormonas y estrés</i> .....	114
4.3	<i>Los promotores parciales y mínimos de lcyb1 y psy2 son funcionales en plantas de tabaco transformadas transitoriamente</i> .....	120
4.4	<i>Los promotores parciales y mínimos de lcyb1 y psy2 son funcionales en plantas de tabaco transformadas establemente</i> .....	121
4.5	<i>Los genes lcyb1 y psy2 responden a tratamientos con fitohormonas en plántulas de zanahoria silvestres</i> .....	125
4.6	<i>Los promotores parciales de psy2 y lcyb1 se inducen por ABA en plantas de tabaco transgénicas</i> .....	128
4.7	<i>El promotor mínimo de psy2 se reprime por 2,4-D en plantas de tabaco transgénicas</i> .....	131
4.8	<i>Los promotores parciales y mínimos de lcyb1 se reprimen por GA3 en plantas de tabaco transgénicas</i> .....	132
4.9	<i>Los promotores parciales de psy2 y lcyb1 y el mínimo de lcyb1 son inducibles por luz en plantas de tabaco transgénicas</i> .....	134

<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>137</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>139</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>151</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Motivos regulatorios presentes en los promotores de los genes <i>lcyb1</i> y <i>psy2</i> .....	57
Tabla II: Resistencia a antibiótico de los vectores usados en este trabajo .....	151
Tabla III: Medios de cultivo de plantas de zanahoria ( <i>D.c.</i> ) y tabaco ( <i>N.t.</i> ).....	151
Tabla IV: Programas de PCR utilizados en este trabajo.....	152
Tabla V: Partidores utilizados durante este trabajo .....	154

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ruta de biosíntesis de los carotenoides en plantas.....	5
Figura 2: Niveles de carotenoides durante el desarrollo de las hojas y la raíz de la zanahoria. .	15
Figura 3: Expresión relativa de seis genes carotenogénicos durante el desarrollo de las hojas y la raíz modificada de la zanahoria .....	16
Figura 4: Esquema de los vectores usados en este trabajo y de la recombinación Gateway .....	32
Figura 5: Esquema de la identificación de promotores mediante GenomeWalker.....	49
Figura 6: Amplificación de las regiones promotoras de <i>lcyb1</i> y <i>psy2</i> mediante GenomeWalker	51
Figura 7: Secuencia de la primera región promotora identificada de <i>lcyb1</i> y <i>psy2</i> .....	52
Figura 8: Obtención del segundo fragmento del promotor de <i>lcyb1</i> .....	53
Figura 9: Secuencia de la segunda región promotora identificada de <i>lcyb1</i> .....	54
Figura 10: Secuencia de los promotores totales identificados para <i>lcyb1</i> y <i>psy2</i> .....	55
Figura 11: Distribución de los motivos regulatorios presentes en el promotor de <i>lcyb1</i> y <i>psy2</i>	59
Figura 12: Amplificación de los fragmentos parcial y mínimo del promotor de <i>lcyb1</i> .....	63
Figura 13: Amplificación de los fragmentos parcial y mínimo del promotor de <i>psy2</i> .....	65
Figura 14: Patrones de restricción de los clones pMDC111/promotor .....	67
Figura 15: PCR de colonias de <i>A. tumefaciens</i> transformadas con las construcciones promotor: <i>gfp</i> . .....	68
Figura 16: Expresión de <i>gfp</i> en hojas de tabaco y frutos de tomate y pimentón transformados transitoriamente con las construcciones promotor: <i>gfp</i> . .....	71
Figura 17: Microscopía de fluorescencia de hojas de tabaco transformadas transitoriamente con las construcciones promotor:: <i>gfp</i> .....	72
Figura 18: Obtención de plantas de zanahoria transgénicas para los promotores de <i>lcyb1</i> y <i>psy2</i> .....	74
Figura 19: Obtención de plantas de tabaco transgénicas para los promotores de <i>lcyb1</i> y <i>psy2</i> .	75
Figura 20: Identificación de las plantas de tabaco transgénicas para los promotores parciales de <i>lcyb1</i> y <i>psy2</i> .....	76

Figura 21: Identificación de las plantas de tabaco transgénicas para los promotores mínimos de <i>lcyb1</i> y <i>psy2</i> .....	77
Figura 22: Identificación de las plantas de tabaco transgénicas para el vector sin promotor pMDC111.....	77
Figura 23: Niveles de expresión basal de <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial y mínimo de <i>psy2</i> .....	79
Figura 24: Niveles de expresión basal de <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial y mínimo de <i>lcyb1</i> .....	81
Figura 25: Amplificación del gen <i>18S</i> desde cDNAs de zanahoria silvestres tratadas con ABA, 2,4-D y GA3.....	82
Figura 26: Efecto de las fitohormonas ABA, auxina y GA3 en los niveles de expresión de los genes <i>lcyb1</i> , <i>psy2</i> y <i>psy1</i> en zanahorias silvestres.....	85
Figura 27: Amplificación del gen <i>18S</i> a partir de cDNAs de hojas de tabacos transgénicos para el promotor parcial y mínimo de <i>psy2</i> tratadas con ABA.....	87
Figura 28: Niveles de expresión de <i>osmotin</i> y <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial de <i>psy2</i> tratadas con ABA.....	89
Figura 29: Niveles de expresión de <i>osmotin</i> y <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas para el promotor mínimo de <i>psy2</i> tratadas con ABA.....	90
Figura 30: Niveles promedio de expresión de <i>osmotin</i> y <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial y mínimo de <i>psy2</i> tratadas con ABA.....	91
Figura 31: Amplificación del gen <i>18S</i> a partir de cDNAs de hojas de tabacos transgénicos para el promotor parcial y mínimo de <i>psy2</i> tratadas con 2,4-D.....	92
Figura 32: Niveles de expresión de <i>parC</i> y <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial de <i>psy2</i> tratadas con 2,4-D.....	95
Figura 33: Niveles de expresión de <i>parC</i> y <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas para el promotor mínimo de <i>psy2</i> tratadas con 2,4-D.....	96
Figura 34: Niveles promedio de expresión de <i>parC</i> y <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial y mínimo de <i>psy2</i> tratadas con 2,4-D.....	97
Figura 35: Amplificación del gen <i>18S</i> a partir de cDNAs de hojas de tabacos transgénicos para el promotor parcial de <i>lcyb1</i> tratadas con ABA.....	98

Figura 36: Niveles de expresión de <i>osmotin</i> y <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial de <i>lcyb1</i> tratadas con ABA.....	99
Figura 37: Niveles de expresión promedio de <i>osmotin</i> y <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial de <i>lcyb1</i> tratadas con ABA.....	100
Figura 38: Amplificación del gen <i>18S</i> a partir de cDNAs de hojas de tabacos transgénicos para el promotor parcial y mínimo de <i>lcyb1</i> tratadas con GA3 .....	101
Figura 39: Niveles de expresión de <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial de <i>lcyb1</i> tratadas con GA3 .....	103
Figura 40: Niveles de expresión de <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas para el promotor mínimo de <i>lcyb1</i> tratadas con GA3 .....	104
Figura 41: Niveles de expresión promedio de <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial y mínimo de <i>lcyb1</i> tratadas con GA3 .....	105
Figura 42: Amplificación del gen <i>18S</i> a partir de cDNAs de hojas de tabacos transgénicos para el promotor parcial y mínimo de <i>psy2</i> y <i>lcyb1</i> inducidos por luz .....	106
Figura 43: Niveles de expresión de <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial y mínimo de <i>psy2</i> luego de un tratamiento de inducción por luz.....	109
Figura 44: Niveles de expresión de <i>gfp</i> en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial y mínimo de <i>lcyb1</i> luego de un tratamiento de inducción por luz.....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 2,4-D : Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- 5'NTR : Región no traducible en el extremo 5'
- ABA : Ácido Abscísico
- BLASTn : Herramienta de alineamiento básico local de nucleótidos
- cDNA : Ácido desoxirribonucleico copia
- Ct : Ciclo umbral por sobre la fluorescencia basal
- CTAB : Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- DNA : Ácido desoxirribonucleico
- DNasa : Desoxi-ribonucleasa
- dNTP : Desoxinucleótido trifosfato
- D.O. : Densidad Óptica
- GA3 : Ácido giberélico
- Kb : kilobase
- Medio LB : Medio Luria Bertani
- pb : pares de bases
- PCR : Reacción en cadena de la Polimerasa
- RNA : Ácido ribonucleico
- RNAm : Ácido ribonucleico mensajero
- RNasa : Ribonucleasa
- RT : Transcripción Reversa o transcriptasa reversa
- uL : microlitro

## RESUMEN

Los carotenoides son compuestos lipídicos isoprenoides coloreados sintetizados por todos los organismos fotosintéticos y también por algunas bacterias y hongos. Estos son esenciales en la fisiología vegetal, principalmente por sus funciones durante la fotosíntesis, la fotoprotección y la síntesis de hormonas. En animales, también son indispensables debido a su actividad antioxidante y por ser precursores de la vitamina A. La ruta de síntesis de estos compuestos se encuentra bien caracterizada y se han identificado las enzimas esenciales que participan en ella. Sin embargo, la regulación de esta ruta en plantas no se comprende aún a cabalidad. Actualmente, se sabe que el principal mecanismo regulatorio ocurre a nivel transcripcional, donde factores activadores como la luz y el desarrollo tienen un efecto directo en la activación de la expresión de los genes carotenogénicos, como el gen *psy*, uno de los más importantes puntos de regulación en la ruta.

*Daucus carota* (zanahoria) es una hortaliza que acumula elevados niveles de carotenoides, principalmente  $\beta$ -caroteno, durante el desarrollo de su raíz modificada en oscuridad. En este órgano, la regulación de la ruta carotenogénica ocurriría en parte a nivel transcripcional, siendo el gen *lcyb1* el que aumenta mayormente su expresión durante el desarrollo. Por otra parte, de los genes parálogos *psy1* y *psy2* presentes en esta planta, el gen *psy2* estaría asociado mayormente a la carotenogenesis en la raíz y en etapas tempranas del desarrollo de las hojas.

Considerando las evidencias de regulación a nivel transcripcional de esta ruta en zanahoria, durante este trabajo se identificó y evaluó los promotores de los genes



*psy2* y *lcyb1*. Se logró identificar y clonar regiones regulatorias de 769 pb para el promotor de *psy2* y de 1.057 pb del promotor de *lcyb1*. Ambas regiones presentaron numerosos motivos regulatorios de respuesta a luz, así como otros de respuesta a estrés abiótico y fitohormonas (principalmente ABA, auxinas y giberelinas).

Los promotores obtenidos fueron divididos en dos fragmentos (promotor parcial y promotor mínimo) y fusionados al gen reportero GFP con el fin de caracterizar su funcionalidad en la planta modelo *N. tabacum*. En plantas de tabaco transgénicas, el promotor parcial de *lcyb1* presentó una actividad mucho mayor (más de 20 veces) que la del promotor mínimo de este gen, mientras que el promotor parcial de *psy2* presentó una actividad basal levemente mayor que el mínimo.

Determinamos que en plántulas de zanahoria silvestre, el gen *psy2* se indujo en presencia de ABA y se reprimió en presencia de la auxina 2,4-D, mientras que el gen *lcyb1* se indujo levemente en presencia de ABA y GA3. Considerando estos resultados, se evaluó el efecto de estas hormonas en las plantas de tabaco transgénicas que expresan GFP bajo el promotor de *psy2* y *lcyb*. Se concluyó que el promotor parcial de *psy2* se indujo por ABA y que el promotor mínimo de *psy2* se reprimió levemente en el tratamiento con ABA y la auxina 2,4-D. Esto se correlacionaría con los elementos regulatorios identificados en el promotor de *psy2* e indica que en plántulas de zanahoria, tanto la inducción del gen *psy2* mediada por ABA como su represión por 2,4-D, se deberían a una regulación de sus promotores en respuesta a estas hormonas.

Además, se determinó que en las plantas de tabaco transgénicas, el promotor parcial de *lcyb1* fue inducido por ABA, en correlación con los elementos de respuesta a

esta hormona presentes en su promotor y con la inducción de este gen en respuesta a ABA. Por otra parte, los promotores parcial y mínimo de *lcyb1* fueron reprimidos por GA3 en las plantas de tabaco transgénicas, a diferencia de lo obtenido en zanahorias silvestres tratadas con esta hormona. Por último, ambos promotores, al igual que el promotor parcial de *psy2*, fueron inducidos por luz. Esto último se correlaciona con los elementos de respuesta a este estímulo presentes en ellos.

## ABSTRACT

Carotenoids are lipidic isoprenoid coloured compounds synthesized by all photosynthetic organisms and also some bacteria and fungi. They are essential in plant physiology due to their roles in photosynthesis, photo-protection and hormone biosynthesis. In animals, they are essential due to their antioxidant properties and because they are precursors of vitamin A. The carotenogenic pathway is well known, as well as its essential enzymes. However, the regulation of this pathway in plants is not fully understood. To date it is known that the main regulatory mechanism takes place at the transcriptional level, where activating factors such as light and development have a direct impact in the induction of the expression of carotenogenic genes, such as *psy*, one of the key regulatory points of this route.

*Daucus carota* (carrot) accumulates high amounts of carotenoides, mainly  $\beta$ -carotene, during development of its modified root in darkness. In this organ, the regulation of the carotenogenic route takes place at least in part at the transcriptional level, with the *lcyb1* gene presenting the highest expression induction during development. Besides, of the two paralogs genes *psy1* and *psy2*, *psy2* would be associated to this pathway in carrot root and during early stages of leaves development.

Considering the transcriptional regulation of this pathway in carrot root, in this work we identified and characterized the promoter regions of *psy2* and *lcyb1*. We identified and cloned 769 and 1.057 bp of the *psy2* and *lcyb1* promoters, respectively. Both promoters contain several light response elements, as well as abiotic stress and fitohormones (ABA, auxin and gibberellins) response elements.

The promoters found were divided in two fragments (partial and minimum promoter) and fused to the reporter gene GFP to characterize their functionality in the model plant *N. tabacum*. In transgenic tobacco plants, the activity of the partial promoter of *lcyb1* was 20-fold higher than the activity of the minimum promoter. In the case of the *psy2* promoter, this difference was less pronounced, although significant.

We determined that in wild type carrot seedlings, the expression of *psy2* was induced by ABA and repressed by the auxin 2,4-D, while *lcyb1* expression was slightly increased in the presence of ABA and GA3. Considering these results, we evaluated the effect of these hormones in transgenic tobacco plants expressing GFP under the promoters of *psy2* and *lcyb1*. It was concluded that the partial promoter of *psy2*, but not the minimum, was induced by ABA, while the minimum promoter of this gene was repressed by 2,4-D. This correlates with the regulatory motifs found in this promoter and indicates that in carrot seedlings, the induction of *psy2* by ABA, and its repression by 2,4-D, will be probably due to a regulation of their promoters in response to these hormones. Besides, we found that in transgenic tobacco plants, the partial promoter of *lcyb1* was induced by ABA, in correlation with the ABA response elements found in its promoter and the induction of this gene mediated by ABA. Besides, the partial and minimum promoter of *lcyb1* were repressed by GA3 in transgenic tobacco plants, unlike the results obtained in wild type carrot seedlings treated with this hormone. Finally, these promoters, as well as the partial promoter of *psy2*, were induced by light. The latter is correlated with the light response elements identified in them.

## INTRODUCCIÓN

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

Los carotenoides son compuestos isoprenoides de naturaleza lipídica sintetizados por todos los organismos fotosintéticos (plantas y algas) y también por algunas bacterias y levaduras.

Estos derivan de la condensación de varias unidades isoprenicas 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 estos numerosos enlaces conjugados les confiere distintas propiedades, por ejemplo, la de actuar como cromóforos (parte de una molécula capaz de absorber luz y generar color). 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, les confieren a estos compuestos características particulares, como por ejemplo absorción de fotones en las longitudes de onda del azul, colores distintivos y actividad antioxidante. 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).

Actualmente, se han descrito más de 700 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.

En las plantas, se encuentran dentro de los plastidios, asociados a los complejos captadores de luz y a los centros de reacción en los cloroplastos activos, mientras que en los cloroplastos senescentes y en los cromoplastos se encuentran asociados a membranas, en cuerpos oleosos y en estructuras cristalinas dentro del estroma (Cunningham y Gantt, 1998; Vishnevetsky y col., 1999).

Estos pigmentos participan en procesos fisiológicos esenciales como la fotosíntesis, donde captan la energía lumínica de diversas longitudes de onda (rango espectral de absorción entre 400 y 500 nm) en los complejos captadores de luz de los fotosistemas, la cual es transferida a la clorofila a durante la fotosíntesis (Britton, 1995; Schmid, 2008). Debido a su estructura química, los carotenoides son capaces de: 1) resonar los electrones a lo largo de su esqueleto carbonado, lo cual permite la absorción de los electrones desapareados de las moléculas radicalarias (Britton, 1995; Britton, 1998; Nelson y col., 2003), 2) actuar en la disipación térmica del exceso nocivo de energía lumínica a través del ciclo de las xantófilas, además de generar un alto nivel de protección fotooxidativa contra los efectos del singlete de oxígeno, del radical superóxido y del triplete excitado de clorofila generado 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) y 3) ser precursores en la síntesis de la hormona ácido abscísico (ABA) y de las estrigolactonas.

El ABA participa en procesos vitales de la fisiología de las plantas, tales como el crecimiento y desarrollo, la dormancia de las semillas y la adaptación a distintos tipos de estrés ambiental, en especial a la sequía, frío y la elevada salinidad (Chen y col., 2008; Crozier y col., 2000), mientras que las estrigolactonas han sido asociadas al establecimiento de las relaciones simbióticas entre hongos y la rizósfera y

a la inhibición de las ramificaciones de brotes (Gomez-Roldan y col., 2008; Umehara y col., 2008, Pichersky, 2008).

Al ser pigmentos coloreados, 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.

En los animales, algunos carotenoides ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, criptoxantina) son convertidos a la vitamina A (retinol) luego de un clivaje molecular seguido de un proceso reductivo. 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). Adicionalmente, los carotenoides (por ejemplo el licopeno, la luteína y la zeaxantina) funcionan como poderosos antioxidantes, que previenen y reducen el daño celular. Por ello, han sido ligados a una reducción de las probabilidades de desarrollar ciertos tipos de cáncer, enfermedades degenerativas y vasculares y problemas visuales (Breimer, 1990; Esterbauer y col., 1992; Mayne, 1996; Rao y Rao, 2007; Snodderly, 1995; Tanumihardjo y Yang, 2005).

Dado que los animales son incapaces de sintetizar estos compuestos, deben ingerirlos en la dieta mediante el consumo de vegetales ricos en ellos, como la zanahoria.

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

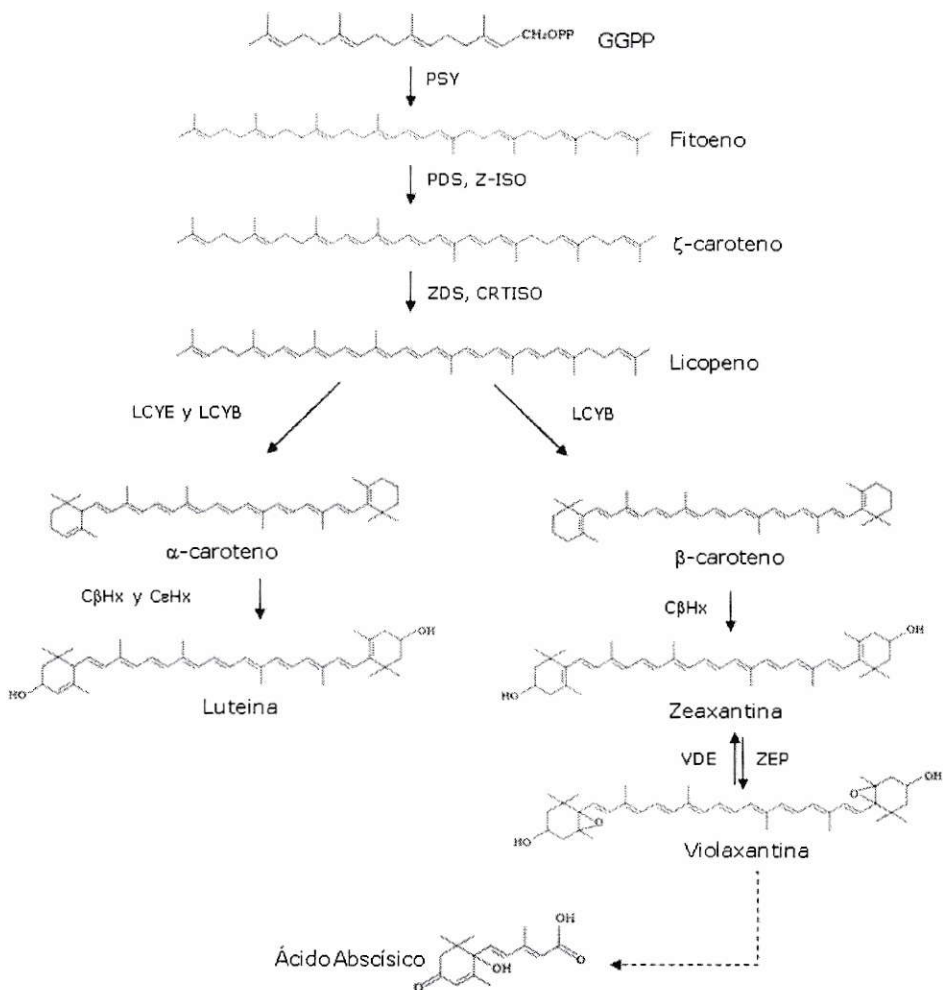
(Cunningham y Gantt, 1998; Cunningham, 2002; Howitt y Pogson, 2006), lo que ha permitido aumentar la síntesis de los carotenoides en diversos organismos, en especial en las plantas (Aluru y col., 2008; Davuluri y col., 2004; Diretto y col., 2007; Lamers y col., 2008; Shewmaker y col., 1999; Ye y col., 2000).

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 la fitoeno desaturasa (PDS) y por la  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS), con la finalidad de extender las series conjugadas de los dobles enlaces. El fitoeno sufre así cuatro desaturaciones, que resultan en la formación secuencial de fitoflueno,  $z$ -caroteno, neurosporeno y por último licopeno, de color rojo (Figura 1, Cunningham y Gantt, 1998). Junto con estas desaturaciones ocurren además isomerizaciones llevadas a cabo por las enzimas CRTISO y Z-ISO, las que permiten la formación de *all-trans*-licopeno, configuración estable y requerida para las subsiguientes ciclaciones.

Luego de la formación del licopeno, la ruta carotenogénica se divide en dos ramas principales: 1) que lleva a la síntesis de  $\beta$ -caroteno mediante la ciclación de ambos extremos del licopeno llevada a cabo por la enzima licopeno  $\beta$ -ciclase, LCYB, y 2) que lleva a la generación de  $\alpha$ -caroteno, a través de la ciclación de un extremo del licopeno mediante LCYB y del otro extremo mediante la enzima licopeno  $\epsilon$ -ciclase, LCYE (Cunningham y Gantt, 1998).



Luego, el  $\beta$ -caroteno es hidroxilado a zeaxantina, la cual es epoxidada a compuestos que generan finalmente el ácido abscísico (ABA), mientras que el  $\alpha$ -caroteno es hidroxilado para formar la luteína.



**Figura 1: Ruta de biosíntesis de los carotenoides en plantas.** Se ilustra el desarrollo de esta ruta metabólica desde la síntesis del primer carotenoide, el fitoeno, desde geranyl-geranyl-pirofosfato (GGPP), hasta la síntesis de la hormona ácido abscísico (ABA). PSY: fitoeno sintasa; PDS: fitoeno desaturasa; ZDS: z-caroteno desaturasa; CRTISO: isomerasa de carotenoides; Z-ISO: z-caroteno isomerasa; LCYB y LCYE, licopeno  $\beta$  y  $\epsilon$  ciclasas; C $\beta$ Hx y C $\epsilon$ Hx:  $\beta$  y  $\epsilon$  hidroxilasas; VDE: violaxantina de-epoxidasa; ZEP: zeaxantina epoxidasa. Esquema modificado a partir de Stange y col., 2008.

## 1.2 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).

Otros puntos de regulación ocurrirían a nivel 3) post-traducciona, por ejemplo, mediante la activación de la enzima PSY al unirse a la membrana tilacoidal durante la fotomorfogénesis en *Arabidopsis thaliana* (Welsch y col., 2000), e incluso a nivel epigenético, en la regulación de la transcripción del gen *crts* (Cazzonelli y col., 2009).

Considerando los puntos expuestos anteriormente, es posible señalar que esta ruta posee varios puntos de control. Sin embargo, el principal punto de regulación ocurre a nivel transcripcional, por lo que se describe con mayores detalles a continuación.

### **1.3 Regulación transcripcional de la ruta carotenogénica en plantas**

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.

### 1.3.1 Regulación transcripcional mediada por luz

La luz es el principal estímulo al cual responde la ruta carotenogénica particularmente durante la transición de etioplastos a cloroplastos (de-etiolación) y durante el desarrollo de frutos y flores (Bramley, 2002; Römer y Fraser, 2005).

La inducción por luz de los genes carotenogénicos está mediada por fotorreceptores, tales como el fitocromo, criptocromo y fototropinas (Briggs and Olney, 2001; Franklin y col., 2005; Briggs y col., 2007; Simkin y col., 2003; Woitsch y Römer, 2003). Por ejemplo, la inducción por luz del gen *psy* de *Arabidopsis thaliana* es mediada por el fitocromo A (Welsch y col., 2000, 2008) que promueve la unión del factor de transcripción HY5 a elementos de respuesta a luz (LREs) presentes en su promotor (von Lintig y col., 1997). Los principales LREs presentes en los promotores de los genes inducibles por luz corresponden a los elementos G-box (Particularmente el elemento G1: CACGAG y el elemento G2: CTCGAG) y al elemento ATCTA (Giuliano y col., 1988; von Lintig y col., 1997; Welsch y col., 2003). Los elementos G-box son reconocidos por los factores de transcripción HY5 (que promueven la transcripción) y por los factores PIF (que reprimen la transcripción; Ni y col., 1998; Zhu y col., 2000). Se sabe que los factores PIF son capaces de reprimir la expresión del gen *psy* en *Arabidopsis*, y que esta interacción desaparece en presencia de luz (Toledo-Ortiz y col., 2010). Por otra parte, el elemento ATCTA es reconocido en *Arabidopsis thaliana* por el factor de transcripción Rap2.2 (Welsch y col., 2007), el cual induce levemente la transcripción de los genes *psy* y *pds*, y por lo tanto los niveles de carotenoides, en este organismo (Welsch y col., 2007). El elemento ATCTA ha sido propuesto como un elemento capaz de generar una respuesta coordinada de la ruta carotenogénica y la fotosintética, ya que se encuentra en el promotor de varios de sus genes (*dxs* y *psy* de

*Arabidopsis*; *pds* de tomate y maíz; la proteína de unión a la clorofila (*cab*) de *Arabidopsis thaliana* y mostaza (*Sinapis alba*) y la plastocianina (*pc*) de arveja (*Pisum sativum*); Welsch y col. 2003, 2007).

El gen *psy2* de maíz sería también inducido a través de criptocromo (Li y col., 2008). Otros reportes indican que al de-etiolar plantas de tomate o *Arabidopsis thaliana* existe una inducción del gen *lcyb* respecto al gen *lcye*, lo que lleva a la inducción en la síntesis de xantofilas; en tabaco y pimentón (*C. annuum*), por medio de la luz blanca también se induce la expresión de genes involucrados en la síntesis de estos mismos compuestos (Woitsch y Römer, 2003, Simkin y col., 2003). De manera análoga, los genes *psy*, *pds*, *zds* y *lcyb* son reprimidos en pimentón durante tratamientos de oscuridad (Simkin y col., 2003).

Por otra parte, y en relación al importante papel que juegan los carotenoides en la captación de luz y en la protección foto-oxidativa, se ha reportado que la inducción de los genes carotenogénicos durante la de-etiolación se encuentra generalmente asociada a la inducción concomitante de genes asociados al aparato fotosintético y a la síntesis de clorofila (Woitsch y Römer, 2003), lo que podría estar mediado por el elemento ATCTA (Welsch y col., 2003, 2007).

### **1.3.2 Regulación transcripcional durante el desarrollo y maduración de frutos**

El modelo biológico clásico para estudiar la regulación de esta ruta durante la maduración de frutos es el tomate, aunque también se ha estudiado este proceso en otras plantas como papaya (*Carica papaya*, Skelton y col., 2006), damasco (*Prunus mume*, Kita y col., 2007) y cítricos (Kato y col., 2004; Alquezar y col., 2009). En tomate se ha observado que durante la maduración del fruto se produce una inducción en 2

genes tempranos de la ruta, *psy* y *pds*, y una represión de los genes *lcyb* y *lcye*, lo cual lleva a la acumulación de licopeno (Pecker y col., 1996; Ronen y col., 1999). En papaya roja, se ha observado que el gen *lcyb* presenta una mayor expresión en hojas y flores que en frutos durante la maduración, lo que se correlaciona con la acumulación de licopeno en los frutos de esta variedad (Skelton y col., 2006). En la maduración de un cultivar de damasco acumulador de carotenoides (*Prunus mume* Siebold & Zucc.), se determinó que el gen *psy* presenta una elevada expresión, al igual que genes río abajo (*lcyb*, *CβHx* ( $\beta$ -caroteno hidroxilasa) y *zep* (zeaxantina epoxidasa)), mientras que el gen *lcye* presenta una disminución en sus niveles de expresión, lo cual redirige la síntesis hacia la rama del  $\beta$ -caroteno. Por otra parte, se determinó que el etileno es capaz de inducir la expresión de *psy* y *lcyb*, por lo que sería necesario para elevar la acumulación de carotenoides durante la maduración del damasco (Kita y col., 2007). En pomelos del cultivar "Star Ruby", la elevada acumulación de licopeno se asoció a una disminución en la expresión del gen *lcyb2* (asociado a cromoplastos, de inducción durante la maduración de naranjas y responsable de la acumulación de  $\beta$ - $\beta$ -xantofilas) y del gen *CβHx* (Alquezar y col., 2009). De manera similar, durante la maduración de la mandarina "Satsuma" disminuyen los niveles de *lcye* y aumentan los de *psy*, *pds*, *zds*, *lcyb*, *CβHx* y *zep*, favoreciéndose la acumulación de carotenoides de la rama  $\beta$  (Kato y col., 2004). Finalmente, en zanahorias acumuladoras de diversos carotenoides se observó un aumento constante en la expresión de la mayoría de los genes carotenogénicos evaluados (*psy* (1 y 2), *pds*, *zds* (1 y 2), *lcye*, *lcyb1* y *zep*) en paralelo a la acumulación de carotenoides en zanahorias de color rojo (acumuladoras de licopeno) y de color amarillo (acumuladoras de luteína; Cloutault y col., 2008).

De todos los ejemplos anteriores es posible concluir que la regulación a nivel transcripcional es un importante mecanismo de control de la producción de carotenoides durante la maduración de los frutos que los acumulan.

### **1.3.3 Regulación transcripcional en respuesta a estrés abiótico**

Con respecto a este tipo de estímulos, todos los reportes se relacionan a la regulación de genes parálogos de *psy*. En maíz y arroz, la expresión del gen *psy3* es inducida por sal y sequía, y que esta inducción se correlaciona con un aumento en los niveles de ABA y en el flujo de los carotenoides (Li y col., 2008; Welsch y col., 2008), así como los genes *psy1* y *psy2* de yuca son inducidos en respuesta a salinidad y sequía (Arango y col., 2010).

### **1.3.4 Regulación transcripcional mediada por retro-alimentación**

Existen reportes de una regulación transcripcional mediada por retroalimentación, tanto negativa como positiva. Se sabe que la inhibición de la ciclación del licopeno en tomate lleva a la inducción de la expresión de dos genes río arriba, *psy1* y *pds* (Giuliano y col., 1993; Corona y col., 1996). Además, la acumulación de fitoeno en la 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).

Con respecto a la retro-alimentación positiva, se ha demostrado que el ABA es capaz de inducir la expresión del gen *psy3* de maíz y arroz, aumentando así sus niveles, y podría tener un rol en la inducción de los carotenoides en respuesta al estrés abiótico (Welsch y col., 2008; Li y col., 2008).

### 1.3.5 Regulación transcripcional mediada por fitohormonas

Con respecto a las hormonas, se ha reportado por ejemplo que durante la maduración de la uvas existen elevados niveles de ABA que reprimen varios genes relacionados a procesos fotosintéticos, ejerciendo así un mecanismo de retroalimentación positiva al inducir la expresión del gen carotenogénico *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenasa (nced)* que codifica para la enzima NCED, directamente involucrada en la síntesis de esta hormona (Koyama y col., 2010). La inducción de NCED mediada por ABA se ha demostrado también en maní, donde la acumulación de esta hormona inhibe el desarrollo de raíces laterales (Guo y col., 2009). En *Arabidopsis thaliana*, el ABA también inhibe la formación de raíces laterales, un efecto contrario al de auxina (Brady y col., 2003). Por otra parte, en plantas de *Galium aparine* ("cleavers") a las que se les aplica la auxina IAA se induce directamente la expresión del gen *nced* y además se fomenta la síntesis de etileno, el cual a su vez induce la acumulación de ABA, posiblemente a través de modificaciones post-transcripcionales del gen *nced* (Kraft y col., 2007). Por otra parte, se ha demostrado que la auxina sintética 2,4-D es capaz también de inducir el gen *nced* y genes involucrados en la síntesis de etileno (Raghavan y col., 2006). Además, las auxinas interactúan con las estrigolactonas (hormonas derivadas de la ruta carotenogénica) en el control de la ramificación de brotes (Hayward y col., 2009).

La biosíntesis de ABA mediada por etileno tiene un rol importante en el desarrollo vegetal, generando inhibición del crecimiento, entre otros efectos (Grossmann y Hansen, 2001). Con respecto a lo anterior, también existe una regulación inversa entre ambas hormonas durante la maduración de tomate, donde la acumulación de ABA (mediada a su vez por la expresión del gen *nced*) es capaz de inducir genes de la



biosíntesis de etileno (*acs* y *aco*), induciendo de esta forma el proceso de maduración de este fruto (Zhang y col., 2009).

De lo anterior es posible concluir que diversas hormonas, tales como ABA, etileno y auxinas son capaces de afectar la ruta carotenogénica en diversos puntos, alterando el desarrollo vegetal y la maduración de frutos, entre otros.

#### **1.4 Regulación transcripcional de la ruta carotenogénica en zanahoria**

En la zanahoria, nuestro modelo de estudio, existe una acumulación de carotenoides, en especial  $\beta$ -caroteno, durante el desarrollo en oscuridad de su raíz modificada (Figura 2). Con el fin de establecer los mecanismos regulatorios que controlan la síntesis de estos compuestos en este órgano, y considerando la importancia de la regulación transcripcional de la ruta carotenogénica en otros organismos vegetales, recientemente se llevó a cabo un estudio para determinar los patrones de expresión de seis genes de esta ruta directamente involucrados en la síntesis de  $\beta$ -caroteno durante el desarrollo en oscuridad y en luz de este órgano, y también durante el desarrollo de sus hojas (Fuentes, 2009).

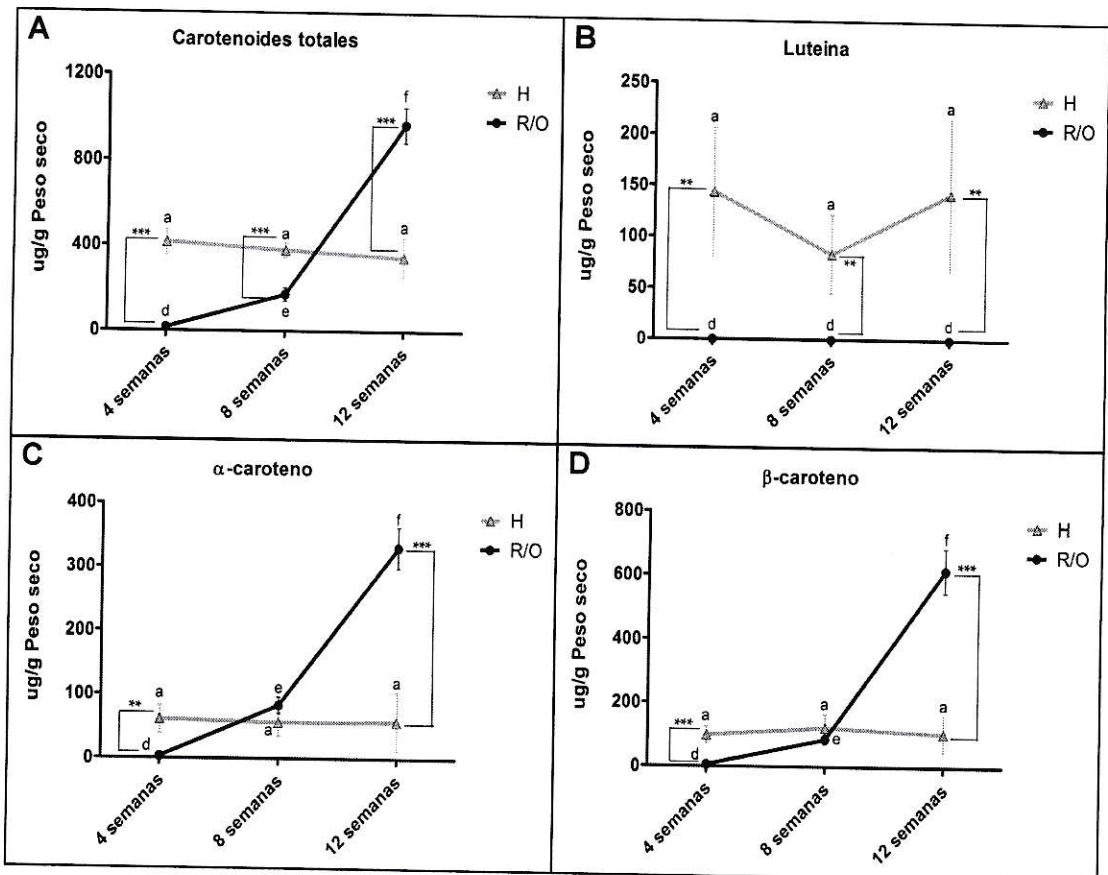
En la figura 3 es posible observar el resultado de este análisis. Primeramente, se observa que la expresión de todos los genes analizados es mucho más alta en las hojas que en la raíz en la mayoría de los estados de desarrollo analizados. Esto puede deberse a la mayor tasa de recambio de estos compuestos en los órganos foliares (Beisel y col., 2010). También es posible observar que la expresión de los genes *psy1*, *pds*, *zds2* y *lcyb1* aumenta con el desarrollo de las hojas, lo cual refuerza el punto anterior, debido a que en hojas maduras es donde la tasa fotosintética es mayor. Sin embargo, el gen *psy2* disminuye su expresión durante el desarrollo de las hojas, al

igual que el gen *zds1*, lo cual da indicios de la especialización de los genes parálogos *psy1* y *psy2*, y *zds1* y *zds2*. Es importante destacar además, que el gen *lcyb1* fue el que presentó el mayor aumento de expresión durante el desarrollo, de 16 veces entre la cuarta y décimasegunda semana.

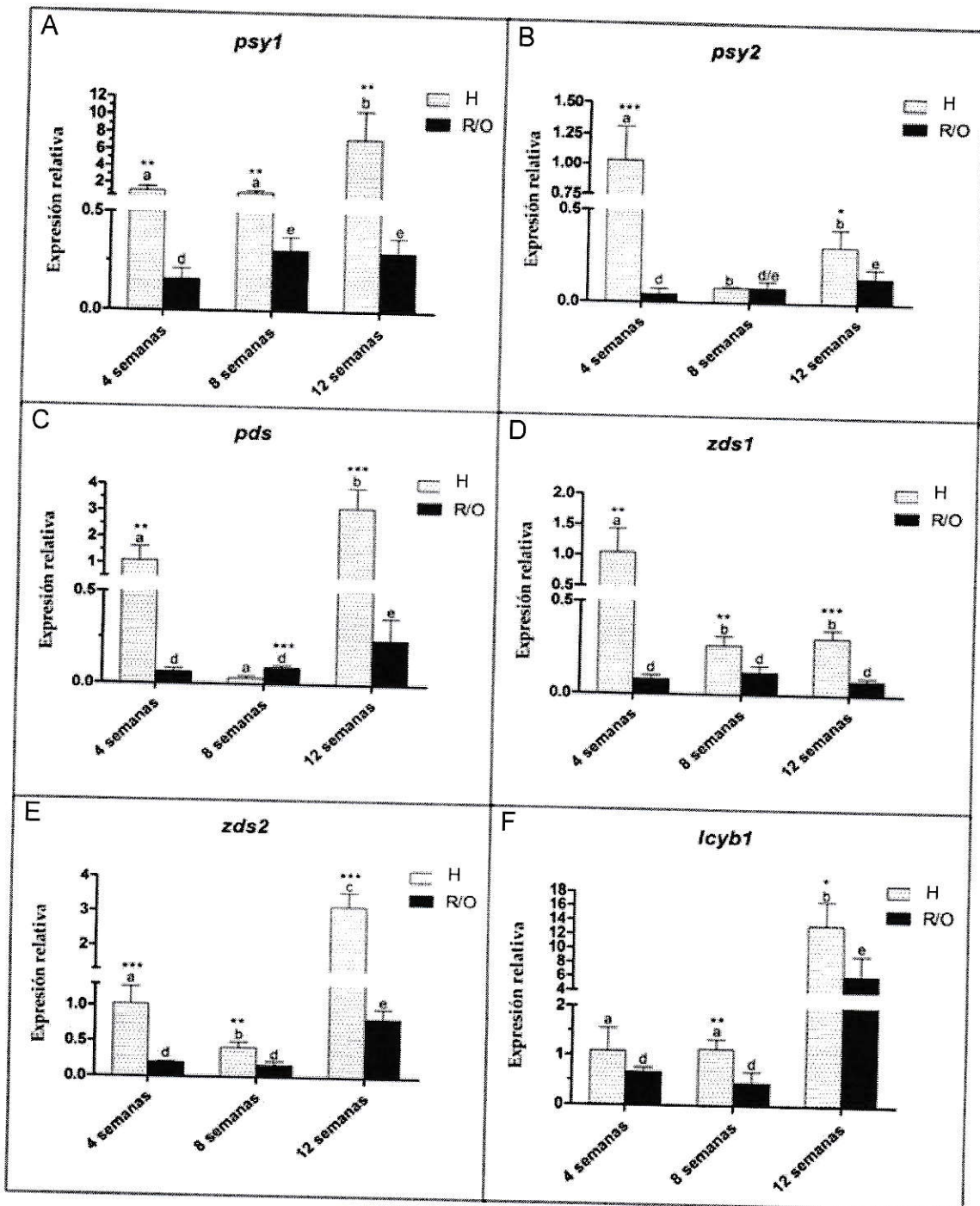
De igual manera, todos los genes carotenogénicos, excepto *zds1*, aumentan durante el desarrollo de la raíz modificada, en paralelo con un aumento de los niveles de carotenoides (Figura 3). Nuevamente, el gen *lcyb1* es el que presenta el mayor aumento, correlacionándose directamente con los altos niveles de  $\beta$ -caroteno acumulados en la raíz (Figura 2), lo que evidenciaría una regulación transcripcional de esta ruta en la raíz de zanahoria, en donde podría participar algún factor asociado al desarrollo de los cromoplastos capaz de activar los genes carotenogénicos, como fue propuesto para la activación del gen *pds* en tomate (Corona y col., 1996)

De este análisis es importante destacar que el gen *lcyb1* es un candidato importante para evaluar sus mecanismos regulatorios, debido a 1) su elevado aumento de expresión durante el desarrollo tanto de las hojas en presencia de luz como de la raíz modificada en oscuridad (Figura 3), y 2) a que es el gen directamente involucrado en la síntesis de  $\beta$ -caroteno, el principal carotenoide acumulado en la raíz modificada de zanahoria (Figura 2). Por otra parte, el gen *psy* sería el otro blanco importante de evaluar en esta planta debido a que se ha reportado que es el gen clave en la regulación de esta ruta en varios modelos vegetales. De los dos genes *psy* parálogos presentes en zanahoria, el gen *psy2* estaría asociado a la carotenogénesis en la raíz modificada, ya que presenta un aumento levemente mayor en su expresión entre la cuarta y décimasegunda semana del desarrollo de la raíz que el gen *psy1*, y además este último estaría más relacionado a la carotenogénesis en las hojas maduras, por lo

que sería el segundo gen candidato para evaluar los factores que regulan su expresión en esta planta.



**Figura 2: Niveles de carotenoides durante el desarrollo de las hojas y la raíz de la zanahoria.** Diferentes letras (a, b, c; d, e, f) indican diferencias significativas durante diferentes estados de desarrollo para las hojas (H) y la raíz (R/O), respectivamente, determinado por ANOVA de una vía y post-test de Tukey,  $p < 0,05$ . Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los dos órganos en un mismo estado de desarrollo, determinado por Test de T no pareado de dos colas. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Gráfico extraído de Fuentes y col., 2011 (en revisión).



**Figura 3: Expresión relativa de seis genes carotenogénicos durante el desarrollo de las hojas y la raíz modificada de la zanahoria. A-F: genes *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1*, *zds2* y *lcyb1*. Diferentes letras (a, b, c; d, e, f) indican diferencias significativas determinadas durante diferentes estados de desarrollo para las hojas (H) y la raíz modificada (R/O), determinadas por ANOVA de una vía y post-test de Tukey,  $p < 0,05$ . Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los dos órganos en un mismo estado de desarrollo, determinado por Test de T no pareado de dos colas. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Gráfico extraído de Fuentes y col., 2011 (en revisión).**

## 1.5 Estudio de promotores carotenogénicos

Hasta la fecha existen muy pocos reportes del estudio de promotores carotenogénicos en plantas. El primero de ellos, realizado en el año 1996, corresponde al estudio del promotor del gen *pds* de tomate (Corona y col., 1996). Dos kb de este promotor (1,5 kb de promotor mas 0,5 kb de la región 5' no traducible (5'NTR)) fueron clonadas dirigiendo la expresión del gen reportero *gus* y las construcciones transformadas establemente en tomate y tabaco. En ambos sistemas, el promotor fue capaz de dirigir la expresión de *gus* en respuesta al desarrollo. En tomate, se encontró una mayor expresión de *GUS* en órganos formadores de cromoplastos (pétalos, anteras y fruto), pero no así en tabaco. Además, las plantas de tabaco transgénicas tratadas con inhibidores de la síntesis de carotenoides (norfluorazon, que inhibe la enzima PDS y CPTA, que inhibe el paso de ciclación del licopeno) presentaron una inducción del promotor de *pds*, lo que sugeriría una regulación por producto final (Corona y col., 1996).

El segundo estudio de un promotor carotenogénico fue realizado por Welsch y col. (2003), para el promotor del gen *psy* de *Arabidopsis thaliana*. En este caso se analizó un promotor de 1,7 kb (incluida la región 5' NTR) y deleciones del mismo. Se comprobó que el promotor completo posee actividad basal en oscuridad, sin embargo, la expresión del gen se induce fuertemente en distintos tipos de luz. Análisis de la secuencia permitieron determinar que la respuesta a luz está mediada por elementos regulatorios en la región próxima a la caja TATA del promotor (posición -300) por elementos de respuesta a luz tipo cajas G. Además, una región del promotor distal a la caja TATA fue determinada como responsable de conferir una elevada actividad basal, no modulada por los diferentes tipos de luz. Se determinó que un motivo ATCTA

(también presente en los promotores de otros genes carotenogénicos, genes de la síntesis de tocoferoles y asociados a la fotosíntesis) en repetidos en la región alrededor de -800 era responsable de la alta actividad basal de este promotor.

En el año 2004 Thompson y col. analizan el promotor del gen *nced* del tomate, gen responsable directamente de la síntesis de ABA, encontrando cinco elementos de respuesta a etileno, lo que respalda la inducción de este gen mediada por esta hormona (Grossmann y Hansen, 2001; Grossmann, 2003).

Posteriormente, Welsch y col. (2008) correlacionaron la inducción por ABA del gen *psy3* de arroz (*Oryza sativa*) con la presencia de elementos de respuesta a esta hormona (ABRE en asociación al elemento CE), mientras que los promotores de los genes *psy1* y *psy2* presentan elementos I, IV y caja AE, involucrados en la respuesta a luz y ausentes en el promotor de *psy3*. Sin embargo, los 3 promotores, así como el del gen *psy* de *Arabidopsis*, comparten una caja G, que estaría relacionada a la activación por luz en todos ellos, excepto en el promotor de *psy3*, donde estaría involucrada en mediar la respuesta a ABA (la caja G comparte la secuencia central con el elemento ABRE).

Recientemente, se evaluó el promotor del gen *cyc-b* (licopeno  $\beta$ -ciclase asociada a cromoplastos) de *Solanum habrochaites* (tomate de color verde, Dalal y col., 2010). En este caso se clonó una secuencia de 908 pb (incluida la región 5'NTR), así como tres versiones truncadas de la misma. El promotor completo mostró una expresión basal en hojas, mientras que en las flores y frutos de los tomates transformantes, se indujo aprox. 5 veces. Además, se determinó que este promotor es regulado durante el desarrollo y que una delección desde el -436 hasta el codón de

inicio, presenta una mayor actividad y un patrón de expresión similar al promotor completo. De los elementos regulatorios identificados, los autores identificaron un elemento enhancer dentro del promotor completo como responsable de la actividad basal, así como 3 elementos GT-1 (de secuencia consenso GAAAAA), que conferirían inducción por luz. Sin embargo, no evaluaron directamente la funcionalidad de estos motivos.

El último reporte relativo al análisis de promotores carotenogénicos corresponde al análisis de los promotores de los genes *psy1* y *psy2* de melón (Qin y col., 2011). En ellos se encontraron varios elementos de respuesta a luz, ciclo circadiano y estrés abiótico, correspondientes con los previamente reportados para el promotor del gen *psy* de *Arabidopsis thaliana* (Welsch y col., 2003). Sin embargo, se encontraron también elementos de respuesta a giberelinas, que no habían sido previamente reportados y que representan un blanco interesante de estudio, ya que los carotenoides y las giberelinas comparten el precursor GGPP.

Los anteriores antecedentes sientan las bases para realizar un análisis de los promotores de los genes carotenogénicos *psy2* y *lcyb1* de zanahoria propuesto en este trabajo y además resaltan la importancia del mismo para lograr dilucidar la regulación de dos genes tan importantes para la carotenogenesis en la raíz modificada de zanahoria, contribuyendo de esta manera a un mayor entendimiento de los mecanismo que controlan esta ruta metabólica en las plantas.

## **1.6 Estrategia a utilizar**

Dado que el genoma de la zanahoria no está secuenciado, la estrategia a utilizar durante este trabajo será la identificación de la región promotora de los genes

*psy2* y *lcyb1* de zanahoria mediante amplificaciones río arriba de las secuencias de sus cDNAs (conocidas) mediante GenomeWalker. Posteriormente, estos fragmentos, así como una delección de cada uno (promotores mínimos), se clonaron en vectores dirigiendo la expresión del gen reportero *gfp* y se evaluó su funcionalidad en plantas de tabaco, determinando su respuesta a estímulos hormonales y de luz. Este estudio permite sentar las bases sobre la regulación de ciertas hormonas como ABA, GA3 y auxinas sobre la expresión de los genes *psy2* y *lcyb1* de *D. carota*. Finalmente, se correlacionaron las respuestas funcionales obtenidas con el análisis estructural del promotor, obtenido bioinformáticamente.

### **1.7 Hipótesis**

Las regiones promotoras de los genes *psy2* y *lcyb1* de *Daucus carota* L. poseen elementos regulatorios en *cis* relacionados con la activación génica mediada por luz y fitohormonas.

### **1.8 Objetivo general**

Identificar y caracterizar la estructura y función de los promotores de los genes *psy2* y *lcyb1* mediante transformación estable de plantas de *Nicotiana tabacum* y *Daucus carota*.

### **1.9 Objetivos específicos**

- 1) Identificación de las regiones promotoras de los genes *psy2* y *lcyb1* mediante GenomeWalker.
- 2) Análisis *in silico* de los promotores identificados.



- 3) Generación de las construcciones portadoras de las regiones promotoras parciales y mínimas de los genes *lcyb1* y *psy2* dirigiendo la expresión del gen reportero *gfp*.
- 4) Evaluación de la funcionalidad de los promotores y de su respuesta a diversos estímulos, tanto en plantas de *N. tabacum*, como *D. carota* transformadas establemente con los promotores parciales y mínimos de *psy2* y *lcyb1*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales Biológicos

Se utilizaron plantas de *Daucus carota* variedad Nantes, de *Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi NN y de *Arabidopsis thaliana* variedad Col0, todas cultivadas en invernadero acondicionado para tal propósito o bien *in vitro*. También se usaron frutos de *Solanum lycopersicum* y de *Capsicum annuum* adquiridos comercialmente.

Las cepas bacterianas utilizadas fueron células de *E. coli* quimiocompetentes Mach1<sup>TM</sup>-T1<sup>R</sup>, de genotipo: F<sup>-</sup>  $\phi$ 80/lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 hsdR( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ )  $\Delta$ recA1398 endA1 tonA (confiere resistencia al fago T1) (Invitrogen) y células de *Agrobacterium tumefaciens* quimiocompetentes, de genotipo GV3101: C58, plásmido Ti curado, Gen<sup>R</sup>, Rif<sup>R</sup>.

### 2.2 Materiales de Biología Molecular y cultivo

Se utilizaron reactivos de la calidad apropiada para biología molecular y cultivo celular de bacterias y plantas, de marcas tales como Fermentas, Bioline, Stratagene, Merck, Invitrogen, Promega, Axygen, Sigma-Aldrich y Phyto Technology Laboratories.

### 2.3 Métodos de cultivo y transformación

#### 2.3.1 Cultivos bacterianos de *Escherichia coli* Mach1 y de *Agrobacterium tumefaciens*

Los cultivos de *E. coli* Mach1 se realizaron inoculando alícuotas de estas células en medio LB líquido (Tryptona 1% p/v, NaCl 0.8% p/v, Extracto de levadura 0,5% p/v) suplementado con el antibiótico de selección correspondiente, de acuerdo al

plásmido introducido (Tabla I) y mantenido durante 12 horas a 37°C a 200rpm, o bien en placas de Petri con medio LB sólido (medio LB líquido suplementado con Agar-agar 1,6 %), también suplementado con el antibiótico de selección adecuado, durante 12 horas a 37°C.

Células de *A. tumefaciens* se cultivaron en medio LB líquido suplementado con rifampicina 10 mg/L (permite la selección cromosómica de *A. tumefaciens* GV3101) y gentamicina 50 mg/L (permite la selección del plásmido Ti contenido en la cepa de *A. tumefaciens* GV3101), además de un tercer antibiótico de selección del plásmido de interés (Tabla I), durante 20 horas a 28°C.

En ambos casos, el almacenamiento de alícuotas celulares se llevó a cabo a -80°C, en una mezcla de 500 uL de cada cultivo con 300 uL de glicerol 80% estéril.

### **2.3.2 Preparación de células quimiocompetentes de *A. tumefaciens***

Una alícuota de células de *A. tumefaciens* GV3101 se cultivó en medio LB líquido suplementado con rifampicina 10 mg/L y gentamicina 50 mg/L hasta llegar a una D.O.<sub>600nm</sub>: 0,5. Luego de 10 min. en hielo, el cultivo se centrifugó a 4°C durante 20 min. a 3000xg, se eliminó el sobrenadante y el precipitado de células fue resuspendido suavemente en 1 mL de una solución estéril de CaCl<sub>2</sub> 20 mM. Las células quimiocompetentes se almacenaron en alícuotas de 100 uL a -80°C en 30% glicerol hasta su uso.

### 2.3.3 Transformación de células bacterianas quimiocompetentes

La transformación de células de *E. coli* Mach1 (Invitrogen) y de *A. tumefaciens* competentes se llevó a cabo mediante semipermeabilización de su membrana a través de un golpe térmico.

Una alícuota de 50 uL de células de *E. coli* Mach1 se mezcló con 6 uL de una reacción de ligación en pCR<sup>®</sup>8 (sección 2.4.1.1) o 10 uL de una reacción de recombinación en pMDC111 (sección 2.4.1.2). La muestra se incubó durante 30 min. en hielo, luego durante 45 segundos a 42°C y luego se depositó en hielo; a los 2 min. se mezcló con 250uL de medio SOC (Tryptona 2%, Extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM) y se incubó durante 1 hora a 37°C con una agitación de 200 rpm. Una alícuota de 50 uL se sembró en una placa de LB sólido (Tryptona 1% p/v, Extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 0,8% p/v, Agar-agar 1,6 % p/v) suplementada con el antibiótico de selección adecuado (Tabla I) e incubada durante 12-16 horas en una estufa a 37°C.

Para la transformación de *A. tumefaciens*, una alícuota de 100 uL descongelada en hielo se mezcló con 300-500 ng del vector de interés. Esta mezcla se sometió a un golpe de frío sumergiéndola durante 5 min. en N<sub>2</sub> líquido para luego permitir su descongelamiento durante 15 min. a temperatura ambiente. La mezcla fue incubada en 1 mL de LB líquido a 28°C durante 6 horas. Luego, la mezcla fue centrifugada durante 5 min. a 6000xg, se eliminó el sobrenadante y el precipitado de células se resuspendió en 100 uL de medio LB líquido. Las células resuspendidas se sembraron en una placa Petri con medio LB sólido suplementado con rifampicina 10 mg/L, gentamicina 50 mg/L

y el antibiótico de selección del vector incorporado (Tabla I), y se crecieron a 28°C durante 36-48 horas.

### **2.3.4 Cultivos y transformaciones vegetales**

#### **2.3.4.1 Cultivo, transformación y embriogénesis somática de *Daucus carota***

Para el cultivo *in vitro* de plántulas de *Daucus carota*, semillas comerciales de *D. carota* variedad Nantes fueron esterilizadas superficialmente durante 20 min. mediante agitación en una solución 2% del fungicida Captan (Anasac). Luego de tres enjuagues con agua estéril, las semillas fueron incubadas en agitación durante 1 hora en una solución de hipoclorito de sodio 2,62 %. Se enjuagaron 3 veces en agua estéril y secaron en papel absorbente estéril. Las semillas fueron depositadas en frascos con medio MS sólido (Medio MS, Murashige and Skoog, 1962) con vitaminas 0,44 %, sacarosa 2%, myo-inositol 0,01%, Agar-agar 0,7%, PPM 0,09% v/v, pH: 5,8) e incubadas en una cámara de cultivo de 16 horas luz a 22°C durante aproximadamente dos semanas.

La transformación de plántulas de zanahoria se realizó modificando el protocolo descrito por Chen y Punja (2002). Se preparó una suspensión de *A. tumefaciens* portadora del vector de interés a partir de un cultivo de noche de 50 mL de la bacteria, el cual fue centrifugado durante 5 min. a 6000xg y resuspendido en 20 mL de medio MS líquido (Medio MS con vitaminas 0,44 %, sacarosa 2%, myo-inositol 0,01%, pH: 5,8) suplementado con acetosiringona 200 µM. Esta suspensión se incubó en agitación a 28°C hasta llegar a una D.O.<sub>600nm</sub>: 0,6-0,8.

Por otra parte, y en esterilidad, se cortaron explantes de aproximadamente 1 cm de largo de hipocotilo y epicotilo de plántulas de zanahoria crecidas *in vitro* durante 2

semanas. Estos fueron incubados durante 10 min. con la suspensión de *A. tumefaciens*, secados en papel estéril y depositados en placas Petri con medio MS sólido. Las placas se incubaron en oscuridad a 22°C durante 48 horas. Luego, los explantes fueron retirados de las placas, lavados en agua estéril suplementada con PPM 0,09% v/v y cefotaxime 300 mg/L, secados en papel estéril y depositados en placas Petri con Medio Dc.I (Tabla II), donde se mantuvieron en oscuridad a 22°C durante 4-6 semanas para la inducción de tejido pre-embriogénico.

Los explantes inducidos se transfirieron a placas Petri con Medio Dc.II (Tabla II), donde se mantuvieron durante 4 a 6 semanas bajo fotoperíodo, hasta observarse la aparición de embriones inmaduros. Posteriormente, los explantes fueron transferidos a placas Petri con Medio Dc.III (Tabla II), en donde los embriones maduraron y elongaron hasta la generación de plántulas.

Finalmente, plántulas de 5 cm de alto con una raíz bien formada fueron transferidas a maceteros de 30 a 40 cm de profundidad con una mezcla de tierra de hoja: vermiculita: turba (1:1:1) y cultivadas en una cámara de cultivo a 22°C bajo fotoperíodo de 16 horas luz. Las plantas se mantuvieron durante 1 mes en un ambiente con alta humedad (90%) para luego aclimatarse lentamente a las condiciones de humedad del invernadero (70%). Las plantas fueron regadas 2 veces por semana con medio hidropónico 1x ( $\text{KNO}_3$  0,125 mM,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,15 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,075 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05 mM, KCl 5 uM,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  5 uM,  $\text{MnSO}_4$  1 uM,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  200 nM,  $\text{CuSO}_4$  150 nM,  $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si}$  10 uM, Fe/DTPA 10 uM, pH: 6) para favorecer su rápido crecimiento.

### **2.3.4.2 Cultivo, transformación y organogénesis somática de *Nicotiana tabacum***

La transformación de tabaco se llevó a cabo utilizando explantes de hojas completas provenientes de plántulas cultivadas *in vitro*. Para ello se esterilizaron semillas de tabaco en 10 ml de hipoclorito de sodio (5%) con una gota de Tritón X-100 en agitación durante 10 min. Luego, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se sembraron en frascos con medio MS sólido. Luego de 3 semanas se obtuvieron plantas del tamaño suficiente para recolectar las hojas para la realización del procedimiento de transformación estable. Las hojas se cortaron e incubaron durante 10 min. con una suspensión de *A. tumefaciens* en medio MS líquido preparada de igual manera que la detallada en el punto anterior (sección 2.3.4.1). Los explantes fueron luego secados con papel estéril e incubados durante 48 horas en placas Petri con Medio MS sólido, en oscuridad. Posteriormente los explantes se enjuagaron en agua estéril suplementada con PPM 0,09% v/v y cefotaxime 300 mg/L, se secaron en papel estéril y se depositaron en placas Petri con Medio Nt.I (Tabla II). Luego de 3-4 semanas de cultivo a 22°C y fotoperíodo de 16 horas luz, los explantes que presentaron la aparición de pequeñas plántulas fueron transferidos a Medio Nt.II (Tabla II), donde se mantuvieron entre 2-4 semanas más, para permitir la elongación de éstas.

Plántulas de entre 1 y 5 cm de longitud fueron transferidas a frascos con Medio Nt.III (Tabla II) para permitir su elongación y enraizamiento. Al enraizar, las plantas fueron trasplantadas a maceteros con una mezcla de tierra de hoja: vermiculita: turba (1:1:1). Inicialmente se mantuvieron en un ambiente con humedad alta y luego se aclimataron a la humedad ambiental del invernadero. Las plantas fueron regadas 2 veces por semana con medio hidropónico 1x (sección 2.3.4.1) para favorecer su crecimiento.

#### **2.3.4.3 Transformación transitoria de hojas de *N. tabacum***

Para la transformación transitoria de tabaco se utilizaron plantas adultas de *N. tabacum* silvestres cultivadas en medio hidropónico y suspensiones de *A. tumefaciens* con las construcciones de interés en medio MS líquido (sección 2.3.4.1). La entrada de la suspensión al tejido foliar se realizó por el anverso de cada hoja, previamente asperjada con agua para facilitar la apertura de sus estomas, utilizando una jeringa de 5 mL carente de aguja y presionando suave y firmemente hasta observar la infiltración de una amplia región de la hoja (Sparkes y col., 2006).

Las hojas infiltradas fueron adecuadamente rotuladas y las plantas mantenidas durante 3 a 4 días a 22-25°C en fotoperíodo de 16 horas, hasta la recolección del tejido.

#### **2.3.4.4 Transformación transitoria de frutos de *Solanum lycopersicum* y *Capsicum annuum***

Para la transformación transitoria de tomate (*Solanum lycopersicum*) y pimentón (*Capsicum annuum*) se escogieron frutos en estado inmaduro, con el fin de facilitar la infiltración de la suspensión de *Agrobacterium*. La suspensión de la bacteria se preparó centrifugando un cultivo de noche de *A. tumefaciens* portadora del vector de interés y resuspendiendo el precipitado de células en un medio de infiltración compuesto por MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MES 10 mM y acetosiringona 200 μM, pH: 5,6 hasta llegar a una D.O.<sub>600nm</sub>: 0,6-0,8. La suspensión se recogió con una jeringa de insulina de 50 uL y se inyectó en el pericarpo de los tomates y pimentones, en la región cercana al pedúnculo y en la base del fruto. La inyección se repitió en 6-8 regiones de cada fruto, incorporando aprox. 100 uL de suspensión en cada lugar.



Los frutos inyectados se mantuvieron en fotoperíodo de 16 horas luz a 22-25°C durante 3 a 4 días, para luego cosechar el tejido infiltrado (Spolaore y col., 2001).

## **2.4 Métodos de Biología Molecular**

### **2.4.1 Construcciones genéticas**

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

La clonación en vectores de entrada, como pCR<sup>®</sup>8, permite la amplificación de un fragmento de interés para su secuenciación y posterior clonación en el vector de destinación, el cual permite la evaluación en el organismo de interés. Durante este trabajo se utilizó el vector de entrada pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>, que cuenta con la enzima Topoisomerasa I covalentemente unida en la secuencia CCCTT del vector, favoreciendo la clonación de los productos de PCR que poseen una adenosina libre en cada extremo. Además, este vector cuenta con el gen *Spn<sup>R</sup>* de resistencia a espectinomicina, al igual que las regiones *attL1* y *attL2* flanqueando ambos extremos de la zona de clonación (Figura 4A). Estas regiones permiten el traspaso de los fragmentos clonados en este vector a diversos vectores de destinación mediante la tecnología Gateway<sup>®</sup>, basada en la recombinación homóloga.

Para la clonación de un fragmento de interés en el vector de entrada pCR<sup>®</sup>8, 0,5-4 uL del producto de PCR se mezclaron con 50 ng del vector de entrada pCR<sup>®</sup>8 y 1 uL de una solución salina (NaCl 1,2 M, MgCl<sub>2</sub> 0,06 M) en una mezcla de ligación de 6 uL. La mezcla de ligación se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas, tras lo cual fue transformada en células de *E. coli* Mach1 quimiocompetentes (sección 2.3.3)

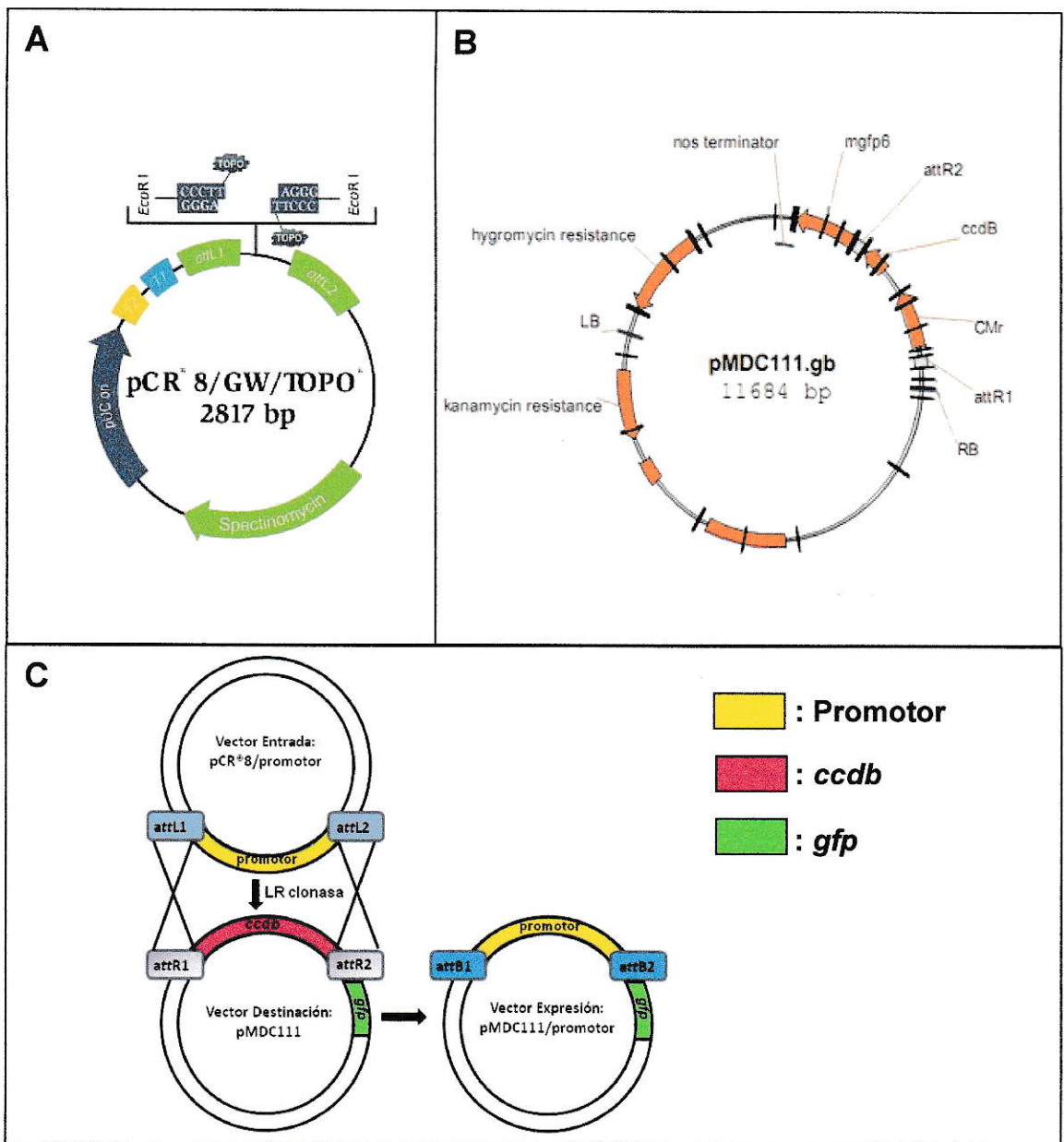
Los clones positivos seleccionados por PCR de colonia (sección 2.4.6.3) y digestión enzimática (sección 2.4.3) fueron secuenciados (Macrogen Corp.) y recombinados con el vector pMDC111 (en el caso de la clonación de promotores).

#### **2.4.1.2 Clonación de los fragmentos de interés en el vector de destinación**

##### **pMDC111: Recombinación por tecnología Gateway®**

Para el análisis de los promotores en los organismos vegetales de interés se escogió el vector de destinación pMDC111. Como se ilustra en la figura 4B, este vector posee los sitios de recombinación *attR1* y *attR2* flanqueando al gen letal de selección *ccdb*, río arriba del gen reportero *gfp* fusionado a una cola de histidina. Lo anterior se encuentra dentro de los bordes LB y RB, los cuales delimitan la zona que se insertará en el genoma de las plantas de interés. Dentro de estos bordes se encuentra además el gen *hptII*, el cual otorga resistencia a higromicina en plantas, mientras que el gen *nptII* (fuera de los bordes) otorga resistencia a kanamicina en bacterias (Figura 4B). La presencia de los sitios de recombinación en este vector permitieron el reemplazo del gen letal *ccdb* con los fragmentos promotores de interés previamente clonados en pCR®8, generándose construcciones del tipo promotor:: *gfp*.

La tecnología Gateway® se basa en la propiedad de recombinación sitio-específica del fago  $\lambda$  (Hartley y col., 2000), utilizando secuencias de recombinación homóloga presentes tanto en el vector de entrada (*attL1* y *attL2*) como en el vector de destinación (*attR1* y *attR2*). El fragmento en el vector de entrada se clona entre ambos sitios *attL* y debe encontrarse en orientación sentido respecto de *attL1*. Como se ilustra en la figura 4C, las regiones *attL1* y *attL2* del vector de entrada recombinan específicamente con las regiones *attR1* y *attR2*, respectivamente, lográndose el reemplazo del gen letal *ccdb* por el fragmento promotor de interés contenido en el



**Figura 4: Esquema de los vectores usados en este trabajo y de la recombinación Gateway.** A: pCR<sup>®</sup>8. B: pMDC111. C: esquema de la recombinación homóloga. *attL1* y *attL2*: sitios específicos en el vector pCR<sup>®</sup>8 de recombinación homóloga con los sitios *attR1* y *attR2* del vector pMDC111, respectivamente. *ccdB*: gen letal presente en el vector pMDC111 y que es reemplazado por el promotor de interés luego de la recombinación.

## **2.4.2 Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos**

### **2.4.2.1 Extracción de RNA de plantas**

La extracción de RNA vegetal se realizó utilizando el reactivo TRIzol® (Invitrogen), el cual permite la extracción fenólica del RNA para su posterior precipitación con isopropanol. El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 100 mg de cada tejido fueron pulverizados en morteros estériles, en presencia de nitrógeno líquido. Luego, se agregó 1 mL del reactivo TRIzol® y se traspasó el homogenizado a un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Se incubó la mezcla durante 5 min. a temperatura ambiente y luego se agregaron 200 uL de cloroformo y se agitó durante 15 segundos. Posteriormente, se incubó la mezcla durante 3 min. a temperatura ambiente, tras los cuales se centrifugó por 15 min. a 12.000xg a 4°C. El sobrenadante se rescató en un tubo limpio y se precipitó durante 10 min. a temperatura ambiente, utilizando 500 uL de isopropanol. Luego, se centrifugó durante 10 min. en las condiciones previas, se lavó el precipitado obtenido con 1 mL de etanol 75% (en agua libre de nucleasas), se resuspendió una vez seco en 20 uL de agua libre de RNasa y se procedió a verificar su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa. También se determinó su concentración y las razones 260/280 y 260/230, indicativas de la pureza del RNA con respecto a proteínas y a sales y solventes, respectivamente, en un espectrofotómetro NanoDrop™.

### **2.4.2.2 Purificación de RNA vegetal**

En los casos en que las razones 260/280 y 260/230 observadas en el NanoDrop™ fueron insuficientes para considerar que el RNA extraído era de la pureza adecuada para la síntesis del cDNA (razones  $\geq 1,8$ ), el RNA se limpió agregando un

volumen de cloroformo frío y agitando en vortex durante 5 min. Luego de centrifugar a 10.000xg durante 5 min. a 4°C, la fase acuosa superior (que contiene el RNA) se precipitó con 3 volúmenes de Etanol absoluto frío y 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M, pH: 4,8, durante 30 min. a -80°C. Luego de centrifugar a 10.000xg durante 30 min. a 4°C, el precipitado de RNA se lavó con 1 mL de etanol 75% en agua libre de nucleasas y una vez seco se resuspendió en 20 uL de agua libre de nucleasas y se procedió a verificar su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa y a medir su concentración y pureza mediante espectrofotómetro (NanoDrop™).

#### **2.4.2.3 Extracción de DNA genómico de plantas**

La extracción del DNA genómico de plantas se realizó siguiendo una modificación del método del CTAB, descrito inicialmente por Doyle y Doyle (1987). Aproximadamente 100 mg de tejido fresco fueron pulverizados en morteros en presencia de nitrógeno líquido y se les agregó 600 uL del tampón CTAB (Bromuro de cetil trimetilamonio al 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20mM y Tris 100 mM pH 8) precalentado a 60°C y 4 uL de β-mercaptoetanol. La mezcla se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se incubó con agitación ocasional durante 20 min. a 60°C. Posteriormente, se agregaron 400 uL adicionales de tampón CTAB y se procedió con la incubación durante 15 min. más a 70°C. Luego se adicionó 400 uL de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min. y la fase acuosa superior (donde se encuentra soluble el DNA) se precipitó con un volumen de isopropanol durante 10 min. a -80°C. Luego de una centrifugación a 13.000 rpm por 10 min. se obtuvo el precipitado de DNA, el cual fue lavado con etanol 75% (en agua libre de nucleasas), secado y resuspendido en 50 uL de agua libre de nucleasas. La

integridad y pureza del DNA obtenido se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa. Su concentración se determinó mediante espectrofotómetro (NanoDrop™).

#### **2.4.2.4 Extracción de DNA plasmidial de *E. coli***

La extracción de DNA plasmidial de las cepas transformadas de *E. coli* Mach1 se realizó mediante el kit Axyprep™ (Axygen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA obtenido se utilizó para verificar la presencia y orientación de los fragmentos de interés clonados mediante PCR y digestión enzimática y para verificar la secuencia de éstos. Para la secuenciación se utilizaron 3 clones de cada evento de transformación, los cuales fueron enviados a secuenciar a MacroGen (<http://www.macrogenusa.net/>), utilizando los partidores M13pUC R y M13pUC F, que flanquean los extremos de los fragmentos clonados en el vector pCR®8. En el caso de fragmentos de más de 800 pb se realizó también una tercera secuenciación utilizando un partidador interno específico del fragmento.

#### **2.4.3 Digestiones enzimáticas**

Se realizaron diversas reacciones de digestión enzimática a los DNA plasmidiales obtenidos, tanto de construcciones en el vector pCR®8 como de las construcciones en pMDC111. Las digestiones se realizaron para verificar la presencia y orientación correcta de los fragmentos clonados. Todas las reacciones se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones de cada enzima de restricción (Fermentas), en un baño termostático a 37°C durante aprox. 30 min. Las enzimas utilizadas y los fragmentos esperados se detallan en los resultados.

#### **2.4.4 Diseño de partidores**

Todos los partidores fueron diseñados manualmente o utilizando la herramienta bioinformática AmplifX y comprobados mediante el programa OligoAnalyzer para verificar los porcentajes de GC, la temperatura de disociación y descartar la presencia de homo y heterodímeros. Todos los partidores diseñados resultaron ser específicos para su gen blanco, según análisis bioinformático utilizando la herramienta BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Los partidores en antisentido para el GenomeWalker se diseñaron en la región 5' conocida de los genes *lcyb1* y *psy2* y los partidores antisentido para el segundo GenomeWalker de *lcyb1* se diseñaron dentro de las 53 pb de la región más hacia el extremo 5' de la región identificada mediante el primer GenomeWalker. Todos los partidores de GenomeWalker se diseñaron siguiendo las instrucciones del fabricante (Clontech). Los partidores para amplificar las regiones promotoras parciales (PP) y mínimas (Pm) de los genes *lcyb1* y *psy2* se diseñaron de acuerdo a los elementos regulatorios identificados tras el análisis bioinformático de los promotores.

#### **2.4.5 Electroforesis en geles de agarosa y purificación desde geles**

La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1-2% (según el tamaño esperado de las bandas) preparada en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) junto a un tampón de carga (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilen cyanol, 15% glicerol), en proporción 5:1, a 85-110 volts (dependiendo del tamaño de la cámara utilizada) durante aproximadamente 40 min. En el caso de muestras de RNAm, estas se sometieron a electroforesis durante 30 min. a 70 volts.

Posteriormente, los geles de agarosa se tiñeron durante 15 min. en una solución de Bromuro de etidio y visualizaron bajo luz UV en un transiluminador

(SYNGENE). Para clonar alguna de las bandas visualizadas, esta se escindió del gel utilizando un bisturí para ser purificada desde el gel mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **2.4.6 Reacción en cadena de la polimerasa, PCR**

### **2.4.6.1 RT-PCR**

Con el fin de generar la hebra de cDNA complementaria al RNAm se llevó a cabo la reacción de transcripción reversa (RT) utilizando la enzima RT-Improm II (Promega). Primeramente, el RNA se incubó con DNasa I para eliminar posibles remanentes de DNA genómico producto de la extracción. Para esto, 7 ug de RNA de alta pureza se incubaron con 50 U de DNasa I (Fermentas), 40 U de Inhibidor de RNasa (Ribolock, Fermentas) y 1x de tampón de la DNasal (Fermentas), en agua libre de nucleasas en un volumen de reacción de 20 uL, durante 35 min. en un baño termostático a 37°C. Luego, la reacción se detuvo agregando 2 uL de EDTA 25 mM e incubando a 65°C durante 10 min. con el fin de inactivar la DNasal.

Para la síntesis del cDNA, 9,5 uL del RNA tratado con DNasal (3 ug) se incubaron con 3 uL de oligo AP 10 mM (5'-CGCCACGCGTCGACTAGTAC TTTTTTTTTTTTTTTTTT -3') en tubos de 0,2 mL durante 5 min. a 70°C, en el programa de PCR "RT-PCR" (Tabla III). Luego, se detuvo el programa y los tubos se incubaron durante 5 min. en hielo, tras lo cual se les agregó a cada uno 37,5 uL de una mezcla de RT en agua libre de nucleasas (3 uL de RT Improm II (Promega), 40 U de Inhibidor de RNasa (Ribolock, Fermentas), dNTPs 600 nM (Biosforza o Fermentas), MgCl<sub>2</sub> 6,6 mM, 10 uL de tampón 5x de la RT Improm II (Promega)) y se continuó con el programa "RT-PCR". Finalmente se obtuvieron 50 uL de cada cDNA.



#### 2.4.6.2 PCR convencional

Las reacciones de PCR convencional se llevaron a cabo para amplificar los diversos genes (o los promotores de ellos) analizados en este estudio (promotor de *lcyb1*, promotor de *psy2*, *gfp*, *hptII*, *18S*, *ubi*, *Dcarg-1*, *osmotin*, *parC*, *psy1*, *psy2*, *lcyb1*, *lcyb2*, *gapB*) desde DNA genómico, para comprobar así la funcionalidad de los partidores diseñados y la presencia de los fragmentos de interés en las plantas transgénicas. Además, se utilizaron reacciones de PCR utilizando DNA genómico como blanco para amplificar las regiones promotoras parciales (PP) y mínimas (Pm) de los promotores de *lcyb1* y *psy2*, utilizando los partidores descritos en la Tabla IV. También se realizaron ampliaciones por PCR convencional desde cDNA para determinar la adecuada síntesis del cDNA amplificando genes *housekeeping* (*18S* y *ubiquitina*). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en mezclas de 25 uL en agua libre de nucleasas con 1 U de Taq DNA polimerasa (Biolasa, Bioline), 1x del tampón de la Taq DNA polimerasa (Bioline), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTPs 200 uM (Biosforza o Fermentas), 200 nM de partidore en sentido, 200 nM de partidore en antisentido y 0,5-2 uL de DNA o cDNA blanco. En todas las reacciones de PCR se realizó en paralelo una reacción de control negativo, carente de blanco, y cuando fue posible, se realizó también una reacción de control positivo, utilizando un blanco previamente verificado. En el caso de los PCR para la verificación de la correcta síntesis del cDNA, se incluyó además un control "sin RT" (s/RT) para cada uno. Este consistió en una reacción utilizando como blanco una cantidad equivalente de RNA proveniente desde el tratamiento con DNasa I, con el fin de asegurar la ausencia de DNA genómico en los cDNAs sintetizados. Todos los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis en geles de agarosa. El programa general de PCR convencional se

detalla en la Tabla III. La temperatura de hibridación ( $T^{\circ}H$ ) es específica para cada par de partidores y se ajustó de acuerdo a la temperatura de disociación teórica de cada partidador (TD, Tabla IV). El tiempo de extensión (paso 3, segmento 2) depende a su vez del tamaño del fragmento a amplificar y se estima en 1 minuto por cada 1.000 pb a amplificar. Variaciones en este protocolo se indican en los resultados.

#### **2.4.6.3 PCR de colonias**

Para determinar inicialmente las colonias de *E. coli* Mach1 o de *A. tumefaciens* transformantes se realizaron reacciones de PCR a partir de diluciones de las colonias formadas en las placas Petri con medio LB sólido luego de la transformación celular (sección 2.3.3). Para esto, se tomó cada colonia entera succionando con una pipeta P10 para luego resuspenderla en 30 uL de agua estéril. De esta suspensión se tomó 1 uL como blanco en una reacción de PCR y el resto se propagó en un cultivo de noche en medio LB líquido suplementado con los antibióticos adecuados para *E. coli* o *A. tumefaciens*. La reacción de PCR se llevó a cabo en una mezcla de 25 uL en agua libre de nucleasas con 1U de Paq DNA polimerasa (Stratagene), 1x del tampón de Paq DNA pol., 200 uM de dNTPs (Biosforza o Fermentas), 200 nM de partidador en sentido, 200 nM de partidador en antisentido y 1 uL de la suspensión bacteriana, siguiendo el programa "PCR de colonias" (Tabla III). En este caso, el tiempo de extensión (paso 3, segmento 2) se calculó en 1 kb por cada 30 segundos, debido a que la enzima Paq DNA pol. polimeriza a mayor velocidad que la Taq DNA polimerasa convencional. Los partidores utilizados fueron específicos para cada gen analizado y los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

#### 2.4.6.4 PCR cuantitativo en Tiempo Real

Para cuantificar los niveles de expresión de los genes de interés (*18S*, *ubiquitina*, *lcyb1*, *lcyb2*, *psy2*, *psy1*, *gfp*, *Dcarg-1*, *osmotin*, *parC* y *gapB*) en las distintas muestras a analizar 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) y utilizando el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene), para los análisis en las plantas silvestres de *D. carota* y transgénicas de *N. tabacum*. Todas las reacciones se llevaron a cabo en 20 uL totales, en agua libre de nucleasas, los que incluyeron 10 uL del Master Mix (que contiene la Taq DNA polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y la sonda SYBR green), 8 uL de agua libre de nucleasas, 300 nM del partidor en sentido, 300 nM del partidor en antisentido y 0,3 uL de una dilución 1:500 de la sonda pasiva ROX (incluida en el kit). El programa utilizado fue el de "qPCR" (Tabla IV), independiente los partidores utilizados. Todas las reacciones se llevaron a cabo en triplicado técnico, analizándose posteriormente las 2 réplicas de mayor similitud.

Dado que la sonda utilizada para la cuantificación fue SYBR® Green, luego de cada programa de amplificación se realizó una curva de disociación, consistente en la medición de la fluorescencia durante toda la denaturación y renaturación del producto de PCR (95°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos y 95°C por 30 segundos, Tabla IV). La presencia de una sola señal en esta curva en un gráfico de Fluorescencia vs. T° es indicativo de la especificidad de la reacción.

Todas las cuantificaciones realizadas en este estudio fueron relativas, es decir, comparadas con un "control" o calibrador, que corresponde a una condición de máxima

o mínima expresión, o bien que carece de expresión, como en el caso de las plantas silvestres. También se normalizaron los datos frente a los niveles de expresión de uno o más genes de expresión constante en las plantas (*housekeeping*), con el fin de eliminar posibles diferencias dadas por la concentración o calidad del cDNA analizado. Para el caso de la zanahoria, el normalizador utilizado fue el gen *ubiquitina*, mientras que para tabaco fue el gen *18S*.

El calibrador utilizado en cada caso se detalla en los resultados. Los cálculos de la expresión relativa, así como la determinación de la eficiencia (E) de los partidores, se realizaron de acuerdo a lo explicitado en Fuentes (2009), siguiendo las fórmulas de Pfaffl (2001):

$$1) \text{ Eficiencia de los partidores (E) } = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

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

#### **2.4.7 Identificación de las regiones promotoras de los genes *psy2* y *lcyb1* de *D. carota* mediante GenomeWalker**

La identificación de las regiones promotoras de los genes *lcyb1* y *psy2* de *D. carota* se llevó a cabo utilizando la técnica de GenomeWalker (Clontech). Esta técnica es apta para identificar secuencias río arriba o abajo de secuencias conocidas de DNA genómico o cDNAs (Siebert y col., 1995).

Se siguió el procedimiento descrito por el fabricante (Clontech), el cual se resume en la figura 5 y se detalla brevemente a continuación. Primeramente, se extrajo DNA genómico de zanahoria (sección 2.4.2.3), el cual fue cuantificado y purificado para ser luego digerido con las endonucleasas de extremos romos *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* y

*Stul*. Luego, los fragmentos de la digestión de cada enzima fueron ligados a una secuencia adaptadora (AP) incluida en el kit, con lo que se generaron cuatro bibliotecas de digestión (BD1, BD2, BD3 y BD4, con las enzimas *EcoRV*, *DraI*, *PvuII* y *Stul*, respectivamente). La primera amplificación por PCR (PCR primario) se llevó a cabo en una mezcla de 25 uL que contenía agua libre de nucleasas, 1X buffer de la Taq DNA polimerasa (Bioline), 2 U de Taq DNA polimerasa (Bioline), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 uM dNTPs, 200 nM partidor en sentido (AP1) de unión específica al adaptador AP y 200 nM de partidor primario en antisentido específico de cada gen (*GW1/cyb1* o *GW1psy2*, Tabla V). Se utilizó 1 uL de cada biblioteca de digestión como blanco en cada reacción independiente y el programa de PCR "GW1" (Tabla IV). Como control positivo se llevó a cabo una reacción simultánea utilizando la misma mezcla previamente detallada, pero usando el partidor PCP1 (Tabla V) como partidor antisentido y 1 uL de una biblioteca de digestión de DNA humano, incluida en el kit, como blanco. Para el PCR anidado se utilizó la misma mezcla previamente descrita, cambiando los partidores. En este caso se utilizaron los partidores en sentido AP2 (Tabla V), también de unión específica al AP y río abajo del partidor AP1, con 10 pares de bases sobrelapadas entre ambos y un partidor anidado en antisentido específico de cada gen, ubicado río arriba del partidor primario (*GW2/cyb1* o *GW2psy2*, Tabla V). Se utilizó 1 uL de una dilución 1/50 del PCR primario como blanco y el programa de PCR "GW2" (Tabla IV). Los productos del PCR GW2 fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa y las bandas de interés identificadas (mayores a 500 pb) fueron purificadas desde el gel (sección 2.4.5) para su posterior clonación y secuenciación.

En el caso del gen *cyb1*, luego de obtener la primera región promotora de 635 pb, se procedió a realizar una segunda amplificación río arriba. Para ello, se siguió el

mismo protocolo que para el primer GenomeWalker, utilizándose en este caso el partidor GW2/*cyb1* como partidor en el PCR primario y el partidor GW2.2/*cyb1* para el PCR anidado. El partidor GW2.2/*cyb1* se diseñó dentro de las 53 pb de la región 5' del fragmento de promotor identificado mediante el primer GenomeWalker. De igual manera, los productos de este segundo PCR fueron purificados desde el gel, clonados y secuenciados.

## 2.5 Análisis bioinformático de las regiones promotoras

El análisis bioinformático de las regiones promotoras de *cyb1* y *psy2* se realizó mediante la herramienta bioinformática TOUCAN2 (<http://homes.esat.kuleuven.be/~saerts/software/toucan.php>). Esta incluye una serie de programas que permiten secuencias de 2 o más genes co-expresados, en búsqueda de motivos regulatorios previamente descritos, así como la identificación de nuevos motivos regulatorios. Para nuestro análisis utilizamos la herramienta bioinformática MotifScanner ([http://tomcat.esat.kuleuven.be/axis/Toucan SOAPService.jws](http://tomcat.esat.kuleuven.be/axis/Toucan%20SOAPService.jws)), la cual permite identificar motivos regulatorios previamente descritos en las secuencias a analizar. Esta técnica requiere de una Base de datos PWM (Position Weight Matrices), desde la cual el programa obtiene los motivos conservados. En nuestro caso utilizamos la Base de datos de PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), que contiene 435 motivos regulatorios de plantas mono y dicotiledóneas. Además, el programa requiere establecer un Background Model, una matriz que permite calcular las frecuencias genómicas para diversas combinaciones de nucleótidos. Debido a que el genoma de *D. carota* no está secuenciado, decidimos utilizar un Background Model de *A. thaliana*, ya que era el

único organismo vegetal dentro de la lista de candidatos, y de tercer orden, según lo recomendado (<http://homepage.univie.ac.at/herbert.mayer/MainGEN.html#TOUCAN>). Finalmente, se pidió establecer el “prior” (probabilidad a priori de encontrar un motivo. A mayor valor del prior, mayor probabilidad de encontrar un motivo) y definir si el análisis se realizaría solo en la hebra ingresada al programa o también en su complementaria. En este caso fijamos un prior de 0,7 (recomendado para el tamaño de secuencias que ingresamos) y escogimos analizar solo la hebra de DNA ingresada al programa.

Una vez obtenidos los motivos regulatorios, procedimos a dilucidar a cuales estímulos respondían, ingresando el nombre de cada motivo en la página de PlantCARE. Luego, agrupamos y asignamos colores diferentes a los motivos de respuesta a diversos estímulos como luz, giberelinas (GA), ácido abscísico (ABA), auxinas, etileno, jasmonato, elicitores, o bien que tuvieran relación a la expresión en una zona específica de la planta, tales como los de expresión en endosperma o meristema.

Por otra parte, definimos el sitio de inicio de la transcripción (TSS) de cada región promotora utilizando el programa bioinformático BDGP ([http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq\\_tools/promoter.pl](http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl)).

Según la distribución de los motivos encontrados y considerando el sitio de inicio de la transcripción de cada promotor, se definió un promotor parcial (PP) y uno mínimo (Pm, que incluyera el TSS) de los genes *lcyb1* y *psy2*, los cuales fueron amplificados desde DNA genómico de zanahoria utilizando los partidores descritos en la tabla V y el programa “PCR convencional” (Tabla IV), ajustando las temperaturas de hibridación y tiempo de extensión a cada par de partidores. De esta forma, se obtuvieron los fragmentos PP*lcyb1*, Pm*lcyb1*, PP*psy2* y Pm*psy2*, los cuales fueron

clonados en el vector pCR<sup>®</sup>8 (sección 2.4.1.1), y luego ingresados mediante recombinación en el vector de destinación pMDC111 (sección 2.4.1.2), obteniéndose las construcciones PP*lcyb1::gfp*, Pm*lcyb1::gfp*, PP*psy2::gfp* y Pm*psy2::gfp*. Luego, estas construcciones se incorporaron en la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 (sección 2.3.3) (además del vector sin promotor pMDC111 y el vector con el promotor constitutivo 35S dirigiendo la expresión de *gfp*, pCAMBIA 1302) y se procedió a evaluar los promotores mediante transformaciones transitorias (secciones 2.3.4.3 y 2.3.4.4) y estables de plantas modelos (secciones 2.3.4.1 y 2.3.4.2), seguidos de cuantificaciones de la expresión del gen reportero *gfp* (sección 2.4.6.4) en distintas condiciones.

## **2.6 Microscopía**

Además de la determinación de la expresión de *gfp* en las plantas de tabaco transformadas transitoriamente con las construcciones promotor::*gfp* mediante PCR, se evaluó la fluorescencia de GFP en las muestras agroinfiltradas. Para esto, se recolectaron muestras de la epidermis de las hojas de tabaco mediante el método de “peeling” para visualizarlas en un microscopio de epifluorescencia Axiovert 200M (Zeiss) con un aumento de 400 veces (objetivo 40x) a una longitud de onda incidente entre 488 y 498 nm.

## **2.7 Tratamientos hormonales**

### **2.7.1 Tratamiento de plántulas de zanahoria silvestres con ABA, auxina y ácido giberélico.**

Dado que en las regiones promotoras de los genes *lcyb1* y *psy2* de *D. carota* se encontraron varios motivos de respuesta a ABA, auxinas y giberelinas, decidimos evaluar si estas fitohormonas tenían algún efecto en la expresión de los genes *lcyb1* y



*psy2* en plantas de zanahoria silvestres, con el fin de obtener un indicio sobre si estas fitohormonas tendrían algún efecto en la expresión del gen reportero *gfp* dirigida por los promotores de ambos genes en plantas de tabaco transgénicas.

Para el tratamiento, se utilizaron plántulas de *D. carota* de aproximadamente 10 cm de largo crecidas durante 17 días *in vitro* (sección 2.3.4.1), y con al menos una hoja verdadera. Se tomaron 15 plántulas por cada condición a evaluar, las cuales fueron posteriormente divididas en 3 grupos de 5 plántulas cada uno (triplicados biológicos). Para el tratamiento con ABA, las condiciones analizadas fueron ABA 50, 100 y 200  $\mu$ M, en base a las concentraciones utilizadas en reportes previos (Kiyosue y col., 1992; Chung y col., 2005), además de un control sin hormona. El tratamiento se realizó incubando las 15 plántulas de cada condición en medio MS líquido estéril suplementado con sacarosa al 3% y la concentración de hormona indicada, durante 24 horas en oscuridad a 22-25°C, con agitación suave.

El tratamiento con auxinas y giberelinas se realizó de igual manera, utilizando concentraciones de 10, 50 y 450  $\mu$ M de la auxina sintética 2,4-D (basado en Ebener y col., 1993 y Kitamiya y col., 2000) y un tratamiento de 2 horas, mientras que para giberelina se utilizaron concentraciones de 5, 20 y 50  $\mu$ M de ácido giberélico (GA3, basado en Bouquin y col., 2001 y Yang y col., 2004), durante 24 horas.

Luego de los tratamientos, las plántulas fueron enjuagadas y secadas y se les extrajo el RNA a cada set de 5 plántulas (replica biológica) de todas las condiciones analizadas (sección 2.4.2.1). Se evaluó la calidad y concentración del RNA y se sintetizó la hebra complementaria (cDNA, sección 2.4.6.1) para analizar posteriormente la expresión de los genes de interés mediante PCR cuantitativo (sección 2.4.6.4).

## 2.7.2 Tratamiento de hojas de tabaco con fitohormonas

De manera similar a lo realizado para zanahorias silvestres, se trataron muestras foliares de los tabacos transgénicos portadores de las construcciones promotor::*gfp*. Para esto se recolectó una hoja de cada planta para cada tratamiento hormonal, la cual fue dividida en 4 partes. Cada fragmento se incubó con una concentración específica de hormona. El tratamiento se realizó de esta manera para evitar diferencias de expresión que podrían producirse por el solo hecho de utilizar hojas diferentes de cada planta y con el fin de generar un protocolo uniforme para todas las plantas tratadas.

La incubación se realizó de igual manera que para zanahoria (sección 2.7.1) y se utilizaron para ABA concentraciones de 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ , mientras que estas fueron de 10 y 50  $\mu\text{M}$  para 2,4-D y de 50 y 100  $\mu\text{M}$  para GA3.

Posteriormente, se extrajo el RNA de cada muestra y se sintetizó el cDNA (sección 2.4.6.1), con el fin de evaluar cambios en la expresión del gen reportero *gfp* (y en los genes control en algunos casos) mediante PCR cuantitativo (sección 2.4.6.4).

## 2.8 Tratamiento de luz en hojas de tabaco transgénicas

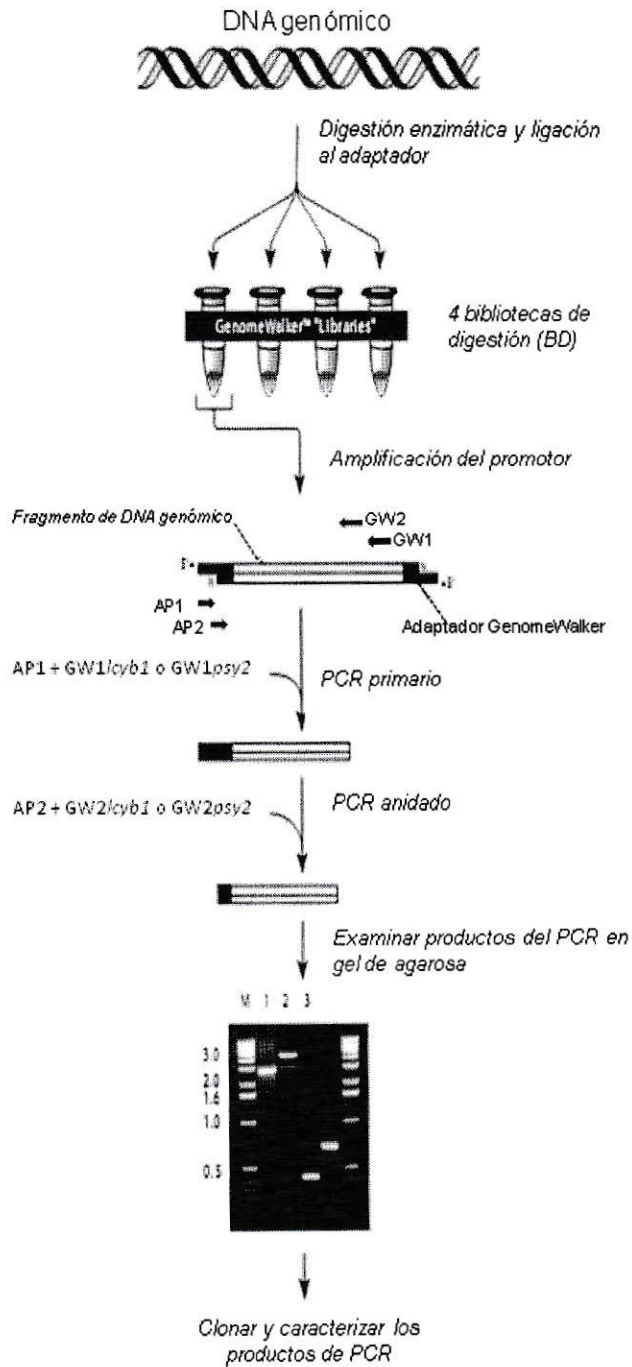
Con el fin de determinar si los promotores de los genes *lcyb1* y *psy2* eran capaces de responder a luz blanca, se realizó un tratamiento de inducción por luz. Para esto, 2 hojas de cada planta transgénica a evaluar se envolvieron en papel aluminio, con el fin de protegerlas de la luz. Las plantas se mantuvieron en condiciones de cultivo normal (fotoperíodo de 16 horas luz y 22°C) y luego de 48 horas se recolectó una hoja para extraer su RNA, constituyendo la muestra en oscuridad. La otra hoja se destapó y se mantuvo durante 24 horas más en luz blanca (400-700 nm a 33,6  $\mu\text{mol m}^{-2}$

$2 \text{ s}^{-1}$  en promedio), tras lo cual se extrajo su RNA (sección 2.4.2.1), originándose la muestra en luz.

Posteriormente, se sintetizaron los cDNAs respectivos y se evaluó la expresión de *gfp* en cada muestra mediante PCR cuantitativo (2.2.6.4).

## **2.9 Secuencias de acceso de los genes analizados en este trabajo**

Las secuencias de acceso (GenBank) de los genes analizados son las siguientes: *18S* (AY552527), *ubiquitina* (U68751.1), *lcyb1* (DQ192190.1), *lcyb2* (DQ192191.1), *psy1* (DQ192186.1), *psy2* (DQ192187.1), *Dcarg-1* (AB027501.1), *parC* (X64398.1), *osmotin* (M29279.1), *gapB* (M14418.1).



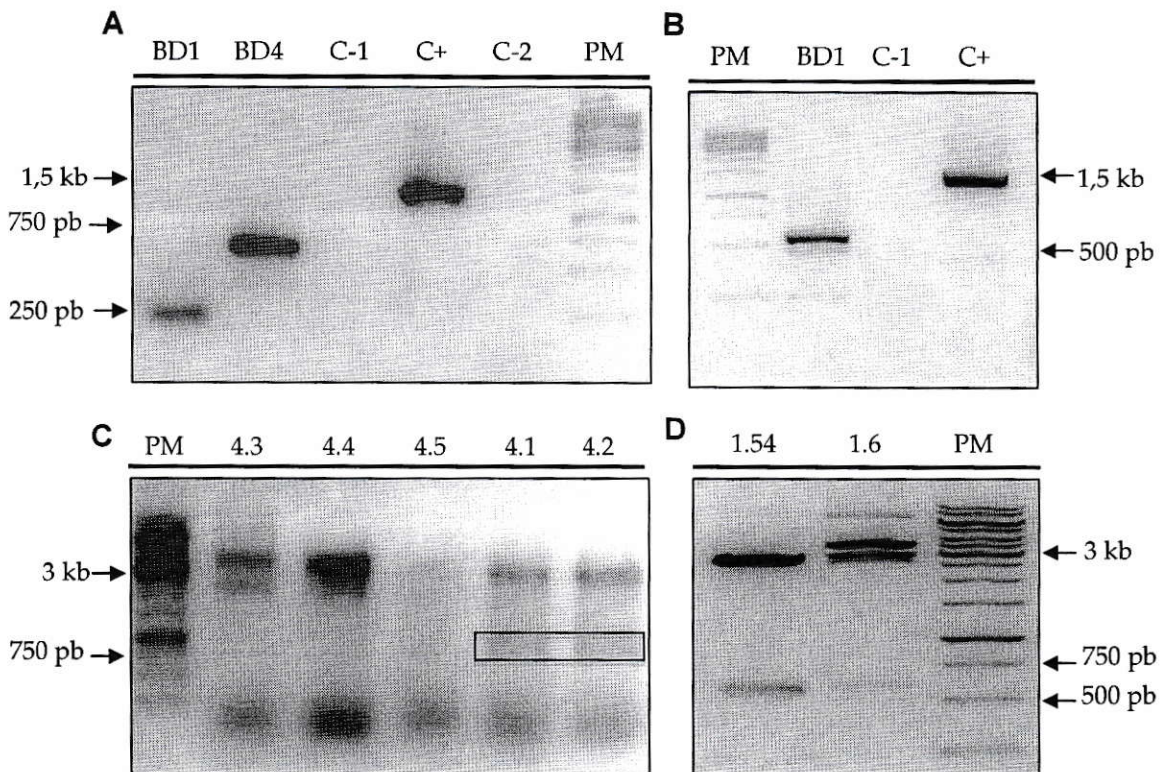
**Figura 5: Esquema de la identificación de promotores mediante GenomeWalker**

## RESULTADOS

### 3.1 Identificación de las regiones promotoras de *lcyb1* y *psy2*

Con el fin de aportar nuevos datos sobre la regulación de la ruta carotenogénica en zanahoria, durante esta tesis se identificaron las regiones promotoras de los genes *lcyb1* y *psy2* de zanahoria y se evaluó su funcionalidad y regulación por estímulos hormonales y lumínicos.

Mediante la técnica de GenomeWalker (sección 2.4.7) logramos identificar un fragmento de aproximadamente 700 pb de la región promotora de *lcyb1* en la biblioteca de digestión (BD) 4 (digerida con la enzima *StuI*; Figura 6A) y uno de aprox. 550 pb del promotor de *psy2* en la biblioteca BD1 (digerida con la enzima *EcoRV*; Figura 6B). Estos fragmentos se clonaron en el vector pCR<sup>®</sup>8 (sección 2.4.1.1) y a las colonias que resultaron positivas en el PCR de colonias (realizado con los partidores AP2 y GW2*lcyb1* ó AP2 y GW2*psy2*, Tabla V) se les extrajo su DNA plasmidial, el cual se sometió a digestión enzimática para verificar la presencia del inserto. La digestión se realizó utilizando la enzima *EcoRI*, la cual libera la totalidad del fragmento clonado. De esta manera se comprobó la presencia de un fragmento de aprox. 700 pb en los clones 4.1 y 4.2 de pCR<sup>®</sup>8/*lcyb1* (recuadro negro, Fig. 6C) y de un fragmento de aprox. 550 pb en los clones 1.54 y 1.6 de pCR<sup>®</sup>8/*psy2* (Fig. 6D).



**Figura 6: Amplificación de las regiones promotoras de *lcyb1* y *psy2* mediante GenomeWalker.** A y B: Se ilustra la amplificación de fragmentos promotores de aprox. 700 pb para el promotor de *lcyb1* y de aprox. 550 pb para el promotor de *psy2* mediante PCR anidado para *lcyb1* y *psy2*. C y D: Fragmentos identificados en A y B, respectivamente, liberados tras restricción con *EcoRI* de diferentes clones de *E. coli* portadores de estos fragmentos (clones 4.1 a 4.5 en el caso del promotor de *lcyb1* y clones 1.54 y 1.6 para el promotor de *psy2*). El control positivo corresponde a un fragmento de 1,5 kb amplificado desde una BD de DNA genómico humano, incluido en el kit. El recuadro negro indica la presencia del fragmento de 700 pb del promotor de *lcyb1* en C.

Los clones positivos para la región promotora de *lcyb1* y *psy2* (al menos 2 para cada una), fueron secuenciados (Macrogen, Corp.). En la figura 7 se ilustra la secuencia obtenida para cada fragmento.

Tras la secuenciación y eliminando la región correspondiente al adaptador del GenomeWalker, se obtuvieron secuencias de 635pb y 516 pb para el promotor de *lcyb1* y *psy2*, respectivamente, las cuales abarcaron desde el partidador antisentido diseñado en la región 5'NTR de cada gen hasta la base antes del adaptador.

## A Promotor de *lcyb1*

5'-

ACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGTCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAAC  
GCAATTAATACGCGTACCCTAGCCAGGAAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAGTTT  
GATGCCTGGCAGTTTATGGCGGGCGTCTGCCCGCCACCCTCCGGGCCGTTGCTTCAACAGTTCAAATCCGCTCCCGCGGAT  
TTGTCTACTCAGGAGAGCGTTCACCGACAAACAACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTCCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTG  
ATGCCTGGCAGTTCCTACTCTCGCGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCAGGACGTTGTAACAACCGCCAGTCTTAA  
GCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTTGCCTGATAGTCACCTGTTGTTGCAACAATTGATGAGCAATGCTTTTTATAATAC  
CAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGCGCCGCTTGTACTTTAAGAAGGAGCCCTCACCGGTTTGGATGATTTGATTTTG  
GATATCTTCACCCACAAATTATTTTTATTTTTAGAAAGAAAATAAAAGAATTGTTTCAAGTGAGTGCAGCTTACACCT-3'

## B Promotor de *psy2*

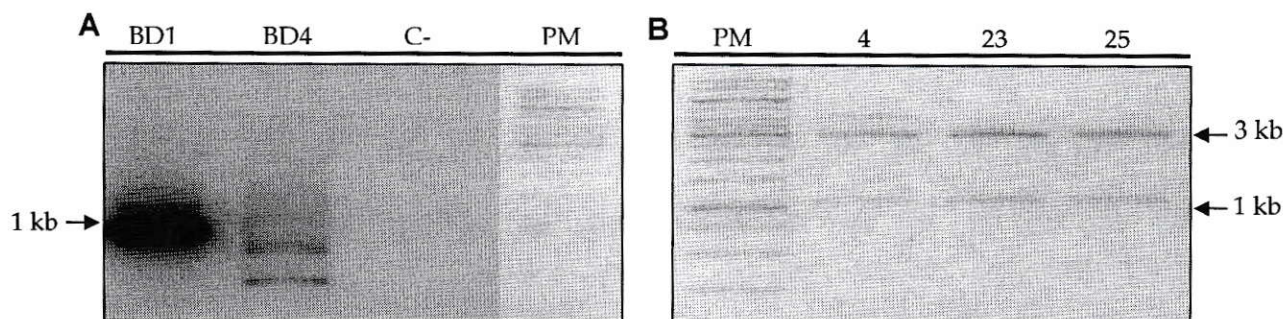
5'-

ACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGTAAACCCAAAAATACTGCCTGTATATTTTCATACAGTGGTATAAAA  
ACTGGATCAATATCCCCAGACCAGAAAAACCCAAAAAGAAATGTGTATATATATGCAAGAGAAGTTGAAAAAGAAAGAGTA  
AAACAAGAGAAGCCGAAGGGGAATCTGAAGAGCTAAGATTTGTGGGTCACAATCTAGCCAATCTTCTGTTGTTTATTTTTAT  
AAATAAATAATATTAATTAATTTATATGATGAGATAGTATAATGATGATGATATTGTGGAGCTTGTGGTGTGAATGGTTGAG  
GCCTCTCCACTGAGGTTAGTTTTTTCTCAGCTCTTCTTTCTTCTTCAATTCATTGATTATGTTTCTCACACTATACTG  
TTACTACTATCTATGTGTATATAATAGCGTTGGTTGTTGGATTTTGAATTCACCTGTGGCCACTATGCAAAGTTGAGCTTAA  
TAGTAGCAAAACACCCATTGAATCCCAATCCCAATAAGC-3'

**Figura 7: Secuencia de la primera región promotora identificada de *lcyb1* y *psy2*.** A: promotor de *lcyb1*. B: promotor de *psy2*. En rojo: partidador GW2*lcyb1* y GW2*psy2*; en azul: parte de la región 5'NTR incluida en el GenomeWalker; subrayado: adaptador del GenomeWalker; gris: partidador AP2; calipso: partidador GW2.2*lcyb1* para amplificar el segundo fragmento promotor de *lcyb1*.

Debido a que mediante la primera amplificación de GenomeWalker logramos identificar entre 500 y 650 pb de cada promotor, decidimos realizar una segunda amplificación, basándonos esta vez en la primera región promotora identificada, con el fin de obtener un fragmento de promotor total de mayor tamaño (aprox. 1 kb). Para *psy2* no fue posible identificar un fragmento río arriba, mientras que para *lcyb1* se logró obtener un segundo fragmento río arriba de la primera región promotora identificada a partir de la biblioteca BD1 (Figura 8A). El fragmento de 1 kb fue purificado desde el gel y clonado en el vector pCR<sup>®</sup>8. A las colonias transformadas con esta construcción que resultaron positivas en el PCR de colonias (realizado con los partidadores AP2 y

GW2.2/*cyb1*, Tabla V) se les extrajo el DNA plasmidial, el cual fue digerido con *EcoRI*, para liberar el fragmento clonado de 1 kb (Fig. 8B).



**Figura 8: Obtención del segundo fragmento del promotor de *lcyb1*.** A: Amplificación de un fragmento de 1 kb desde la biblioteca BD1. B: Digestión con *EcoRI* de las colonias positivas 4, 23 y 25. Se observa la liberación del fragmento de aprox. 1 kb de la segunda región promotora de *lcyb1*.

De los clones positivos se escogieron 3 para secuenciarlos. La secuencia del segundo fragmento identificado para el promotor de *lcyb1* se ilustra en la figura 9. Este corresponde a 986 pb, desde la base antes del adaptador hasta el partidor GW2.2/*cyb1*, y abarca 53 pb sobrelapadas entre el primer y segundo fragmentos identificados (en calipso y verde). El promotor total identificado para *lcyb1* (PI/*lcyb1*, 1.568 pb) se obtuvo tras la sobrelapación de los dos fragmentos promotores identificados (53 pb compartidas), incluyendo desde el partidor en antisentido diseñado dentro de la región 5'NTR hasta la base más río arriba identificada (Figura 10A). En esta figura se incluye además el resto de la región 5'NTR del gen *lcyb1* abarcada también en el análisis (hasta el partidor PC *lcyb1* R, en rojo, Tabla V), lo que sumado da una región final de 1.850 pb para el promotor de *lcyb1* (se señalan además los partidores para amplificarlo). En la figura 10B se ilustra el promotor identificado para *psy2*, incluida la región 5' NTR (fragmento de 838 pb) y los partidores para amplificarlo.



ACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAA  
 ATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAGGAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCT  
 GCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGTGGTTGTTGCGGGATCGAGAGCTACCAACTCTT  
 TTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCA  
 AGAACTCTGCAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGTAATCTGTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTA  
 CCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGC  
 TTGGAGCGAACGACCTACCCGAACTGAGATACCTACAGCGTGGCTATGAGAAGGCGCCACGCTTCCGAAGGGGAGAAG  
 GCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATC  
 TTTATAGTCTGTGGGTTTCGCCACCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAA  
 AAACGCCAGCAACGCGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGA  
 TTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCGGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA  
 GAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTATTAAATGCAGCTGGCACG  
 ACAGGTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTA

**Figura 9: Secuencia de la segunda región promotora identificada de *lcyb1*.** Subrayado: adaptador del GenomeWalker; gris: partidor AP2; calipso: partidor GW2.2/*lcyb1*; verde: región sobrelapada entre el primer y segundo fragmentos del promotor de *lcyb1*.

A

5'-  
 AAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCC  
 CGTAGGAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCA  
 GCGGTGGTTGTTGCGGGATCGAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACAAATACT  
 GTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTGCAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGTAATCTGTACCA  
 GTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTGGG  
 CTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACCCGAACTGAGATACCTACAGCGTGGCTATGAG  
 AAGGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAGGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA  
 GCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGGGTTTCGCCACCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCG  
 TCAGGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGT  
 TCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGAC  
 CGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTATT  
 AATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATACGCTACCGTAGCCAGGAA  
 GAGTTTGTAGAAACGAAAAAGGCCATCCGTAGGATGGCCTTCTGCTTAGTTTATGCTGGCAGTTTATGGCGGGCGTCTG  
 CCCGCCACCTCCGGGCCGTTGCTTACAACGTTCAAATCCGCTCCCGCGGATTTGCTCTACTCAGGAGAGCGTTACCGACAA  
 ACAACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTCCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTGATGCTGGCAGTCCCTACTCTCGGTTAACG  
 CTAGCATGGATGTTTTCCAGTCAGGACGTTGTAACAACGGCCAGTCTTAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTATTTTCCC  
 TGATAGTCACTGTTGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTATAATACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGC  
 GCCTTGTACTTTAAGAAGGAGCCCTCACCGgttttgatgattgattttggatatcttaccacacaatttttttttagaaagaaaataaaag  
 aatttttcaagtgagtcagcttacactacttgattatatgaaaaatgagatatgcttgatgtatctgctgatctaccctcaatccctctgctgtagtggttaa  
 gtcttaattcttaaccgtagctttatttactgtaattctcaatatcttctgagttatgttttagtacatgtttttttgaacaattttttataagtcactctgaaatttc  
 cattaattattggtgaaagttagcataaaggttgagaattgggatcttggaaaccagattttgttttgagatata-3'

**B**

```

5'-
AAACCCCAAAAATACTTGCCTGTATATTCTTCATACAGTGGTATAAAAACTGGATCAATATCCCCAGACCAGAAAAAACCCAAAA
AGAAATGTGTATATATATGCAAGAGAAGTTGTAAAATGAAAGAGTAAAAACAAGAGAAGCCGGAAGGGGAATCTTGAAGAGCT
AAGATTTGTGGGTCACAATCTTAGCCAATTCTTCTGTTGTTATTTTTATAAATAAATAATTAATTAATTTATATGATGAGATAG
TGATAATGATGATGATATTGTGGAGCTTGTGGTGTGAATGTTGAGGCCTCTCCACTGAGGTTAGTTTTTTCTCAGCTCTTCTT
TTCTTGTCTTCTTCAATTCATTGATTATGTTTCTCACACTATATACTGTTACACTCATCTATGTGTATATATAATAGCGTTGGTTG
TTGGATTGAAATTTCACTTGTGGCCACTATGCAAAGTTGAGCTTAATAGTAGCaaacaccattgaatcccaattcccaataagcttttgt
tacatgctctctttgttcttcatagtgatacatatatacattgtattcttcagttgtttttgatattcctttatataattttctacagaatttcttaggaaagaaagaagctt
actgccactaattattgacttgccttgacttggttcattttagttatatactcttttatttgaattaggattgttcttagctaataaaactccgtgggtgttctattttct
cataattgaagctcgcggaaaaagacaaaccaaaggaggtattgaattgaagtttattgggttagcactaactccagc-3'

```

**Figura 10: Secuencia de los promotores totales identificados para *lcyb1* y *psy2*.** A: Promotor identificado para *lcyb1* a partir de dos ampliaciones por GenomeWalker. B: Promotor identificado para *psy2* a partir de una ampliación por GenomeWalker. En minúscula: región 5'NTR incluida en el promotor a analizar; amarillo: partidor para amplificar el promotor total identificado de *lcyb1* (no usado en este trabajo); letras azules: partidor para amplificar el promotor parcial (PP) de ambos genes; rosado: partidor para amplificar el promotor mínimo (Pm) de ambos genes; letras rojas: partidor en antisentido para amplificar los promotores parciales y mínimos; verde: región sobrelapada entre el producto de la primera y segunda ampliación por GenomeWalker del promotor de *lcyb1*, incluido el partidor GW2.2 *lcyb1*. Letra más grande: zona de inicio de la transcripción, TSS. Subrayado: posible caja TATA, aprox. 30 pb antes del TSS; Calipso: elemento de respuesta a luz ATCTA.

### 3.2 Análisis bioinformático de los promotores de los genes *lcyb1* y *psy2* de *D. carota*

El análisis bioinformático se realizó a 769 pb del promotor del gen *psy2* (desde el partidor en sentido para amplificarlo (PP<sub>psy2</sub> F, Tabla V) hasta el partidor en antisentido PC<sub>psy2</sub> R, el cual abarca la totalidad de la región 5'NTR. En el caso del promotor de *lcyb1*, el análisis se realizó a 1.789 pb del promotor, que abarca desde el partidor en sentido para amplificar el promotor total identificado de *lcyb1* (PC<sub>lcyb</sub> F, no usado en este trabajo) hasta el partidor en antisentido, PC<sub>lcyb1</sub> R, abarcando la mayor parte de la región 5'NTR (según el diseño del partidor, Figura 10).

Primeramente, se determinó la zona de inicio de la transcripción, TSS, mediante el programa bioinformático BDGP ([http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq\\_tools/promoter.pl](http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl)).

El TSS del promotor de *lcyb1* se encuentra 24 pb río arriba del inicio de la zona 5'NTR, mientras que el de *psy2* se encuentra 44 pb río arriba de la misma zona.

Para el análisis de los motivos regulatorios presentes en el promotor se utilizó la herramienta bioinformática TOUCAN (sección 2.5). De este estudio se desprendió que ambos promotores presentan variados elementos de respuesta a luz, a diversas fitohormonas (ABA, auxinas, giberelinas, entre otras) y a ciertos tipos de estrés abiótico (sequía, baja temperatura, anaerobiosis) y biótico (patógenos, elicitores). Los elementos encontrados para ambos promotores se ilustran en la figura 11 y se detallan en la tabla I. En la tabla se indica el número de elementos presentes en el promotor total identificado de *lcyb1* (PI) y de ellos cuales están también presentes dentro del promotor parcial (PP) y cuales dentro del promotor mínimo (Pm), considerando que el promotor mínimo está dentro del parcial y este dentro del promotor total identificado.

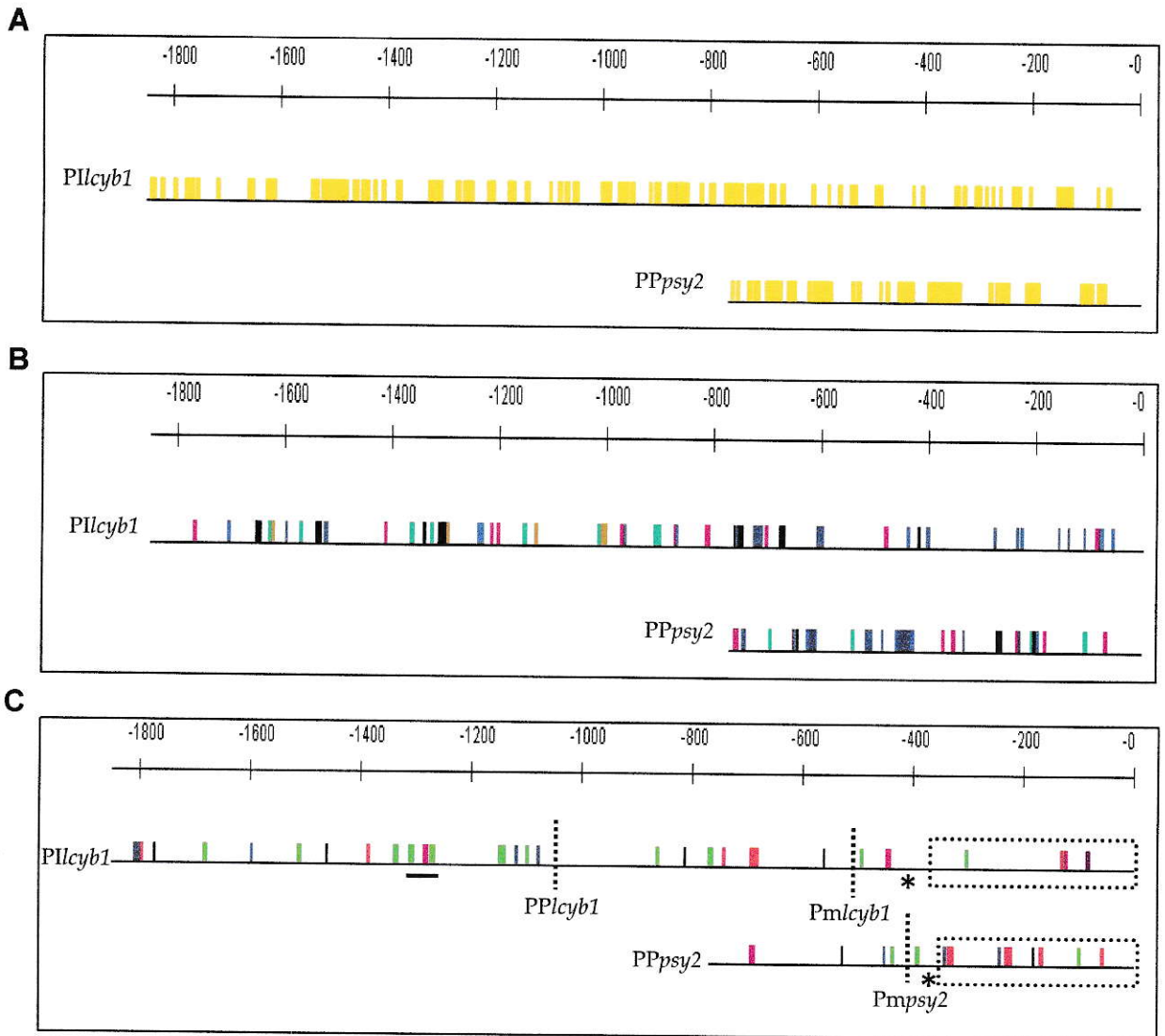
**Tabla I: Motivos regulatorios presentes en los promotores de los genes *lcyb1* y *psy2***

Respuesta a:	Nombre del elemento	Nº en *PI <i>lcyb1</i>	Nº en *PP <i>lcyb1</i>	Nº en *Pm <i>lcyb1</i>	Nº en *PP <i>psy2</i>	Nº en *Pm <i>psy2</i>	Descripción
<b>Luz</b>	<i>G-Box</i>	12	5	2	4	3	Elemento de respuesta a luz
	<i>Varios</i>	97	53	24	51	23	Elementos de respuestas a luz
<b>TATA/ Enhancer</b>	<i>Box TATA</i>	8	7	7	9	1	Caja TATA
	<i>Box CAAT</i>	9	7	3	4	2	Enhancer
	<i>5UTR_Py-rich_stre</i>	1	1	0	1	0	Confiere elevada transcripción
<b>Represores</b>	<i>REI</i>	1	0	0	0	0	Represor
	<i>ACI</i>	2	1	0	1	1	Reg. Negativo de expresión en floema
	<i>ACII</i>	2	1	0	1	0	Reg. Negativo de expresión en floema
	<i>Motivo AACA</i>	1	1	0	0	0	Represor en endosperma
<b>Estrés Biótico</b>	<i>JERE</i>	2	1	0	1	1	Respuesta a elicitores, heridas y patógenos
	<i>Box W</i>	2	1	0	2	2	Respuesta a elicitores, heridas y patógenos
	<i>Box S</i>	1	0	0	0	0	Respuesta a elicitores, heridas y patógenos
	<i>ELI-box3</i>	2	2	1	2	1	Respuesta a elicitores
	<i>Motivo WUN</i>	1	1	1	0	0	Respuesta a heridas
	<i>EIRE</i>	1	0	0	0	0	Respuesta a elicitores
	<i>Box W1</i>	2	1	0	2	2	Respuesta a elicitor fúngico
	<i>Box E</i>	1	1	0	1	0	Respuesta a elicitor fúngico
<b>Estrés Abiótico</b>	<i>DRE</i>	1	0	0	0	0	Deshidratación, baja T°, sal
	<i>MBS</i>	1	0	0	0	0	Sequia
	<i>HSE</i>	2	1	0	2	2	Heat-shock
	<i>LTR</i>	2	1	0	1	0	Baja T°
	<i>ARE</i>	1	0	0	1	0	Inducción anaerobia
	<i>Motivo GC</i>	1	1	0	0	0	Inducción anóxica

Tabla I: Continuación

Respuesta a:	Nombre del elemento	N° en *PI <i>lcyb1</i>	N° en *PP <i>lcyb1</i>	N° en *Pm <i>lcyb1</i>	N° en *PP <i>psy2</i>	N° en *Pm <i>psy2</i>	Descripción
ABA	<i>ABRE</i>	8	4	3	3	2	Elemento de respuesta a ABA
	<i>CE1</i>	1	0	0	0	0	Elemento acoplador en la respuesta a ABA
	<i>CE3</i>	2	1	0	0	0	Elemento acoplador en la respuesta a ABA
	<i>Motivo I1b</i>	1	0	0	0	0	Elemento de respuesta a ABA
	<i>Motivo I &amp; I1a</i>	1	0	0	0	0	Elemento de respuesta a ABA
Auxinas	<i>Elemento TGA</i>	2	0	0	2	2	Elemento de respuesta a auxina
	<i>Box GATA</i>	0	0	0	1	1	Elemento de respuesta a medio libre de auxina
	<i>AuxRE</i>	0	0	0	1	1	Parte de un elemento de respuesta a auxina
	<i>AuxRR-core</i>	2	2	1	0	0	Respuesta a auxina causada por estrés
	<i>Box as-1</i>	1	1	0	0	0	Elemento de respuesta a auxina, ac.salicílico y metil jasmonato
Giberelinas	<i>Motivo GARE</i>	1	0	0	2	1	Elemento de respuesta a giberelinas
	<i>Box P</i>	2	0	0	1	1	Elemento de respuesta a giberelinas
	<i>Box TATC</i>	1	0	0	1	1	Elemento de respuesta a giberelinas
Ac. Salicílico	<i>Elemento TCA</i>	3	2	2	1	0	Elemento de respuesta a ácido salicílico
Metil Jasmonato	<i>Motivo CGTCA</i>	2	1	0	0	0	Elemento de respuesta a metil jasmonato, asociado a su palíndrome
	<i>Motivo TGACG</i>	2	1	0	2	1	Elemento de respuesta a metil jasmonato, asociado a su palíndrome
Etileno	<i>ERE</i>	1	1	1	0	0	Elemento de respuesta a etileno

PI: Promotor total identificado; PP: Promotor parcial; Pm: Promotor mínimo



**Figura 11: Distribución de los motivos regulatorios presentes en el promotor de *lcyb1* y *psy2*.** A: Distribución de los motivos de respuesta a luz; B: Distribución de los motivos TATA/enhancer (azul), represores (negro), de respuesta a estrés biótico (fucsia) y abiótico (calipso) y de expresión en raíz u oscuridad (café); C: Distribución de los motivos de respuesta a hormonas. ABA (verde), auxinas (rojo), giberelinas (azul), ác. salicílico (fucsia), etileno (lila) y metil jasmonato (negro). Las líneas verticales punteadas indican la posición de los promotores parciales (PP) y mínimos (Pm). La caja punteada encierra la región 5'NTR de cada promotor. El asterisco indica la posición del TSS. La barra horizontal indica la presencia de un elemento acoplador (CE3) cercano a un elemento ABRE.

El análisis bioinformático de los promotores de los genes *lcyb1* y *psy2* indicó que estos promotores responderían principalmente a luz, debido a la gran cantidad de motivos regulatorios de respuesta a este estímulo (Tabla I) y a su distribución homogénea dentro de cada promotor (Figura 11A, color amarillo). Dentro de ellos, los más abundantes fueron los elementos G-box (secuencia consenso ACGT). En el promotor de *psy2* de zanahoria se encontraron cuatro elementos similares a G-Box en las posiciones -438, -387, -193 y -101, de las cuales las últimas tres están incluidas en el promotor mínimo de este gen (Tabla I). Por otra parte, en el promotor de *lcyb1* se encontraron 12 cajas similares a una caja G, de las cuales 5 están dentro del promotor parcial en las bases -944, -894, -563, y dos en el promotor mínimo en las bases -525 y -334 (Tabla I). Además, uno de los motivos G-Box presente en el promotor total identificado de *lcyb1* en la posición -1.302 corresponde al elemento G-Box G1, que media la inducción por luz del promotor *psy* de *Arabidopsis thaliana* (Welsch y col., 2003). De igual manera, existe un elemento de secuencia CAAGAG, similar al motivo G1, en la posición -734 dentro del promotor parcial de *psy2*.

Además, se identificó el elemento ATCTA en ambos promotores, en duplicado en el promotor de *lcyb1*, en las bases -1.875 y -265 (desde el codón de inicio ATG, Figura 10 A) y en un repetido en la base -441 del promotor de *psy2* (Figura 10B). Por otra parte, se observó la presencia de varios elementos enhancer (cajas TATA y caja CAAT, Tabla I, Figura 11B), distribuidos principalmente dentro de la región más proximal del promotor de *lcyb1* y dentro de la zona más distal del promotor de *psy2*.

Los elementos de respuesta a estrés biótico y abiótico presentan una distribución homogénea dentro de los dos promotores. Dentro de éstos destacan los

elementos DRE (secuencia consenso TACCGACAT) y MBS (secuencia consenso TAACTG), de respuesta a la falta de agua.

Finalmente, en la figura 11C se ilustra la distribución de los elementos de respuesta a hormonas, principal foco de investigación en este trabajo. Es posible observar la presencia de un gran número de elementos de respuesta a ABA (elementos ABRE en su mayoría, pertenecientes a la familia G-box y de secuencia consenso ACGT, Marcotte y col., 1989) en el promotor de *lcyb1*. Es importante destacar, que junto a los elementos ABRE, en este promotor se encuentran también 3 elementos acopladores (un CE1, de secuencia consenso TGCCACCGG y dos CE3, de secuencia consenso GACGCGTGTC). En el promotor de *psy2* existen 3 elementos ABRE, de los cuales 2 se encuentran próximos entre sí, y podrían constituir un complejo de respuesta a ABA (ABRC, Gómez-Porras y col., 2007)

Además, se encontraron varios elementos de respuesta a giberelinas (motivo GARE, de secuencia consenso ACAGA o TCTGT, Box P de secuencia consenso CTCCAACAAACCCCTTC y Box TATC, de secuencia consenso TATCCCA, Tabla I), secuencias de distribución homogénea en el promotor de *psy2* y principalmente en la región distal del promotor de *lcyb1* y a auxinas (Elemento TGA, de secuencia consenso AACGAC, Box GATA, de secuencia consenso TTACCACAGAACTC, AuxRE, de secuencia consenso TGTCTCAATAAG, AuxRR-core, de secuencia consenso GGTCCAT y Box as-1, de secuencia consenso TGACGAATGCGATGACC (Tabla I), de distribución homogénea en ambos promotores, Figura 11).

Para la definición de las delecciones de promotor a estudiar (promotores parciales y mínimos de cada gen) se tomaron en cuenta la distribución de los motivos



de respuesta a hormonas, así como el TSS (zona de inicio de la transcripción, Figura 11C), el cual se incluyó dentro de la construcción de los promotores mínimos (Pm). El promotor mínimo de *lcyb1* se definió justo río arriba del segundo elemento de respuesta a ABA, mientras que el promotor mínimo de *psy2* se definió entre los dos elementos de ABA próximos entre sí, con el fin de evaluar si la combinación de ambos representaba un módulo funcional de respuesta a ABA. El promotor parcial (PP) de *psy2* correspondió a casi la totalidad del fragmento identificado, mientras que el de *lcyb1* se definió justo río abajo de una serie de elementos de respuesta a ABA y giberelinas. El promotor total identificado para *lcyb1* no se consideró dentro de los objetivos de este trabajo, debido a que no fue posible amplificarlo *de novo* desde DNA genómico.

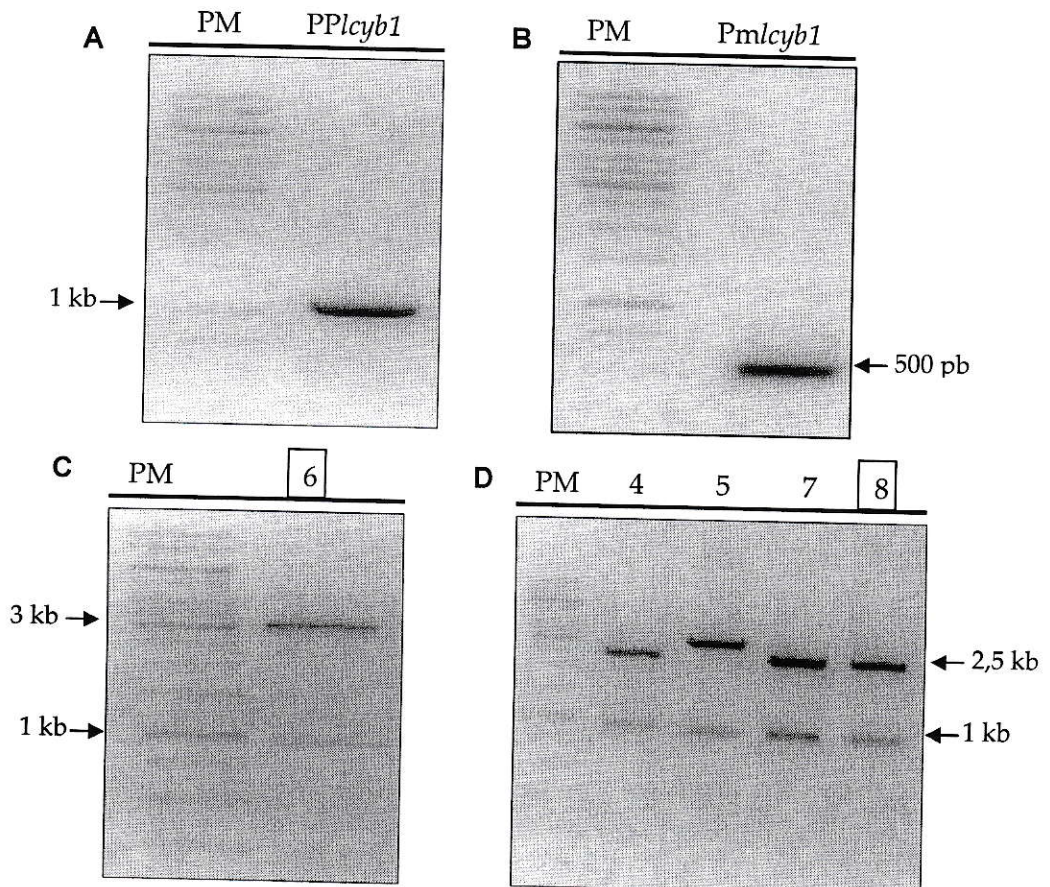
### **3.3 Generación de las construcciones portadoras de las regiones promotoras de los genes *lcyb1* y *psy2* dirigiendo la expresión de un gen reportero (*gfp*)**

#### **3.3.1 Clonación de los promotores parciales (PP) y mínimos (Pm) de los genes *lcyb1* y *psy2* en el vector de entrada pCR<sup>®</sup>8**

Los promotores parciales y mínimos de los genes *lcyb1* y *psy2* definidos en el punto anterior fueron amplificados desde DNA genómico de zanahoria y clonados en el vector PCR<sup>®</sup>8. En la figura 12 A y B se observa la amplificación del PP/*lcyb1* (1.057 pb) y del Pm/*lcyb1* (504 pb), respectivamente. En la figura 12C se observa el patrón de digestión esperado del clon 6 de pCR<sup>®</sup>8/PP/*lcyb1*, el cual comprende bandas de 2,9 kb y 906 pb para una orientación en sentido del fragmento con respecto al sitio de recombinación *attL1* (sección 2.4.1.1), mientras que en la figura 12D se observan las 2

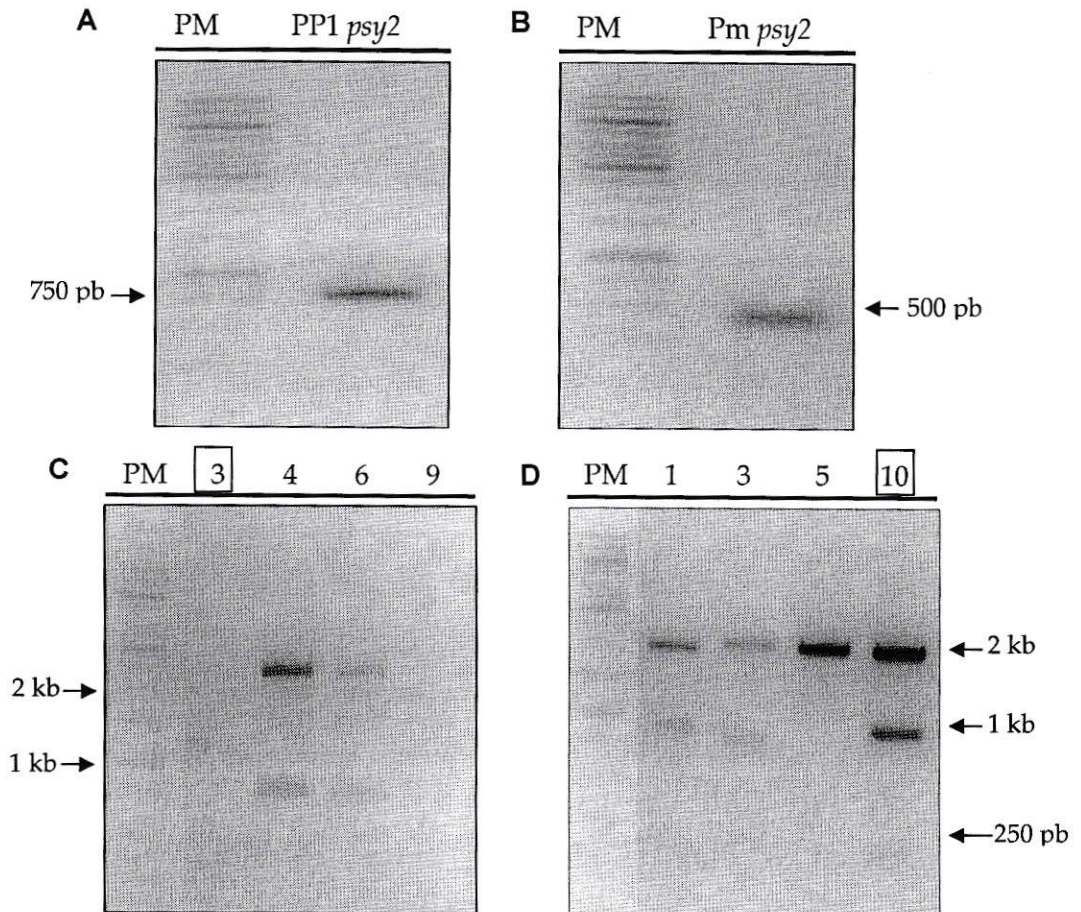
bandas esperadas para una orientación en sentido del *Pm/cyb1* con respecto al sitio *attL1* de 904 pb y 2,4 kb en los clones 4, 7 y 8.

De manera análoga, en la figura 13 A y B se observa la amplificación del *PPpsy2* (769 pb) y del *Pmpsy2* (421 pb) a partir del DNA genómico de zanahoria, mientras que en C y D se observan los fragmentos de digestión esperados para una orientación en sentido de ambos fragmentos con respecto al sitio *attL1*, de 1.373 y 2.213 pb en los clones 3 y 9 de *pCR<sup>®</sup>8/PPpsy2* y de 2.150, 966 y 122 pb en los clones 3 y 10 de *pCR<sup>®</sup>8/Pmpsy2*.



**Figura 12: Amplificación de los fragmentos parcial y mínimo del promotor de *Icyb1*.** A) Amplificación del promotor parcial, PP y (B) mínimo, Pm, del gen *Icyb1* desde DNA genómico de *D. carota*. C) Patrón de restricción del clon 6 de *pCR<sup>®</sup>8/PP/cyb1* con las enzimas *BstEII* y *PstI*. D) Patrón de restricción de los clones 4, 5, 7 y 8 de *pCR<sup>®</sup>8/Pm/cyb1* con las enzimas *BstEII* y *PstI*. Se encerraron en un cuadrado los clones seleccionados para posteriores análisis.

Una vez obtenidos los clones pCR<sup>®</sup>8/PP/cyb1 6, pCR<sup>®</sup>8/Pm/cyb1 8, pCR<sup>®</sup>8/PPpsy2 3 y pCR<sup>®</sup>8/Pmpsy2 10, estos se secuenciaron. Los clones pCR<sup>®</sup>8/PPpsy2 3 y pCR<sup>®</sup>8/Pmpsy2 10 presentaron un 99% de identidad con la secuencia esperada y las mutaciones presentes en ellos (1 en cada uno) no afectaron los motivos regulatorios identificados. El clon pCR<sup>®</sup>8/PP/cyb1 6 presentó también un 99% de identidad, ubicándose las 4 mutaciones presentes en él en regiones no codificantes para motivos regulatorios. Por otra parte, el clon pCR<sup>®</sup>8/Pm/cyb1 8 presentó una identidad de un 97% con la secuencia esperada y una de las mutaciones presentes en él generó el cambio de una base en un motivo de respuesta a ácido salicílico sobrelapado con un elemento de respuesta a auxinas.



**Figura 13: Amplificación de los fragmentos parcial y mínimo del promotor de *psy2*.** A) Amplificación del promotor parcial, PP y (B) mínimo, Pm del gen *psy2* desde DNA genómico de *D. carota*. C) Patrón de restricción de los clones 3, 4, 6 y 9 de pCR<sup>®</sup>8/PP*psy2* con las enzimas *BstEII* y *SspI*. D) Patrón de restricción de los clones 1, 3, 5 y 10 de pCR<sup>®</sup>8/Pm*psy2* con las enzimas *BstEII* y *HindIII*. Se encerraron en un cuadrado los clones seleccionados para posteriores análisis.

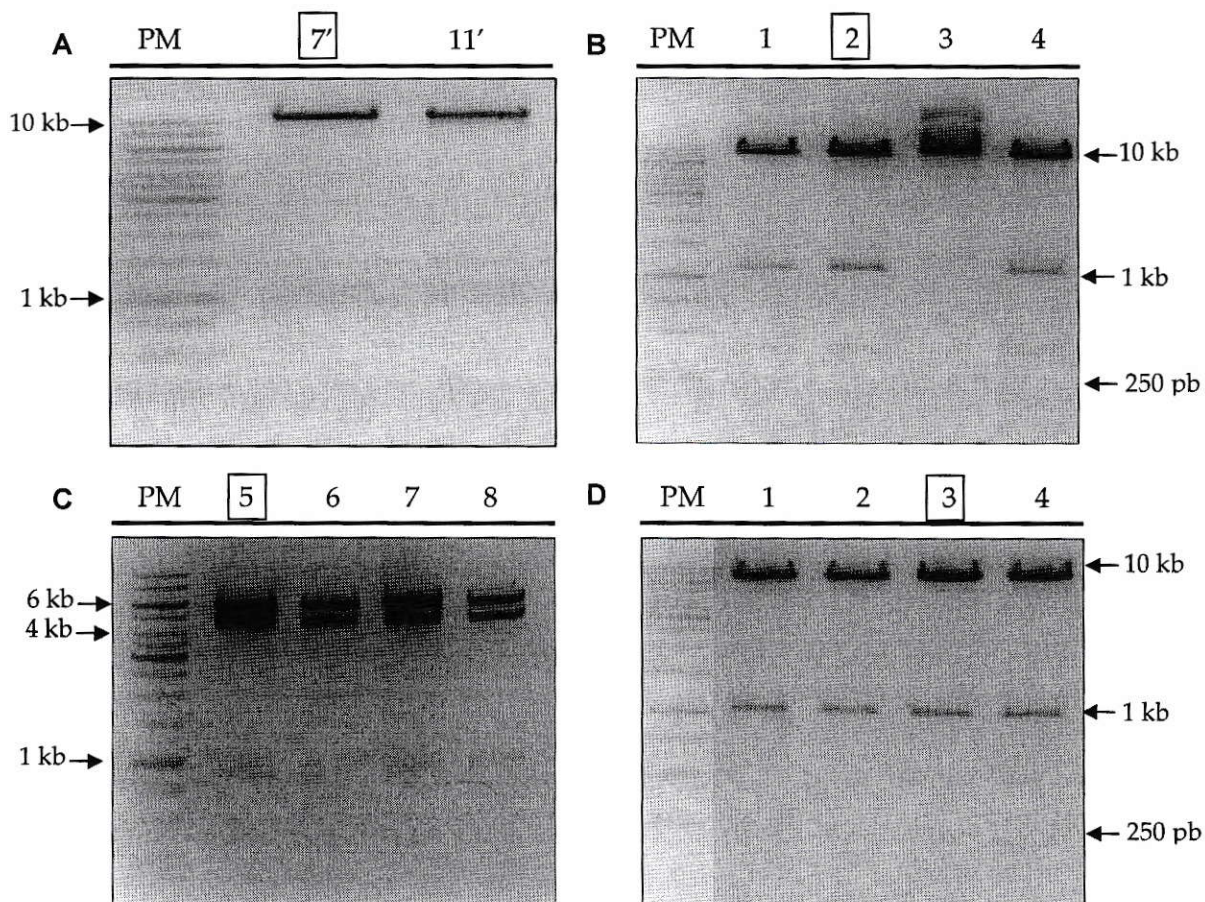
### 3.3.2 Generación de los vectores de destinación mediante recombinación por tecnología Gateway y transformación de *A. tumefaciens* con las construcciones de expresión

Una vez obtenidos los clones de entrada para las 4 construcciones generadas, estos se recombinaron con el vector pMDC111, con el fin de generar los vectores de

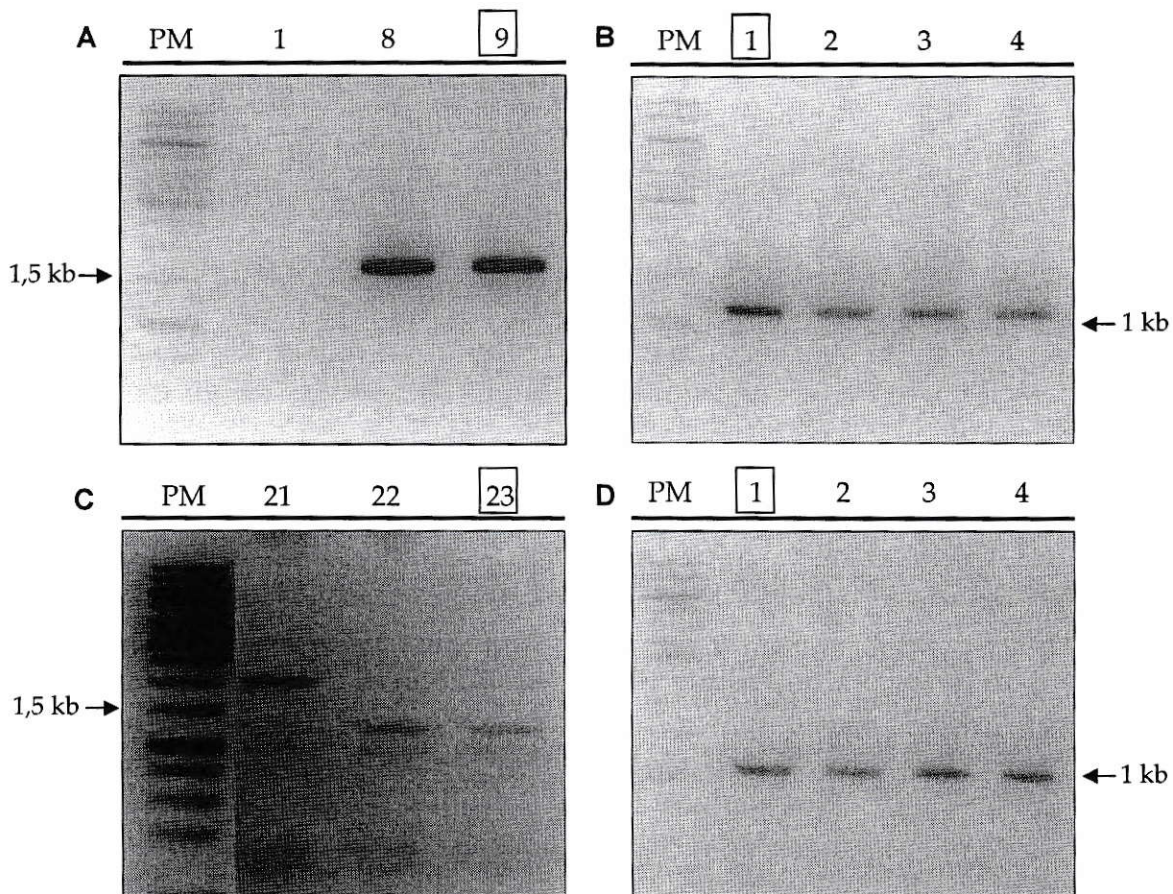
destinación donde cada promotor queda dirigiendo la expresión del gen reportero *gfp*, para el análisis de la funcionalidad de los promotores en plantas.

En la figura 14A se observa el patrón de restricción de los clones pMDC111/PP/*cyb1* 7' y 11', con las bandas esperadas de 972 y 10.330 pb para una orientación en sentido con respecto al sitio *attB1*, indicativo de la correcta inserción del fragmento promotor en el vector de destinación (Figura 4); en 14B se observan las 4 bandas esperadas de 8.960 pb, 1.078 pb, 365 pb y 157 pb para una orientación en sentido en los clones pMDC111/Pm/*cyb1* 1,2 y 4 con respecto al sitio *attB1* del vector; en 14C se observan las bandas de 5.533, 4.411 y 881 pb, correspondientes a la orientación en sentido de los clones pMDC111/PP/*psy2* 5,6,7 y 8 con respecto al sitio *attB1* y en 14D se observan las 4 bandas de 8.960, 1.078, 211 y 122 pb, correspondientes a la orientación en sentido de los clones pMDC111/Pm/*psy2* 1, 2, 3 y 4 con respecto al sitio *attB1*.

Luego de la comprobación de la correcta orientación de los clones pMDC111/promotor, se escogieron los clones pMDC111/PP/*cyb1* 7', pMDC111/Pm/*cyb1* 2, pMDC111/PP/*psy2* 5 y pMDC111/Pm/*psy2* 3 para transformar células competentes de *A. tumefaciens* (sección 2.3.3). La comprobación de la correcta transformación se realizó mediante PCR de colonias (sección 2.4.6.3), utilizando como partidor en antisentido el GFP R.2 y como partidor en sentido PP/*cyb1* F, Pm/*cyb1* F, PP/*psy2* F y Pm/*psy2* F (Tabla V). Mediante este PCR direccional se logró amplificar la totalidad de cada fragmento promotor sumado a una parte del gen reportero *gfp*. En la figura 15 A, B, C y D se observa la amplificación de 1.781 pb, 1.228 pb, 1.493 pb y 1.145 pb correspondientes a los fragmentos PP/*cyb1*::*gfp*, Pm/*cyb1*::*gfp*, PP/*psy2*::*gfp* y Pm/*psy2*::*gfp*, respectivamente.



**Figura 14: Patrones de restricción de los clones pMDC111/promotor.** A: Patrón de restricción de los clones de pMDC111/PP*icyb1* 7' y 11' con las enzimas *SacI* y *PstI*. B: Patrón de restricción de los clones de pMDC111/Pm*icyb1* 1, 2, 3 y 4 con las enzimas *EcoRI* y *PstI*. C: Patrón de restricción de los clones de pMDC111/PP*psy2* 5, 6, 7 y 8 con las enzimas *BstEII* y *SspI*. D: Patrón de restricción de los clones de pMDC111/Pm*psy2* 1, 2, 3 y 4 con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Se encerraron en un cuadrado los clones seleccionados para posteriores análisis.



**Figura 15: PCR de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con las construcciones promotor:*gfp*.** A: pMDC111/PP*lcyb1*. B: pMDC111/Pm*lcyb1*. C: pMDC111/PP*psy2*. D: pMDC111/Pm*psy2*. Los partidores utilizados y los fragmentos esperados se detallan en el texto y en la tabla V. Se encerraron en un cuadrado los clones seleccionados para posteriores análisis.

### **3.4 Transformación transitoria de hojas de *N. tabacum* y frutos de *S.***

#### ***lycopersicum* y *C. annuum* con *A. tumefaciens* portadoras de las construcciones generadas**

La funcionalidad de las construcciones se comprobó mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco y de frutos de tomate y pimentón.

La transformación transitoria de hojas de tabaco mediante agroinfiltración con *A. tumefaciens* es un sistema bien establecido para la evaluación de construcciones de expresión en plantas, tales como la evaluación de proteínas de fusión fluorescentes y el análisis de promotores (Sparkes y col., 2006; Yang y col., 2000; Kapila y col., 1997). La transformación transitoria de frutos de tomate mediante agroinyección (Spolaore y col., 2001) es un sistema menos conocido, pero igualmente útil para demostrar la funcionalidad de las construcciones generadas en este trabajo, especialmente considerando que este sistema posee células con cromoplastos, lo cual se asemeja a nuestro modelo de interés, la raíz modificada de zanahoria. Por otra parte, esta técnica de transformación de frutos de tomate ha sido utilizada previamente en el laboratorio para demostrar la funcionalidad del promotor de la poligalacturonasa, PG (Nuñez, 2007). La transformación transitoria de frutos de pimentón fue una innovación de este trabajo y se decidió probar porque este fruto, al igual que el tomate, posee cromoplastos en sus células, y presenta la ventaja de poseer menos agua en sus células, lo que facilita la extracción del RNA para la evaluación de la expresión del gen reportero *gfp*.

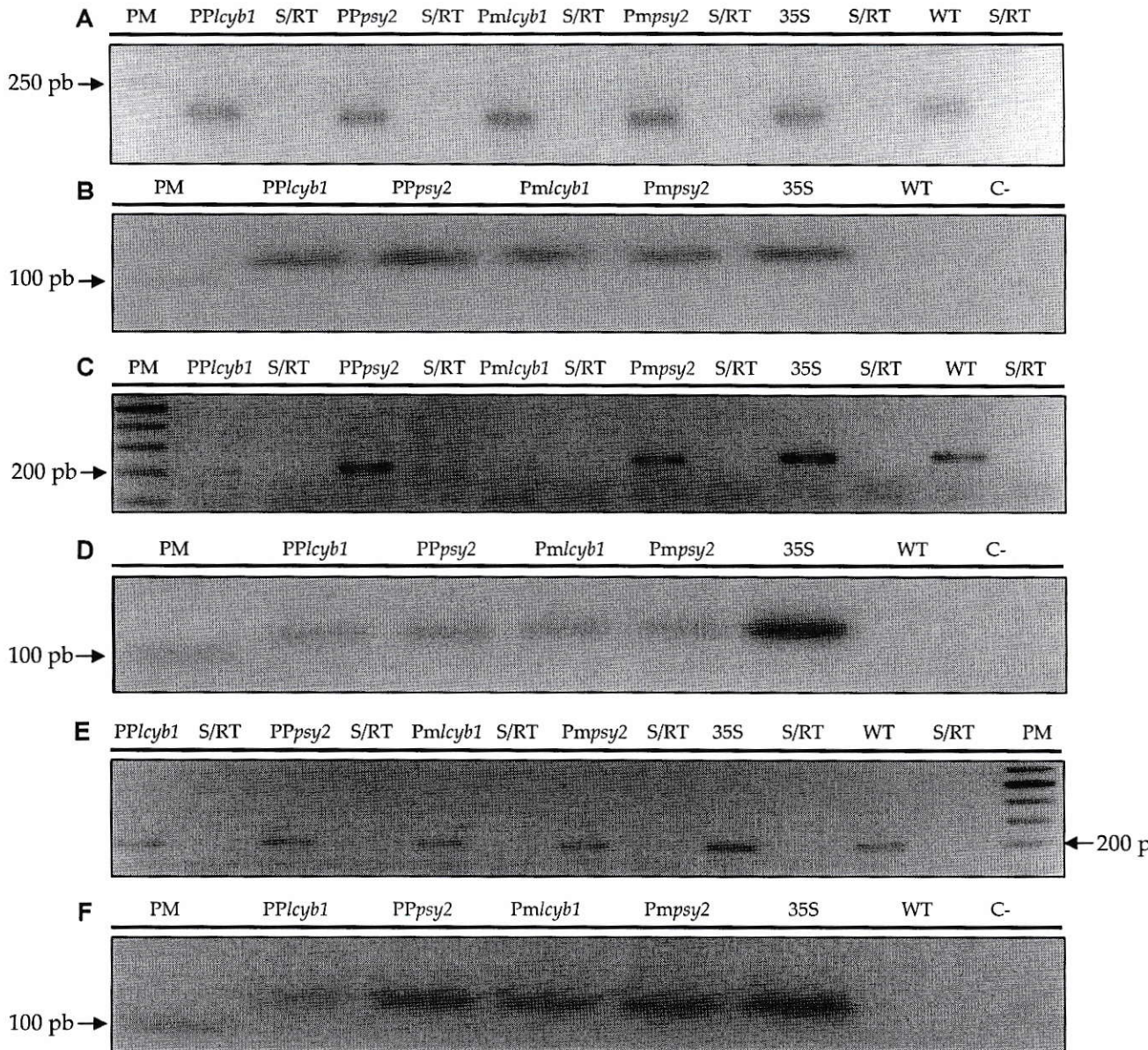
La evaluación de la funcionalidad de las construcciones generadas, al igual que la de un control positivo (pCAMBIA, que posee el promotor constitutivo 35S dirigiendo



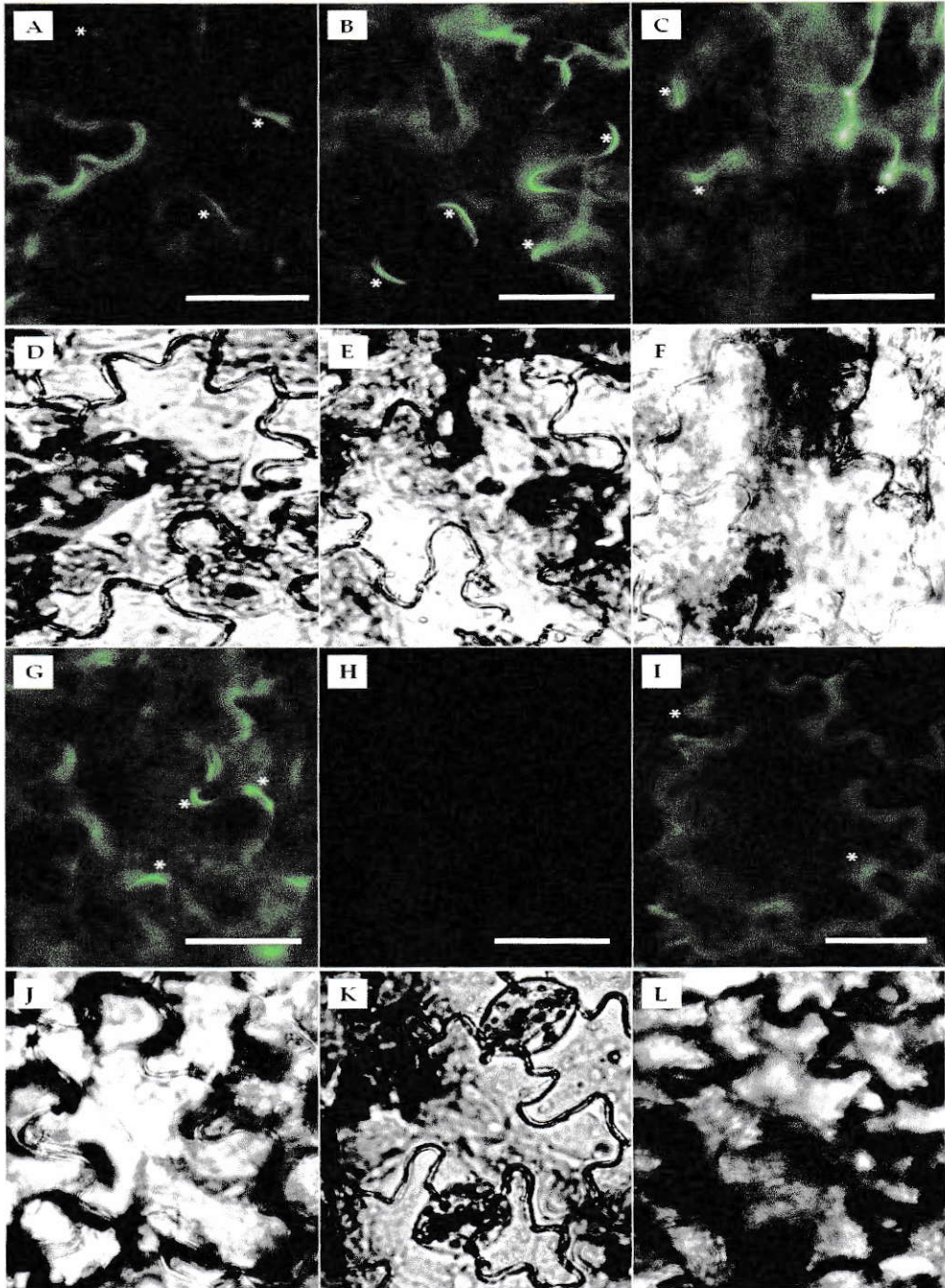
la expresión de *gfp*), se llevó a cabo mediante amplificación por PCR del gen reportero *gfp* en los tres sistemas evaluados, así como mediante la observación de la fluorescencia de GFP en las células epidermales de las hojas de tabaco agroinfiltradas.

En la figura 16 A y B se observa la amplificación del gen 18S (196 pb) y *gfp* (115 pb, amplificado con los partidores GFP F.1 y GFP R.2, Tabla V), respectivamente, para las muestras de tabaco transgénicas para las 4 construcciones generadas (pMDC111/PP/*cyb1*, pMDC111/Pm/*cyb1*, pMDC111/PP/*psy2* y pMDC111/Pm/*psy2*), además de pCAMBIA y una muestra sin transformar (WT). Se muestra además la ausencia de DNA genómico en los carriles S/RT, que corresponden al PCR para el gen 18S utilizando como blanco RNA luego del tratamiento con DNasa I (sección 2.4.6.1). En C y D se ilustra lo mismo, pero para las muestras de tomate, al igual que en E y F, para las muestras de pimentón.

De esta manera se comprobó la funcionalidad de todas las construcciones generadas, tanto en tejidos ricos en cloroplastos como en cromoplastos.



**Figura 16: Expresión de *gfp* en hojas de tabaco y frutos de tomate y pimentón transformados transitoriamente con las construcciones promotor:*gfp*.** P*lcyb1*: promotor parcial de *lcyb1*. P*psy2*: promotor parcial de *psy2*. P*lcyb1*: promotor mínimo de *lcyb1*. P*psy2*: promotor mínimo de *psy2*. En A y B: amplificación del gen *18S* y *gfp*, respectivamente, en muestras de tabaco transformadas con las construcciones mencionadas. Fragmentos esperados: 196 y 115 pb, respectivamente; C y D: amplificación del gen *18S* y *gfp*, respectivamente, en frutos de tomate transformados con las construcciones mencionadas. E y F: amplificación del gen *18S* y *gfp*, respectivamente, en frutos de pimentón transformados con las construcciones mencionadas. S/RT: control de la síntesis de cada cDNA para verificar la ausencia de DNA.



**Figura 17: Microscopía de fluorescencia de hojas de tabaco transformadas transitoriamente con las construcciones promotor::*gfp*.** A: *PP1cyb1::gfp*; B: *PPpsy2::gfp*; C: *Pm1cyb1::gfp*; G: *Pmpsy2::gfp*; H: C- (WT); I: 35S; D-F: Imágenes de campo claro de las imágenes A-C, respectivamente; J-L: Imágenes de campo claro de las imágenes G-I, respectivamente. Los asteriscos blancos indican zonas de fluorescencia de GFP en el citoplasma. Aumento: 400x. Barra: 50  $\mu$ m.

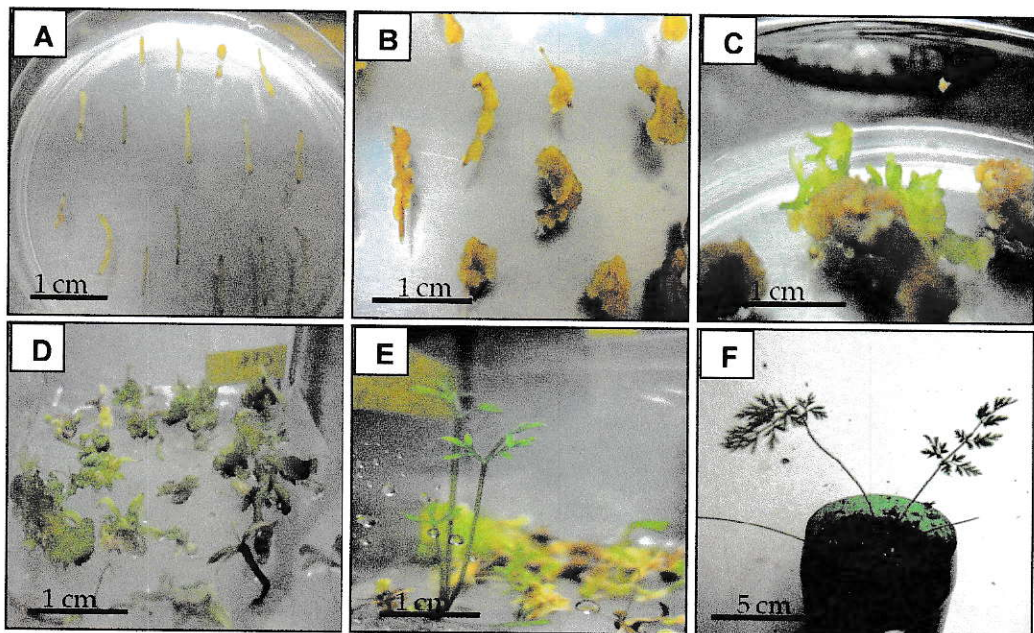
En la figura 17 se observan imágenes de la fluorescencia de GFP en las hojas de tabaco agroinfiltradas con las cuatro construcciones promotor::*gfp*, además del control positivo 35S::*gfp*. Para todas las construcciones, incluida el control positivo, se observaron regiones discretas cercanas a la membrana celular (denotadas con asteriscos blancos), correspondientes a la fluorescencia de GFP en el citoplasma, localización reportada para esta proteína reportera al no estar fusionada a otra proteína (Hanson y Köhler, 2001), y no así para una muestra silvestre (WT), sin transformar. De esta manera se corroboraron y complementaron los resultados obtenidos mediante PCR en las hojas de tabaco.

### **3.5 Transformación estable de plantas con *A. tumefaciens* portadoras de las construcciones para los promotores de *lcyb1* y *psy2***

#### **3.5.1 Transformación de explantes de *D. carota***

La transformación de *D. carota* mediante *A. tumefaciens* se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos (sección 2.3.4.1). En la figura 18 se observan las distintas etapas del proceso de embriogénesis somática, comenzando por el engrosamiento de los explantes luego de 4 semanas en el Medio D.c I (Tabla III, Figura 18A) para luego observarse la aparición de tejido pre-embriónico, tras 8 semanas (Medio D.c II, Tabla III, Figura 18A). En la figura 18 C y D se observa la aparición y elongación de embriones, tras 12 y 15 semanas respectivamente (Medio D.c III, Tabla III), mientras que en la figura 18 E y F se observan ya plantas formadas, tras 22-30 semanas *in vitro* (Medio D.c III) y luego en tierra, respectivamente.

Actualmente se cuenta en tierra con 2 plantas transformadas con la construcción pMDC111/PP/*cyb1*, 2 líneas de pMDC111/PP/*psy2*, 4 líneas de pMDC111/Pm/*cyb1* y 1 línea con pMDC111/Pm/*psy2*, y se cuenta con más plantas elongando en medio D.c III. Dado que el proceso de embriogénesis somática resultó más largo de lo esperado (debido a contaminaciones que obligaron a repetir las transformaciones hasta 3 veces), la evaluación de estas plantas quedó fuera de los objetivos de este trabajo y se realizará posteriormente.

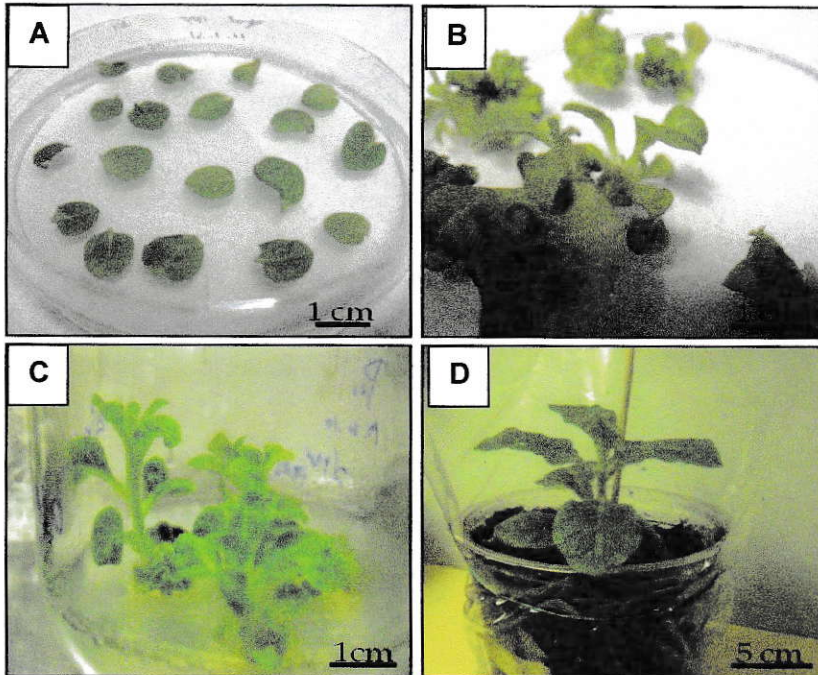


**Figura 18: Obtención de plantas de zanahoria transgénicas para los promotores de *cyb1* y *psy2*.** A: engrosamiento de explantes tras 4 semanas de cultivo en Medio D.c I; B: Aparición de tejido pre-embriogénico tras 8 semanas (Medio D.c II); C y D: Aparición y elongación de embriones tras 12 y 15 semanas, respectivamente (Medio D.c III); E: Aparición de plántulas luego de 22 a 30 semanas de cultivo (Medio D.c III); F: Cultivo de plantas en tierra.

### 3.5.2 Transformación de explantes de *N. tabacum*

La transformación estable de tabaco se llevó a cabo de acuerdo a lo señalado en Materiales y Métodos (sección 2.3.4.2). En la figura 19 es posible observar las diferentes etapas del proceso, desde explantes recién transformados (A, Medio N.t I),

hasta la generación de pequeñas plántulas luego de 6 semanas de cultivo (B, Medio N.t II). Tras 9 semanas (Medio N.t III) las plántulas ya enraízan y elongan, y son luego traspasadas a tierra, tras aproximadamente 3 meses de cultivo *in vitro* (Figura 19 D).

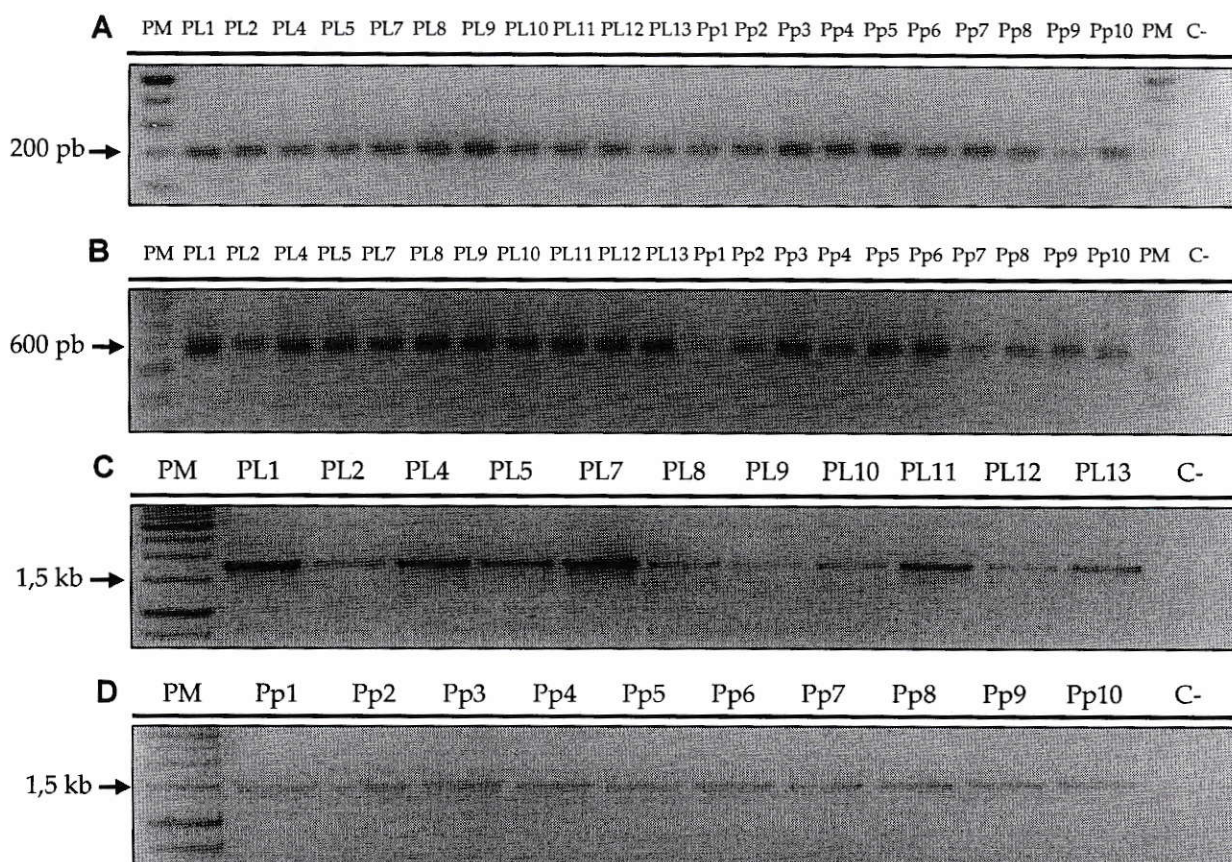


**Figura 19: Obtención de plantas de tabaco transgénicas para los promotores de *lcyb1* y *psy2*.** A: Explantes transformados tras 1 semana de cultivo en Medio N.t I; B: Aparición de plántulas luego de 6 semanas de cultivo (Medio II); C: Elongación y enraizamiento de plántulas en frascos con Medio N.t III tras 9 semanas de cultivo; D: Traspaso de plantas a tierra luego de 12 semanas de cultivo *in vitro*.

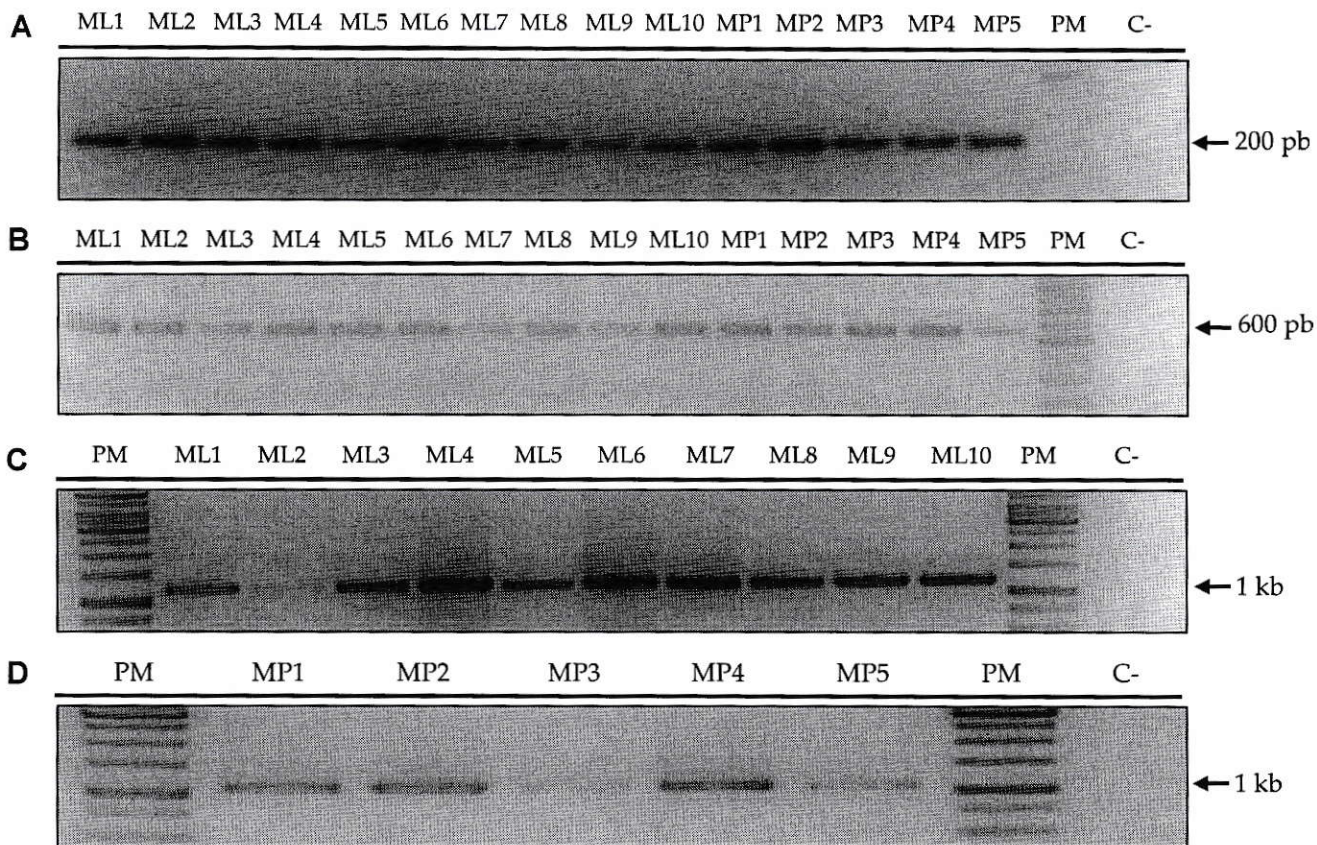
### 3.6 Identificación de las plantas de tabaco transgénicas y determinación de la expresión basal de *gfp*.

La identificación de las plantas transgénicas de tabaco transformadas establemente con las construcciones pMDC111/PP*lcyb1*, pMDC111/PP*psy2*, pMDC111/Pm*lcyb1*, pMDC111/Pm*psy2* y con el vector sin promotor pMDC111, se llevó a cabo mediante PCR desde DNA genómico extraído de sus hojas. Primeramente, se amplificó el gen *18S*, para comprobar la calidad del DNA extraído y luego se verificó la

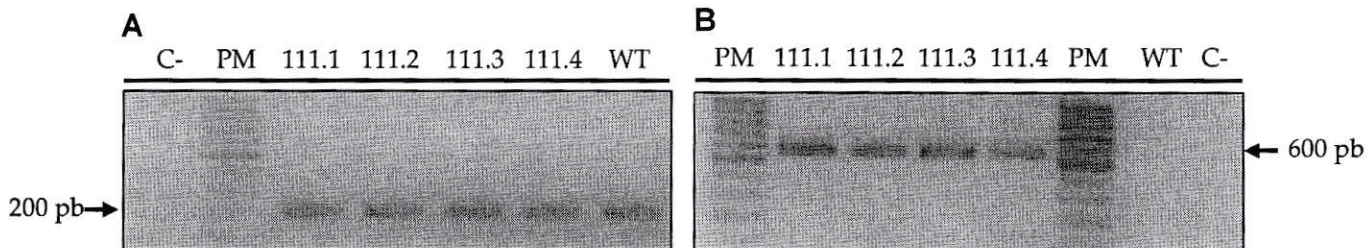
transgénesis mediante la amplificación del gen reportero *gfp*. Finalmente, se realizó un PCR direccional, para comprobar la presencia de los promotores río arriba de *gfp*, lo que se observa en las figuras 20, 21 y 22.



**Figura 20: Identificación de las plantas de tabaco transgénicas para los promotores parciales de *lcyb1* y *psy2*.** A: amplificación del gen 18S en 11 líneas de tabaco con pMDC111/PP*lcyb1* (PL) y de 10 líneas con pMDC111/PP*psy2* (Pp). Fragmento esperado; 196 pb, B: Amplificación de *gfp* en las mismas líneas, con los partidores GFP F y GFP R.1 (Tabla IV). Fragmento esperado: 583 pb, C: PCR direccional PP*lcyb1*::*gfp* con los partidores PP*lcyb1* F y GFP R.2. Fragmento esperado: 1.781 pb, D: PCR direccional PP*psy2*::*gfp* con los partidores PP*psy2* F y GFP R.2. Fragmento esperado: 1.493 pb.



**Figura 21: Identificación de las plantas de tabaco transgénicas para los promotores mínimos de *lcyb1* y *psy2*.** A: amplificación del gen 18S en 10 líneas de tabaco con pMDC111/Pm*lcyb1* (ML) y de 5 líneas con pMDC111/Pm*psy2* (MP); B: Amplificación de *gfp* en las mismas líneas, con los partidores GFP F y GFP R.1. Tamaño esperado: 583pb, C: PCR direccional Pm*lcyb1*::*gfp* con los partidores Pm*lcyb1* F y GFP R.2. Fragmento esperado: 1.228 pb ; D: PCR direccional Pm*psy2*::*gfp* con los partidores Pm*psy2* F y GFP R.2. Fragmento esperado: 1.145 pb.



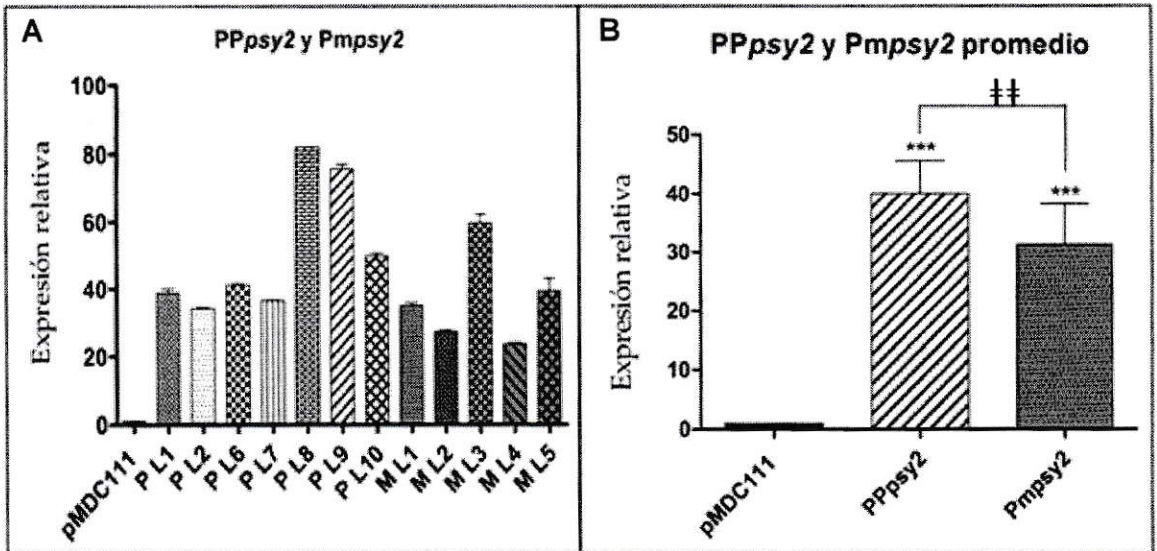
**Figura 22: Identificación de las plantas de tabaco transgénicas para el vector sin promotor pMDC111.** A: amplificación del gen 18S en 4 líneas de tabaco transformadas con pMDC111 (111); B: Amplificación de *gfp* en las mismas líneas, con los partidores GFP F y GFP R.1



Luego del análisis para la identificación de las plantas transgénicas se obtuvieron 11 líneas positivas para la transformación con pMDC111/PP/*cyb1*, 10 líneas para pMDC111/PP/*psy2*, 10 líneas para pMDC111/Pm/*cyb1*, 5 líneas para pMDC111/Pm/*psy2*, y 4 líneas transgénicas para el vector pMDC111, sin promotor. Líneas transformadas con pCAMBIA (35S:*gfp*) se encuentran actualmente en Medio N.t III.

Tras la verificación de la transgénesis, se seleccionaron 7 líneas de pMDC111/PP/*psy2*, 5 líneas de pMDC111/Pm/*psy2*, 4 líneas de pMDC111/PP/*cyb1* y 6 líneas de pMDC111/Pm/*cyb1* que presentaron un fenotipo similar en cuanto al tamaño y coloración de sus hojas para la cuantificación de los niveles de expresión de *gfp* mediante PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR). Todas ellas fueron comparadas (calibradas) frente a la expresión de *gfp* en la línea pMDC111.3 (Figura 23).

En la figura 23A se observan los niveles de expresión de *gfp* en 7 líneas de tabaco transformadas establemente con pMDC111/PP/*psy2* (Líneas 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10) y en 5 líneas transgénicas para pMDC111/Pm/*psy2* (Líneas 1 a la 5), calibradas frente a la expresión de *gfp* en la línea pMDC111.3. De las 7 líneas de pMDC111/PP/*psy2*, las líneas 1, 2, 6, 7 y 10 tienen niveles de expresión de *gfp* similares, de alrededor de 40 veces más que la expresión en pMDC111.3, mientras que las líneas 8 y 9 tienen una expresión mayor, cercana a 80. Para las líneas transgénicas para el promotor mínimo, todas tienen una expresión similar, cercana a 35, excepto la línea 3, cuya expresión es mayor. En la figura 23B se ilustra el promedio de expresión de las líneas más homogéneas (1, 2, 6, 7 y 10) del promotor parcial y de las líneas más homogéneas (1, 2, 4 y 5) del promotor mínimo, observándose una expresión de *gfp* levemente mayor en el promotor parcial de *psy2*, frente al promotor mínimo del mismo gen.



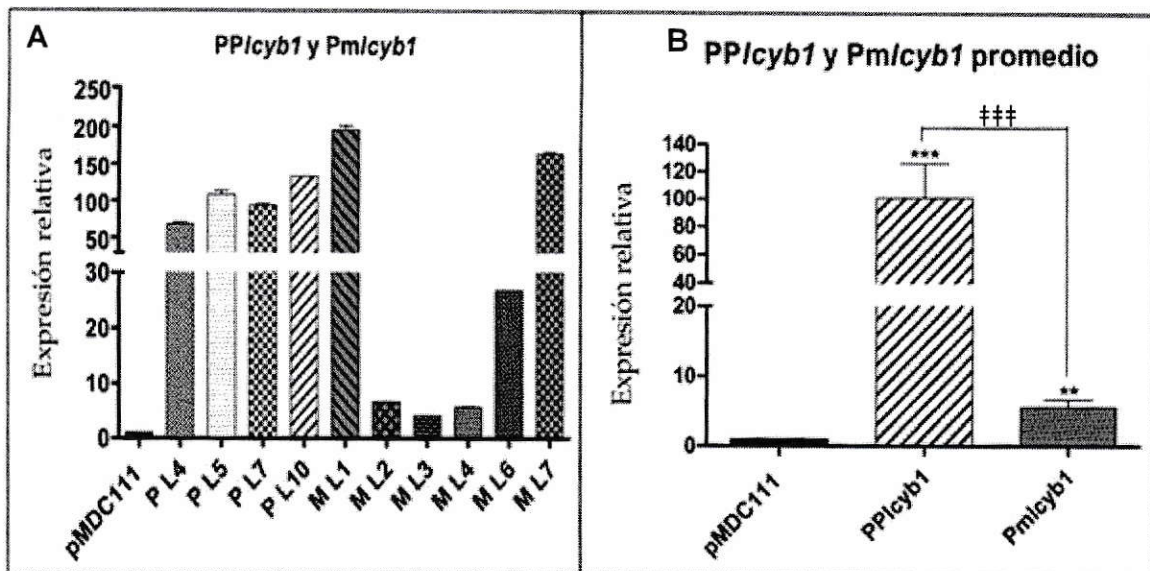
**Figura 23: Niveles de expresión basal de *gfp* en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial y mínimo de *psy2*.** A: Expresión de *gfp* en las líneas 1, 2, 6, 7, 8, 9 y 10 del promotor parcial de *psy2* y en las líneas 1 a 5 del promotor mínimo de *psy2*. Los valores corresponden a duplicados técnicos para cada línea los cuales están normalizados frente a la expresión del gen *18S* y calibrados frente a la expresión de *gfp* en la planta control, transformada con el vector pMDC111; B: Expresión promedio de *gfp* en las líneas 1, 2, 6, 7 y 10 del promotor parcial de *psy2* y en las líneas 1, 2, 4 y 5 del promotor mínimo de *psy2*. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre cada promedio y el calibrador, mientras que ‡ denota diferencias significativas entre el promedio de la expresión en el promotor parcial de *psy2* frente al mínimo. Test de T de dos colas no pareado,  $p < 0,001$ .

También es posible observar que la expresión de *gfp* tanto en el promotor parcial como en el mínimo es significativamente mayor a la expresión en la planta control (pMDC111.3)

De igual manera, en la figura 24A se ilustran los niveles de expresión basal de *gfp* en las líneas de tabaco transgénicas para el promotor parcial de *lcyb1*, observándose una expresión relativamente homogénea, de alrededor de 100 veces la expresión en la misma planta control utilizada para calibrar los valores de *gfp* de los promotores de *psy2* (pMDC111.3). Para la plantas transgénicas para el promotor mínimo de *lcyb1*, sin embargo, se observan 3 plantas con una expresión muy baja

(líneas 2, 3 y 4), mientras que dos presentan una expresión muy alta (líneas 1 y 7), mayor incluso que la encontrada para el promotor parcial, y una presenta un comportamiento intermedio (línea 6). Una explicación para tal diferencia pueden ser las diferentes zonas de inserción de las construcciones dentro del genoma, quedando estas cercanas de algún elemento activador de la transcripción en las líneas 1 y 7. Además, es importante destacar que cada línea, tanto de los promotores parciales como mínimos de cada gen, es un evento independiente de transformación (generación T0), lo que puede explicar las variaciones de expresión entre ellas. En la figura 24B se ilustra la expresión promedio de *gfp* en las plantas transgénicas para el promotor parcial (todas las líneas) y con el mínimo de *lcyb1* (líneas 2,3 y 4), observándose una gran diferencia en los niveles de expresión de *gfp* entre las líneas transgénicas para el promotor parcial comparadas con las transgénicas para el promotor mínimo, de aprox. 20 veces. Además, es posible observar que tanto las líneas transgénicas para el promotor parcial como para el mínimo presentan una expresión de *gfp* mayor a la observada en la planta control, aunque la expresión en el promotor mínimo es muy baja y sobrepasa la del control por 5 veces.

Es importante destacar además, que las líneas transgénicas para el promotor parcial de *lcyb1* (pMDC111/PP/*lcyb1*) presentan la mayor expresión de *gfp* entre todas las plantas transgénicas para todas las construcciones generadas (con el promotor parcial de *psy2* y con los promotores mínimos de ambos genes, datos no mostrados).



**Figura 24: Niveles de expresión basal de *gfp* en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial y mínimo de *lcyb1*.** A: Expresión de *gfp* en las líneas 4, 5, 7 y 10 del promotor parcial de *lcyb1* y en las líneas 1 a 4, 6 y 7 del promotor mínimo de *lcyb1*. 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 *gfp* en la planta control, transformada con el vector pMDC111; B: Expresión promedio de *gfp* en las líneas 4, 5, 7 y 10 del promotor parcial de *lcyb1* y en las líneas 2, 3 y 4 del promotor mínimo de *lcyb1*. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre cada promedio y el calibrador, mientras que ‡ denota diferencias significativas entre el promedio de la expresión en el promotor parcial de *lcyb1* frente al mínimo. Test de T de dos colas no pareado. \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

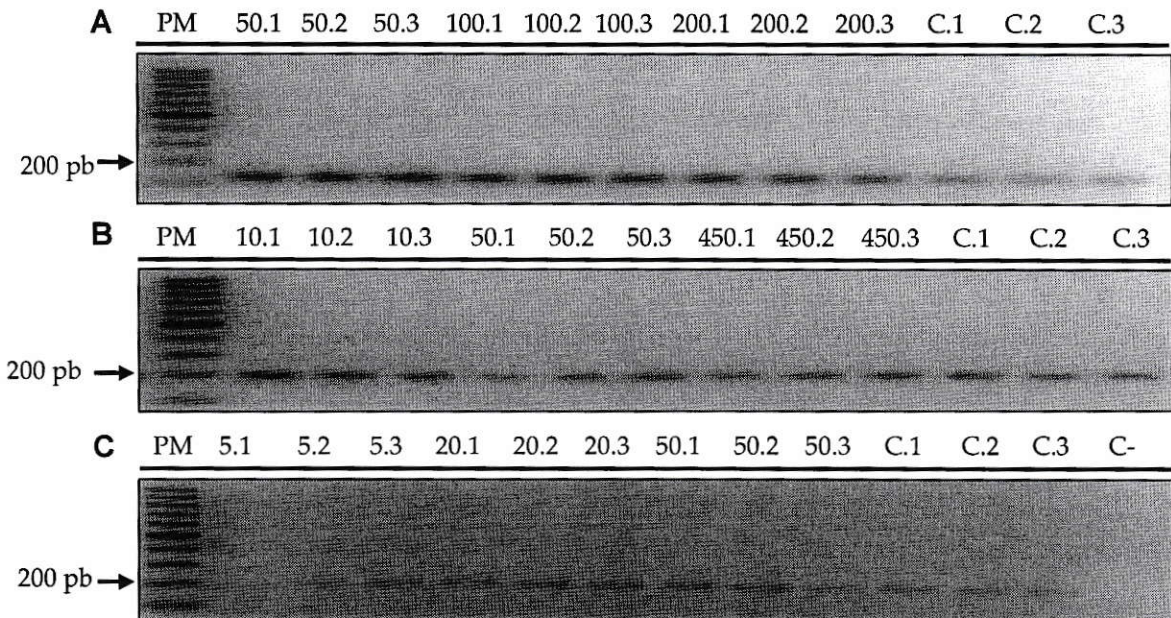
### 3.7 Análisis de la expresión de los genes *lcyb1*, *lcyb2*, *psy1* y *psy2* en plántulas de *D. carota* silvestres tratadas con diferentes fitohormonas

Los promotores de los genes carotenogénicos *lcyb1* y *psy2* presentan varios elementos de respuesta a fitohormonas (Figura 11, Tabla I). Con el fin de determinar las hormonas que podrían tener un efecto activador o represor en estos promotores, se decidió evaluar el efecto de las fitohormonas ABA, 2,4-D y GA3 en los niveles de

expresión de los genes endógenos *lcyb1* y *psy2*, así como de sus genes parálogos *lcyb2* y *psy1*, en plantas de zanahoria silvestres.

Para esto, plántulas de zanahoria cultivadas *in vitro* durante 17-19 días fueron incubadas con las distintas hormonas según lo explicitado en Materiales y métodos (sección 2.7.1), tras lo cual se les extrajo el RNA y se evaluó la expresión de los genes de interés mediante qPCR.

En la figura 25 se ilustra la amplificación correcta y homogénea del gen *18S*, indicativo de la calidad y uniformidad en los cDNAs sintetizados, para plántulas tratadas con las 3 hormonas seleccionadas.



**Figura 25: Amplificación del gen *18S* desde cDNAs de zanahoria silvestres tratadas con ABA, 2,4-D y GA3.** A: cDNAs de plantas tratadas con ABA a 50, 100 y 200  $\mu$ M, además del control sin hormona (todo en triplicado). B: cDNAs de plantas tratadas con la auxina 2,4-D a 10, 50 y 450  $\mu$ M, además del control sin hormona (todo en triplicado). C: cDNAs de plantas tratadas con Giberelina, GA3 a 5, 20 y 50  $\mu$ M, además del control sin hormona (todo en triplicado).

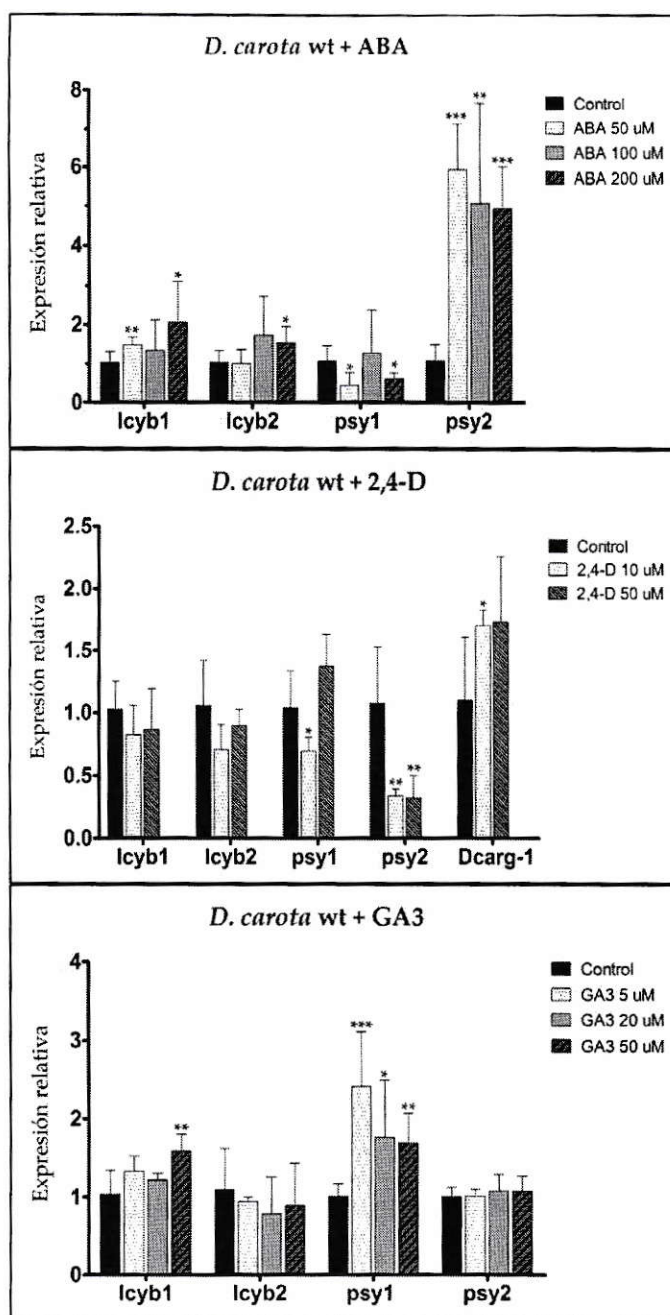
Luego de la verificación de la correcta síntesis de los cDNAs, se procedió a cuantificar los niveles de expresión de los genes *lcyb1* y *psy2*. Además, se determinaron los niveles de expresión de los genes *lcyb2* y *psy1*, con el fin de comparar la respuesta de estos genes parálogos frente a los estímulos hormonales aplicados. En el caso de las plántulas tratadas con 2,4-D, se evaluó también la expresión del gen *Dcarg-1*, gen de zanahoria reportado como inducible por 2,4-D (Kitamiya y col., 2000) y que fue incluido como control positivo de este tratamiento.

En la figura 26A se observa el efecto del tratamiento con ABA a distintas concentraciones. Es posible observar una gran inducción del gen *psy2*, en las tres concentraciones de la hormona, de entre 5 a 6 veces con respecto a su control. Interesantemente, el gen *psy1* presenta un comportamiento contrario, reprimiéndose en 2 de las concentraciones evaluadas. El gen *lcyb1*, por otra parte, presenta una inducción de entre 1,5 a 2 veces frente a su control (en ABA 50 y 200  $\mu$ M), mientras que su gen parálogo *lcyb2* presenta la misma tendencia de aumento, aunque más leve (1,5 veces en ABA 200  $\mu$ M). En el tratamiento con la auxina sintética 2,4-D (Fig. 26B) se observó el efecto contrario para el gen *psy2*, el cual se reprimió en las 2 concentraciones analizadas. El gen *psy1* presentó una leve represión en una de las concentraciones evaluadas, mientras que los genes *lcyb1* y *lcyb2* no presentaron cambios. El gen *Dcarg-1* presentó el comportamiento esperado, induciéndose en presencia de esta hormona, lo cual indica que el tratamiento con la hormona fue implementado de manera adecuada. Cabe destacar que inicialmente se trataron plántulas de zanahoria también con una concentración mayor de esta hormona (450  $\mu$ M) pero se descartaron los datos de la cuantificación de su efecto, por ser una concentración tóxica para la planta, que la afectaría de manera pleiotrópica.

Finalmente, en presencia de GA3 (Fig. 26C), el gen *psy2* no presentó cambios, mientras que el gen *psy1* se indujo 2,4 veces. El gen *lcyb1* se indujo 1,6 veces en GA3 50 uM, mientras que *lcyb2* no presentó cambios.

De lo anterior se concluye que el gen *psy2* es inducible por ABA y reprimible por 2,4-D, mientras que el gen *psy1* se reprime en presencia de ABA y se induce por GA3. Por otra parte, el gen *lcyb1* es levemente inducido en presencia de ABA y GA3.

Considerando estos resultados, se procedió a evaluar el efecto de ABA y 2,4-D en los niveles de expresión de *gfp* en las plantas de tabaco transgénicas para los promotores de *psy2* y el efecto de ABA y GA3 en las plantas de tabaco transgénicas para los promotores de *lcyb1*. El análisis del efecto del ABA en las plantas de tabaco transgénicas para los promotores parciales y mínimos de *lcyb1* se realizará posteriormente.



**Figura 26: Efecto de las fitohormonas ABA, auxina y GA3 en los niveles de expresión de los genes *lcyb1*, *psy2* y *psy1* en zanahorias silvestres. A: Efecto del ABA; B: Efecto de 2,4-D; C: Efecto de GA3. Todos los valores corresponden a triplicados biológicos y duplicados técnicos y están normalizados frente a la expresión del gen *ubiquitina* y calibrados frente a cada control (sin tratamiento). Los asteriscos denotan diferencias significativas entre la expresión frente a una determinada concentración de hormonas y su control, determinadas por Test de T de dos colas no pareado. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .**



### **3.8 Análisis de la actividad de los promotores parciales y mínimos de los genes *lcyb1* y *psy2* en plantas de *N. tabacum* tratadas con las hormonas ABA, 2,4-D y GA3 y durante un tratamiento de inducción por luz**

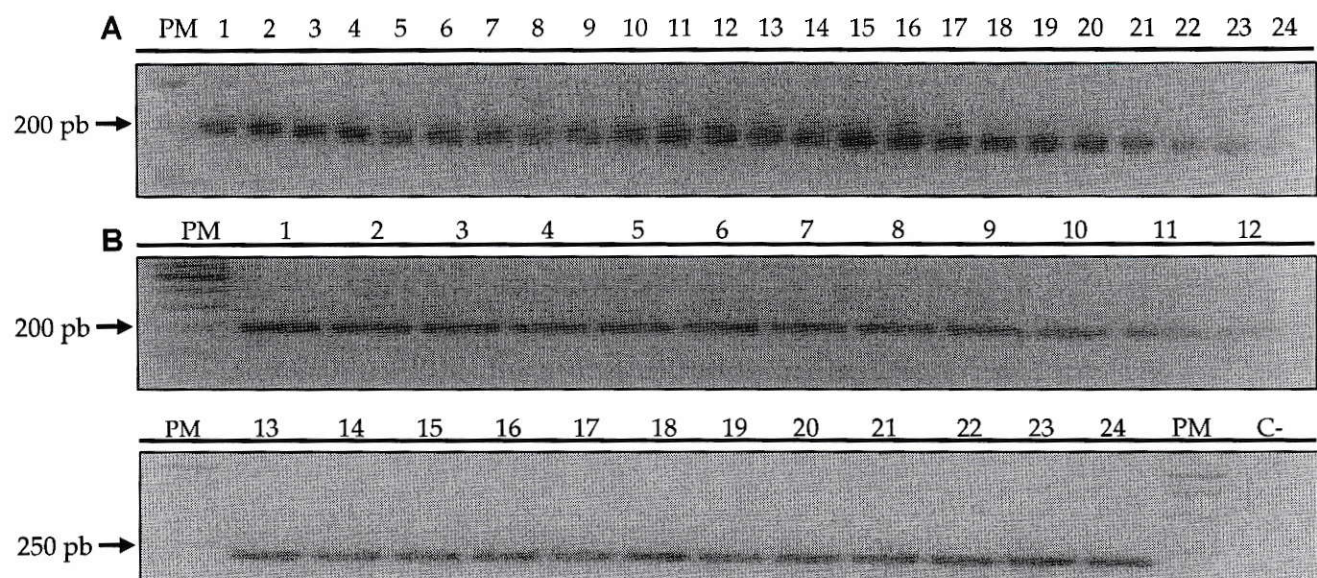
Con el objetivo de determinar el efecto de las hormonas ABA, auxina (2,4D) y giberelina (GA3) y la luz como estímulos sobre la expresión de *gfp* dirigida por los promotores PP*lcyb1*, PP*psy2*, Pm*lcyb1* y Pm*psy2*, decidimos cuantificar la expresión del gen reportero en muestras de hojas de tabaco bajo estos tratamientos. Este análisis permitirá relacionar la funcionalidad de los genes con los diversos estímulos a los que están sometidos.

#### **3.8.1 Efecto del ABA en la expresión de *gfp* en plantas de tabaco transgénicas portadoras de los promotores parciales y mínimos de *psy2***

Dado que las plantas de zanahoria silvestres tratadas con ABA presentaron una acentuada inducción del gen *psy2* (Figura 26A), decidimos evaluar si este era un efecto directo sobre el promotor de este gen cuantificando la expresión de *gfp* dirigida por los promotores parcial y mínimo de *psy2*.

El tratamiento hormonal se realizó de acuerdo a lo explicitado en Materiales y Métodos (sección 2.7.2), al igual que la extracción de RNA y la síntesis de cDNA.

En la figura 27 es posible observar la adecuada amplificación del gen *18S*, indicativo de la calidad y homogeneidad de los cDNAs sintetizados.



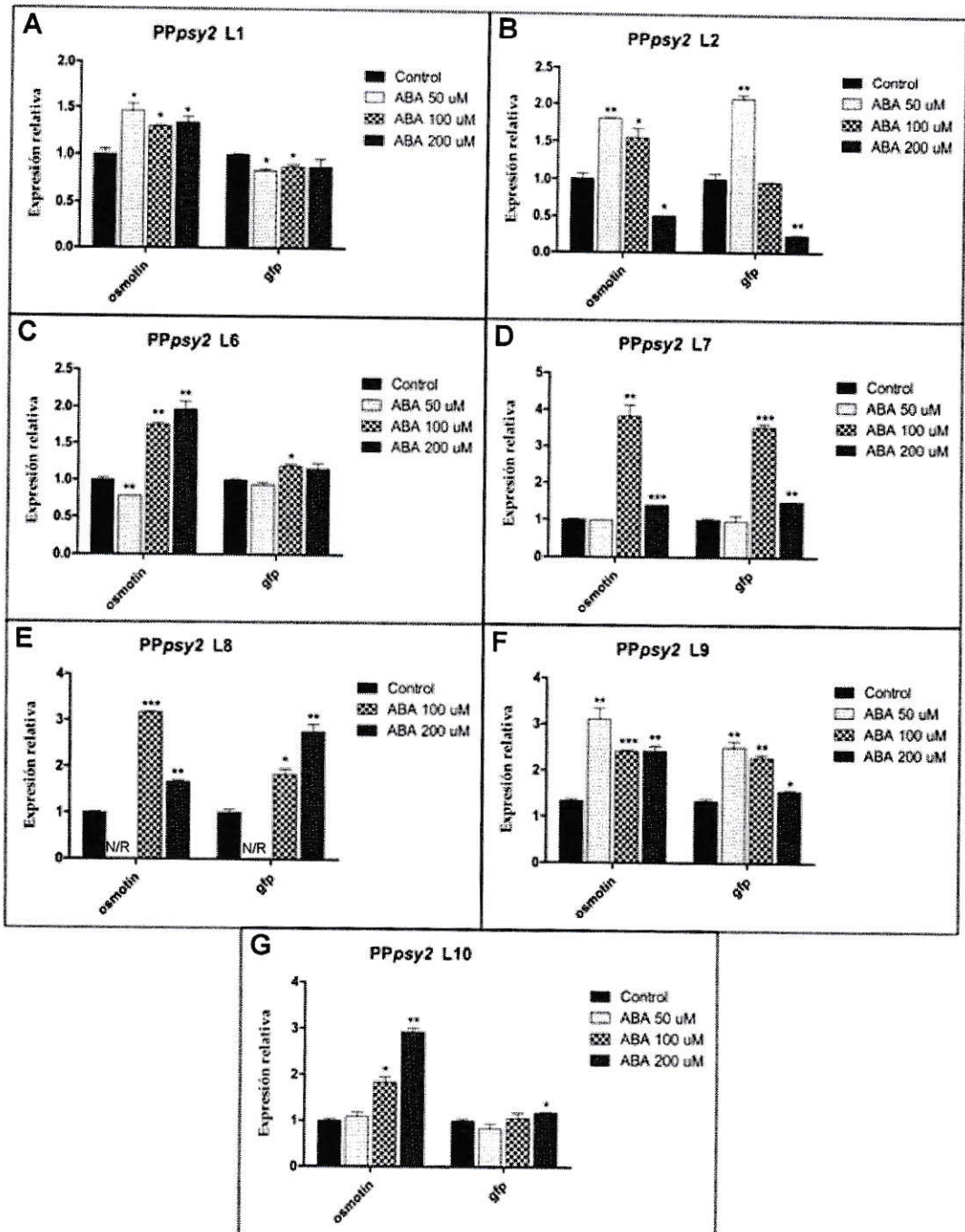
**Figura 27: Amplificación del gen 18S a partir de cDNAs de hojas de tabacos transgénicos para el promotor parcial y mínimo de *psy2* tratadas con ABA.** A: Plantas de tabaco transformadas con el promotor parcial de *psy2* .1-24: líneas 1, 2, 6, 7, 8 y 9 del promotor parcial de *psy2* tratadas con ABA 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M, y control. B: Plantas de tabaco transformadas con el promotor parcial y mínimo de *psy2*. 1-4: línea 10 del promotor parcial de *psy2* tratada con ABA 50, 100 y 200  $\mu$ M y control. 5-24: líneas 1, 2, 3, 4 y 5 del promotor mínimo de *psy2*, tratadas con ABA 50, 100 y 200  $\mu$ M, y control. Fragmento esperado: 196 pb. PM: marcador de peso molecular.

En la figura 28 se observa la cuantificación de *gfp* en las 7 líneas del promotor parcial de *psy2* tratadas con las diferentes concentraciones de ABA. Se graficó la expresión de *gfp* y de *osmotin* para cada línea por separado. El gen *osmotin* es un gen de tabaco previamente reportado como inducible por ABA (Singh y col., 1989). Lo primero que se observa en la figura 28 es la inducción del gen *osmotin* en al menos 2 concentraciones de ABA en las 7 líneas analizadas (de entre 1,3 y 3,8 veces), comprobándose su efectividad como gen control inducible por esta hormona. Además, en las líneas transgénicas 2, 6, 7, 8, 9 y 10 para el promotor parcial de *psy2* se observa la inducción de los niveles de *gfp*, en al menos una de las concentraciones analizadas (entre 1,2 y 3,5 veces). Este efecto es principalmente notorio en las líneas 2, 7, 8 y 9 en las que la curva de inducción de *gfp* en respuesta a diferentes

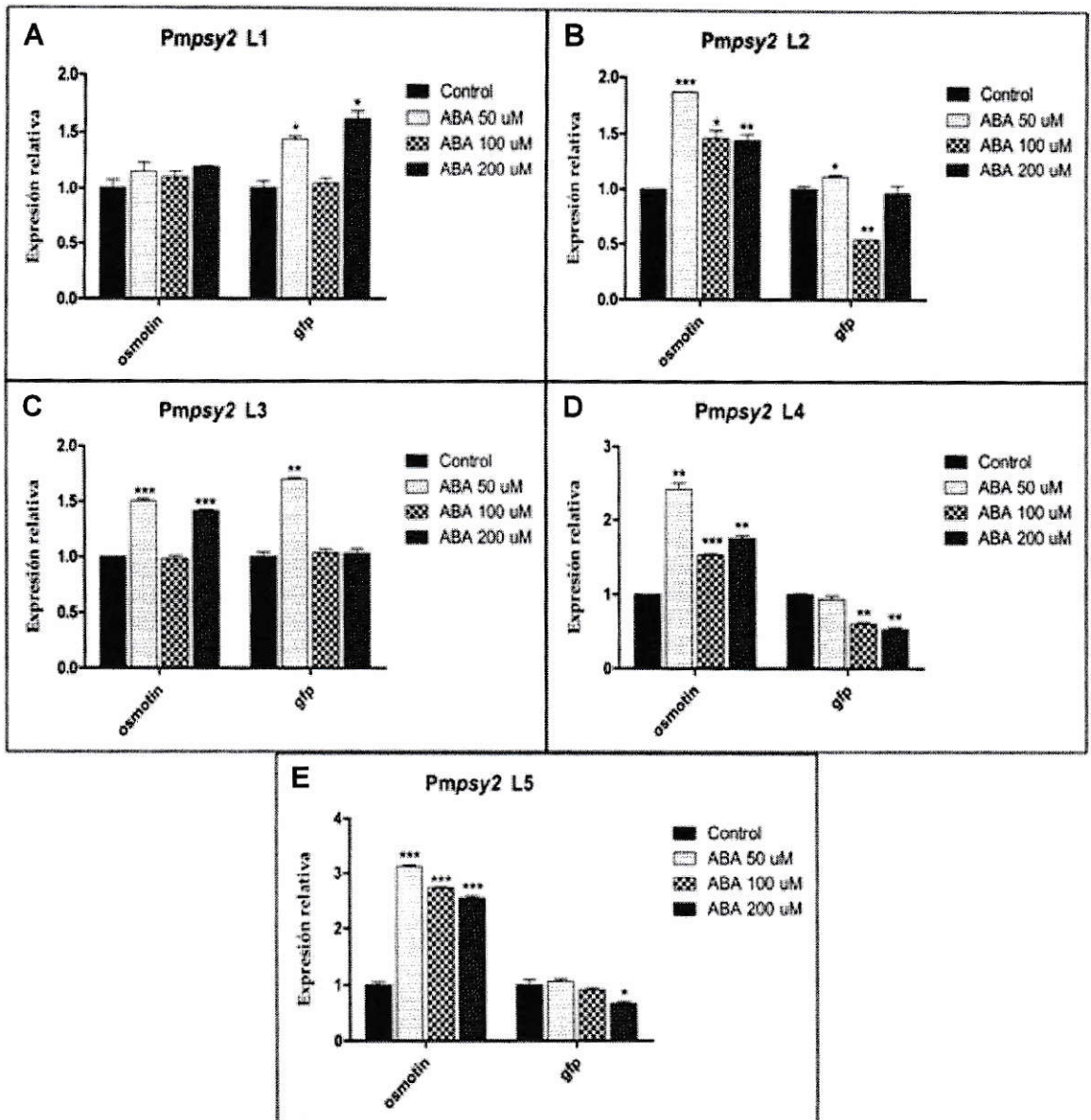
concentraciones de ABA es prácticamente igual a la curva de inducción presentada por el gen *osmotin*.

El mismo análisis para las plantas transgénicas para el promotor mínimo de *psy2* se ilustra en la figura 29. En ella es posible observar que en las líneas 2, 3, 4 y 5 el gen *osmotin* se induce en 2 a 3 de las concentraciones de hormona usadas (entre 1,4 y 3 veces), comprobándose nuevamente su efectividad como gen control. En el caso del promotor mínimo, el gen *gfp* se induce claramente solo en la línea 1 (entre 1,4 y 1,6 veces en las 2 concentraciones). Sin embargo, en esta línea el gen control no se indujo, por lo cual esta línea no es concluyente. En la línea 3 se observa una leve, aunque significativa, inducción en 50 uM de ABA (1,7 veces), mientras que en la línea 2 existe una leve inducción en 50 uM (de un 10%), pero una represión en 100 uM (de un 50%). Sin embargo, en las líneas 4 y 5 existe una represión de *gfp* (de aprox. un 40%). Por esto no fue posible establecer una respuesta bien definida del promotor mínimo de *psy2* frente a ABA. Lo anterior se evidencia más claramente en la figura 30, donde se grafica el promedio de las expresiones de *gfp* y *osmotin* para las líneas 2, 7, 8 y 9 del promotor parcial de *psy2* y para las líneas 2, 3, 4 y 5 del promotor mínimo de *psy2*. Para el promotor parcial de *psy2* se evidencia la misma curva de inducción de *gfp* y *osmotin*, otorgándole solidez al resultado, mientras que para el promotor mínimo se observa una leve represión de *gfp* en una curva opuesta a la inducción de *osmotin*, con lo que se puede concluir que el promotor parcial de *psy2* es inducible por ABA y no así el promotor mínimo.

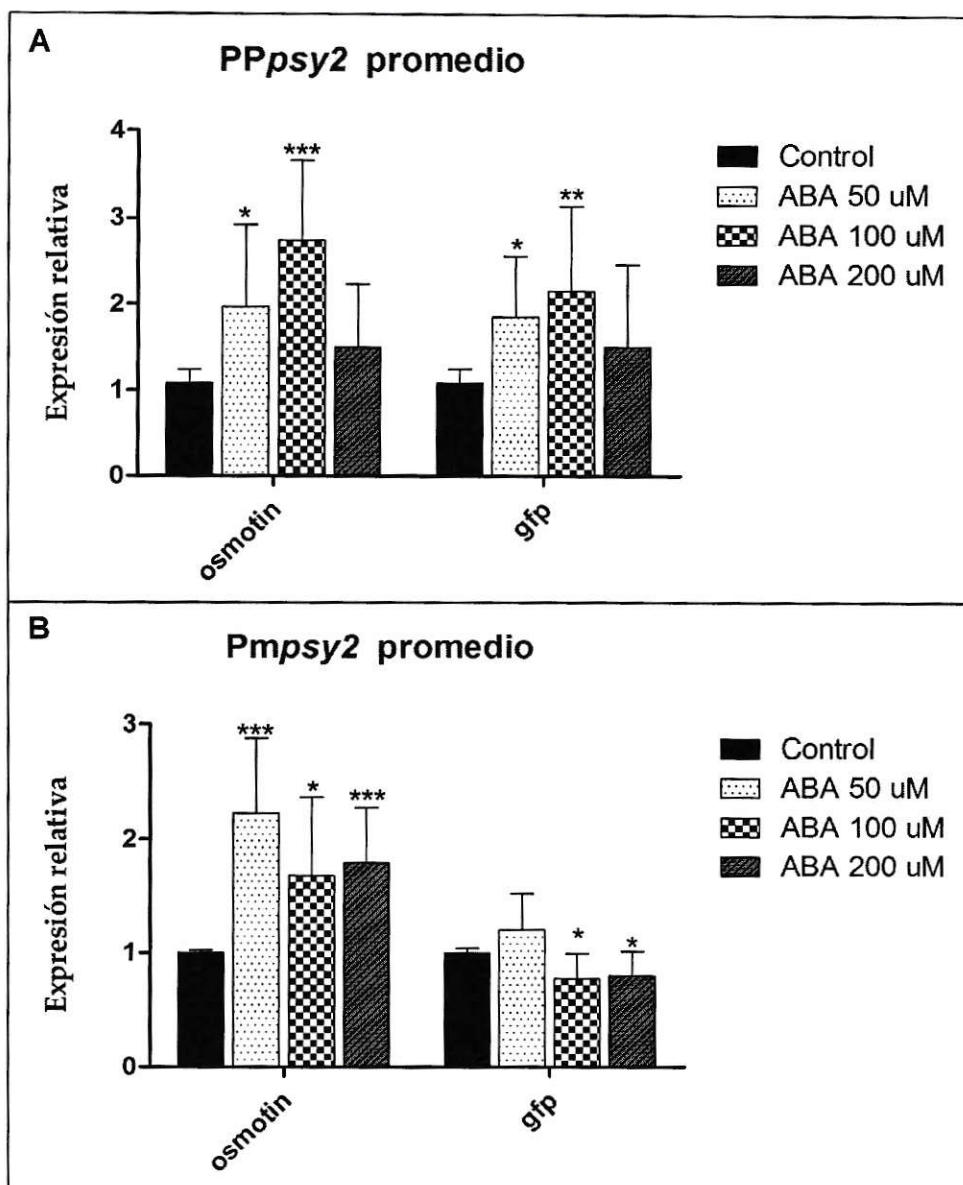
Lo anterior puede asociarse al elemento ABRE, de respuesta a ABA, presente en el promotor parcial del gen *psy2*, pero ausente en el mínimo (Figura 11C, Tabla I).



**Figura 28: Niveles de expresión de *osmotin* y *gfp* en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial de *psy2* tratadas con ABA. A-G: Líneas 1, 2 y 6-10. Cada valor corresponde al promedio de 2 réplicas técnicas. Todos los valores fueron normalizados con respecto a la expresión de *18S* y calibrados frente a su control. N/R: no realizado. Asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (tratamiento sin hormona) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .**



**Figura 29: Niveles de expresión de *osmotin* y *gfp* en plantas de tabaco transgénicas para el promotor mínimo de *psy2* tratadas con ABA. A-E: Líneas 1 a 5. Cada valor corresponde al promedio de 2 réplicas técnicas. Todos los valores fueron normalizados con respecto a la expresión de *18S* y calibrados frente a su control. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (tratamiento sin hormona) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .**

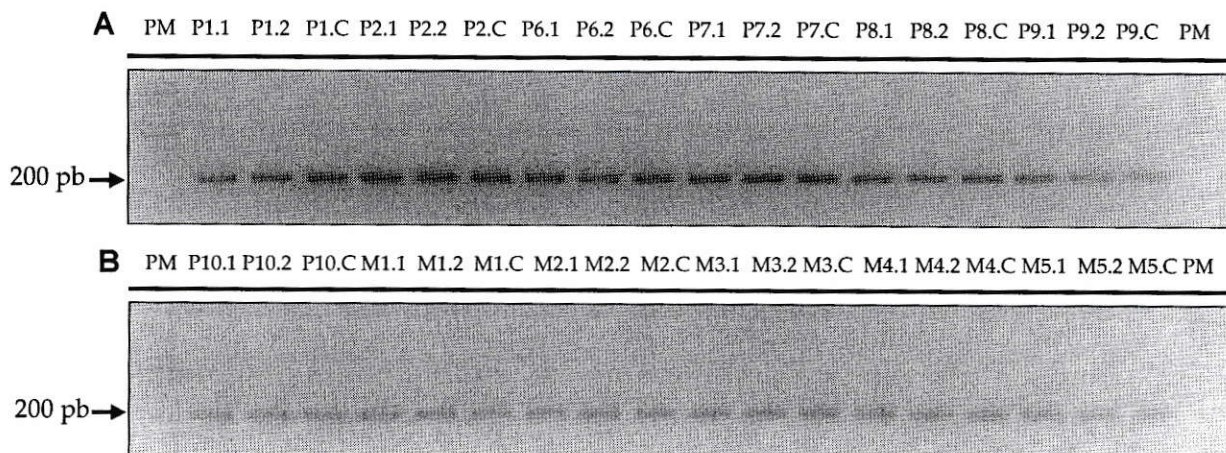


**Figura 30: Niveles promedio de expresión de *osmotin* y *gfp* en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial y mínimo de *psy2* tratadas con ABA.** A: Promedio de las líneas 2, 7, 8 y 9 de plantas transformadas con el promotor parcial de *psy2*; B: Promedio de las líneas 2, 3, 4 y 5 de plantas transformadas con el promotor mínimo de *psy2*. Todos los valores fueron normalizados con respecto a la expresión de *18S* y calibrados frente a su control. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (tratamiento sin hormona) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.8.2 Efecto del 2,4-D en la expresión de *gfp* en plantas de tabaco transgénicas portadoras de los promotores parciales y mínimos de *psy2*

De igual manera que lo analizado para el efecto de ABA, se decidió evaluar el efecto de la auxina sintética 2,4-D en la expresión de *gfp* en los tabacos transgénicos transformados con el promotor parcial y mínimo de *psy2*, considerando que el gen *psy2* se reprime por acción de esta hormona en zanahorias silvestres.

Primeramente, se verificó la correcta síntesis de los cDNAs sintetizados a partir de las distintas muestras tratadas o no con 2,4D mediante la amplificación del gen *18S* (Figura 31).



**Figura 31: Amplificación del gen *18S* a partir de cDNAs de hojas de tabacos transgénicos para el promotor parcial y mínimo de *psy2* tratadas con 2,4-D.** A: Plantas de tabaco transformadas con el promotor parcial de *psy2*. 1-18: líneas 1, 2, 6, 7, 8 y 9 del promotor parcial de *psy2* tratadas con 2,4-D 50 uM y 100 uM, y control. B: Plantas de tabaco transformadas con el promotor parcial y mínimo de *psy2*. 1-3: línea 10 del promotor parcial de *psy2* tratada con 2,4-D 50 y 100 uM y control. 4-18: líneas 1, 2, 3, 4 y 5 del promotor mínimo de *psy2*, tratadas con 2,4-D 50 y 100 uM. Fragmento esperado: 196 pb. PM: marcador de peso molecular.

Una vez verificada la adecuada síntesis de los cDNAs, se procedió a evaluar la expresión de los genes *gfp* y *parC* en las distintas muestras mediante qPCR. El gen *parC* es un gen endógeno de tabaco capaz de ser inducido por 2,4-D (Sakai y col., 1996), por lo que su correcta inducción es un indicio de que el tratamiento hormonal fue aplicado de manera correcta.

Comprobando que el tratamiento aplicado fue el correcto, en las figuras 32 y 33 se observa la inducción homogénea y dosis-dependiente del gen *parC* en todas las líneas analizadas, ya sea del promotor parcial de *psy2* (Figura 32) como del mínimo (Figura 33), con inducciones entre 10 y 20 veces a 10 uM de 2,4-D, y de entre 20 y 60 veces a 50 uM de 2,4-D, con respecto al control sin hormona.

Sin embargo, en las líneas transgénicas para el promotor parcial de *psy2* (Figura 32) no fue posible observar una tendencia clara con respecto a la expresión de *gfp* ya que en 3 líneas (1, 2 y 6), el gen *gfp* se indujo en respuesta a 2,4-D en 1 o las 2 concentraciones analizadas (entre 30 y 90%), mientras que otras 3 líneas (8, 9 y 10) se reprimió (entre un 30 y 50%), lo que corresponde al comportamiento esperado (según lo observado para el gen *psy2* en zanahorias silvestres tratadas con esta hormona, Figura 26). La línea 7 presentó un comportamiento dual, reprimiéndose a 10 uM (un 15%) e induciéndose a 50 uM de 2,4-D (un 50%).

En las líneas transgénicas para el promotor mínimo de *psy2* (Figura 33) se observó una tendencia similar, aunque más cercana a mostrar una reducción en la expresión de *gfp*. En las líneas 1 y 2 existe una clara represión del gen reportero en las dos concentraciones utilizadas, de entre un 20 y un 55%, mientras que en la línea 5 se observa la misma tendencia, aunque no se presentan diferencias significativas con



respecto al control. Las líneas 3 y 4 presentan un comportamiento dual, induciéndose la expresión de *gfp* en una concentración (entre un 20 y un 40%) y reprimiéndose en la otra (un 30%).

Para ilustrar estos resultados de manera más clara, en la figura 34 se ilustran las expresiones promedio de *parC* y *gfp* de diferentes líneas. En la figura 34A se grafica el promedio de las 7 líneas transgénicas para el promotor parcial de *psy2*, no observándose cambios con respecto al control, debido a la diversidad de respuestas entre las líneas analizadas. Sin embargo, al analizar por separado las líneas levemente inducidas de las reprimidas, se ve una homogeneidad en cada uno de los grupos (no mostrados). Esto implica la necesidad de analizar más líneas para descartar posibles efectos de la zona de inserción y poder obtener una conclusión más clara. En la figura 34B se grafica el promedio de expresión de *gfp* en las líneas 1, 2 y 5, transgénicas para el promotor mínimo de *psy2* (las líneas 3 y 4 se excluyeron por presentar un comportamiento dual), donde es posible observar una represión de la expresión de *gfp* en las dos concentraciones usadas (de aproximadamente un 35%).

De lo anterior es posible concluir que el promotor mínimo de *psy2* se reprime en presencia de 2,4-D, mientras que el promotor parcial no presenta una tendencia clara. Esto podría relacionarse con el gran número de elementos de respuesta a auxina presentes en el promotor mínimo de *psy2* (Figura 11C, Tabla I).

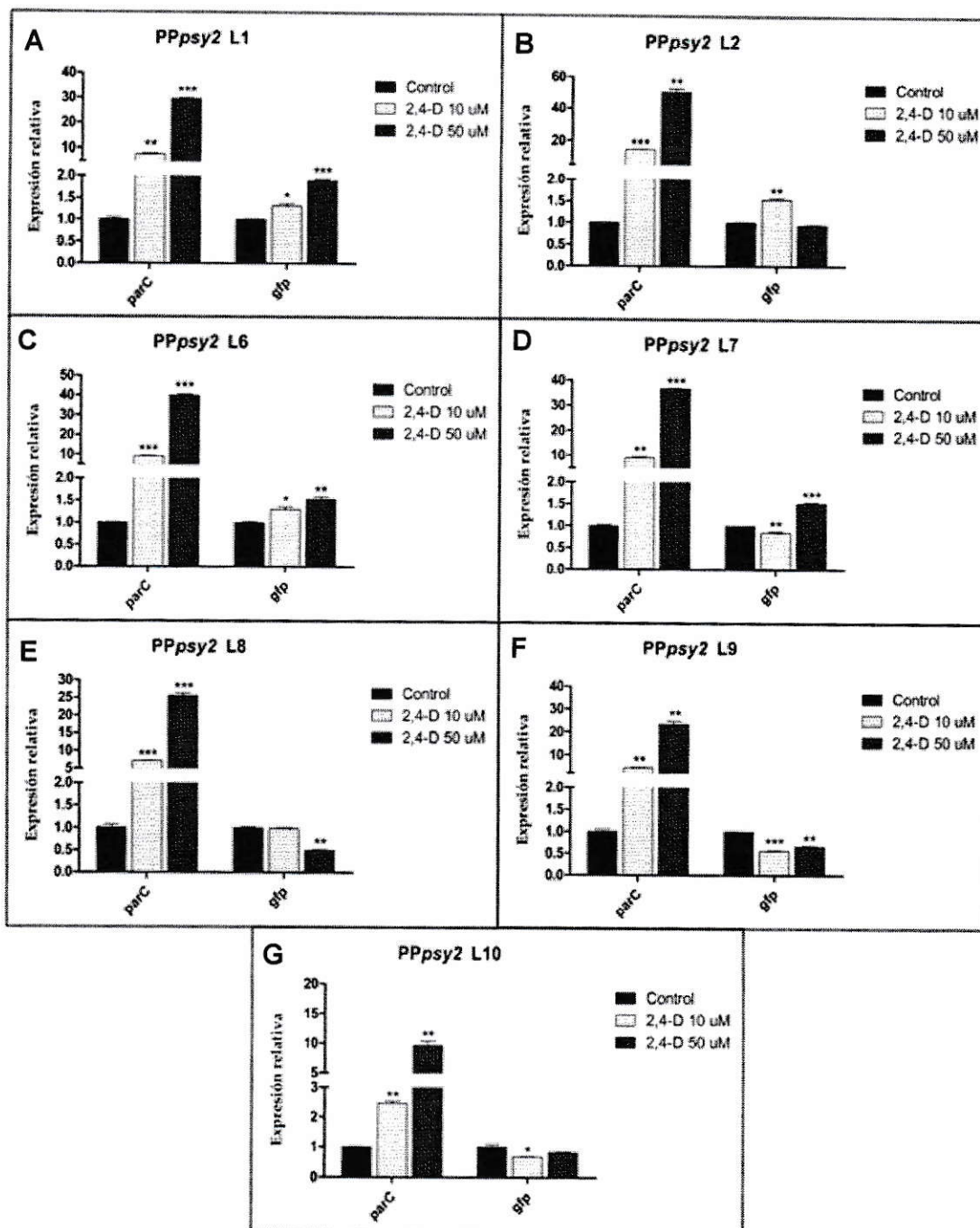
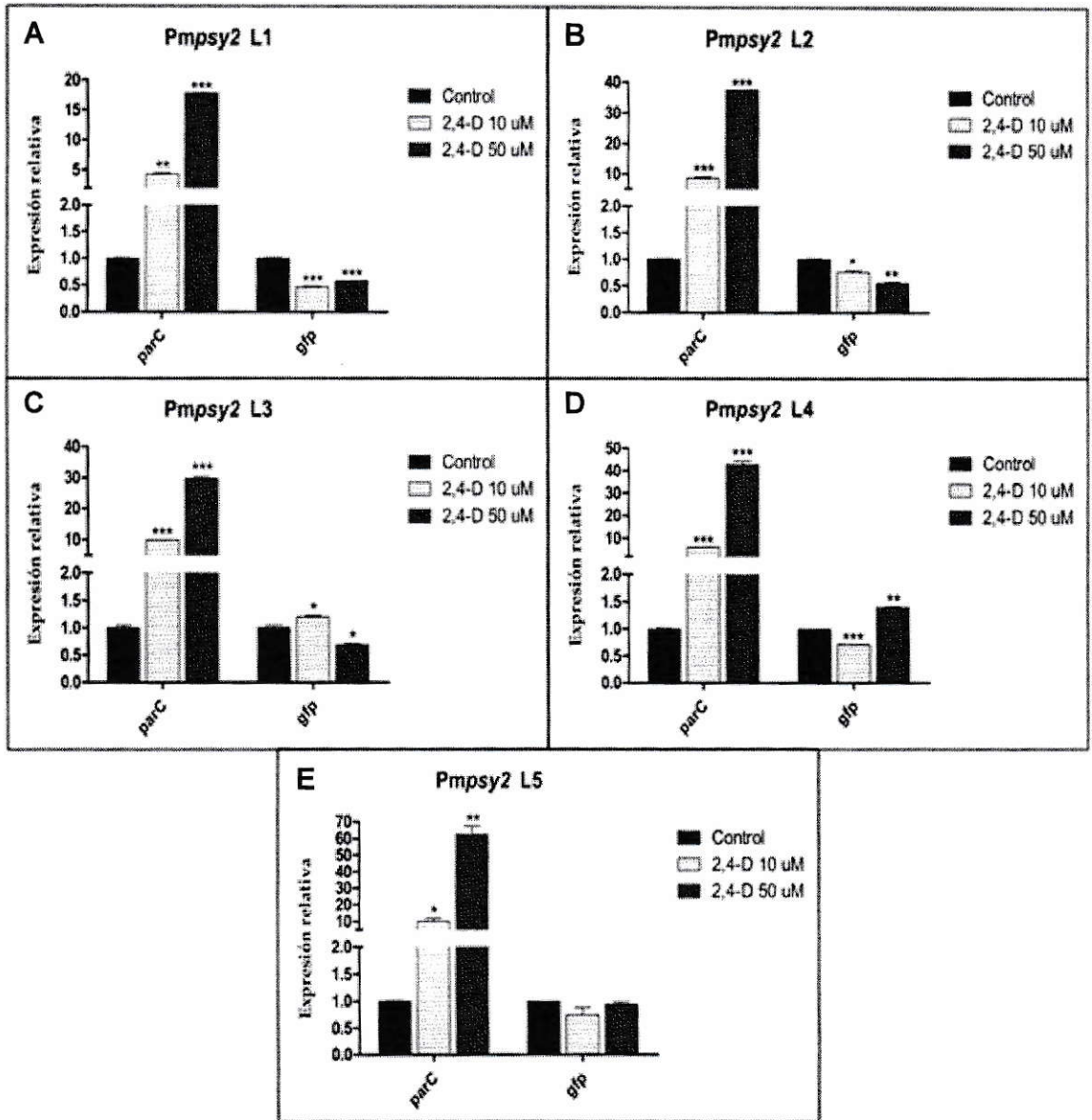
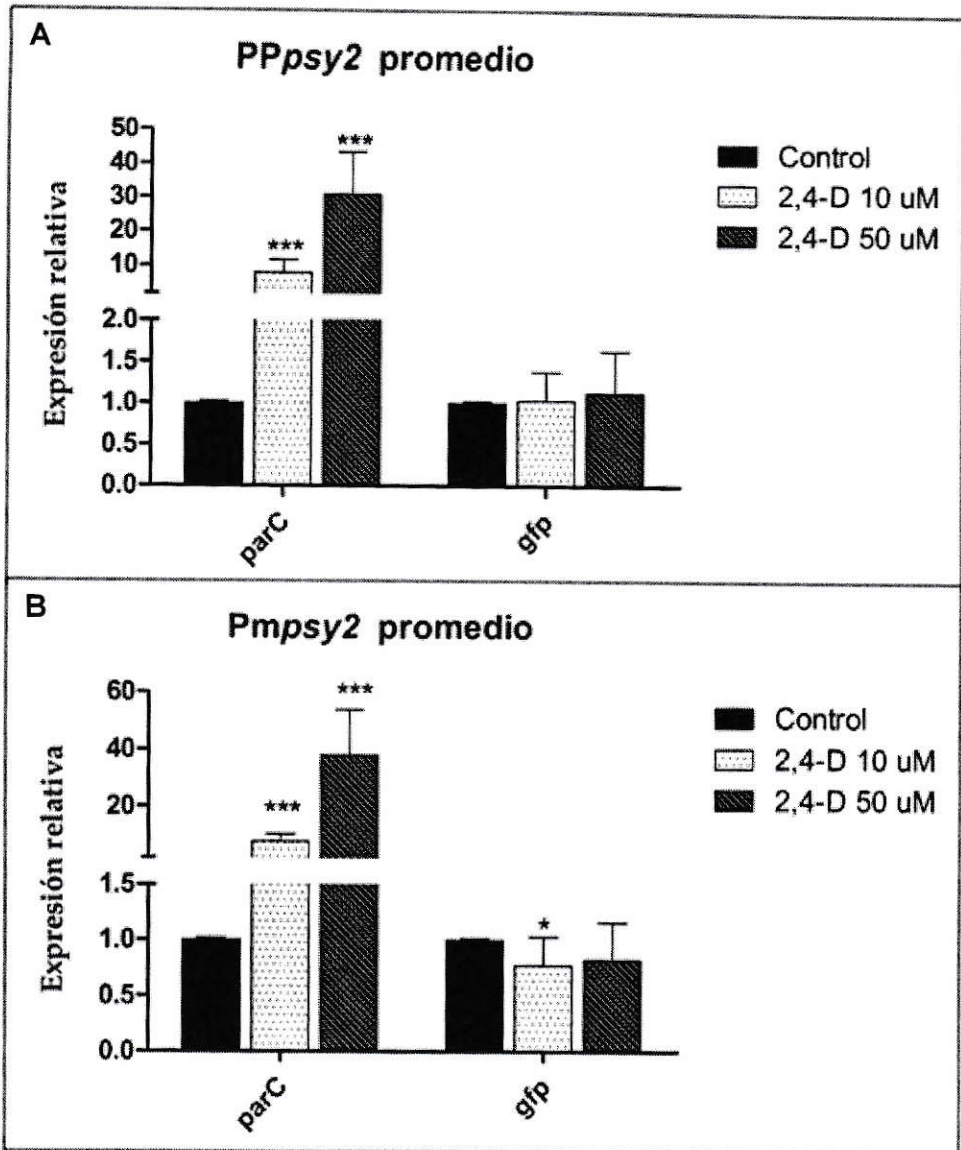


Figura 32: Niveles de expresión de *parC* y *gfp* en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial de *psy2* tratadas con 2,4-D. A-G: Líneas 1, 2 y 6 a 10. Cada valor corresponde al promedio de 2 réplicas técnicas. Todos los valores fueron normalizados con respecto a la expresión de *18S* y calibrados frente a su control. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (tratamiento sin hormona) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figura 33: Niveles de expresión de *parC* y *gfp* en plantas de tabaco transgénicas para el promotor mínimo de *psy2* tratadas con 2,4-D. A-E: Líneas 1 a 5. Cada valor corresponde al promedio de 2 réplicas técnicas. Todos los valores fueron normalizados con respecto a la expresión de *18S* y calibrados frente a su control. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (tratamiento sin hormona) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .**

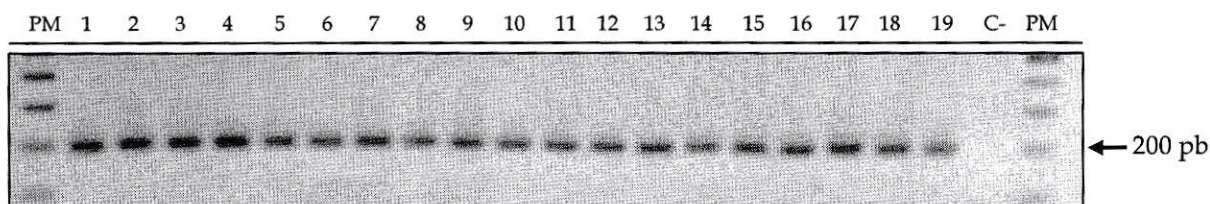


**Figura 34: Niveles promedio de expresión de *parC* y *gfp* en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial y mínimo de *psy2* tratadas con 2,4-D.** A: Promedio de las 7 líneas transformadas con el promotor parcial de *psy2* B: Promedio de las líneas 1, 2 y 5 transformadas con el promotor mínimo de *psy2*. Todos los valores fueron normalizados con respecto a la expresión de 18S y calibrados frente a su control (tratamiento sin hormona). Asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (tratamiento sin hormona) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.8.3 Efecto del ABA en la expresión de *gfp* en plantas de tabaco transgénicas portadoras del promotor parcial de *lcyb1*

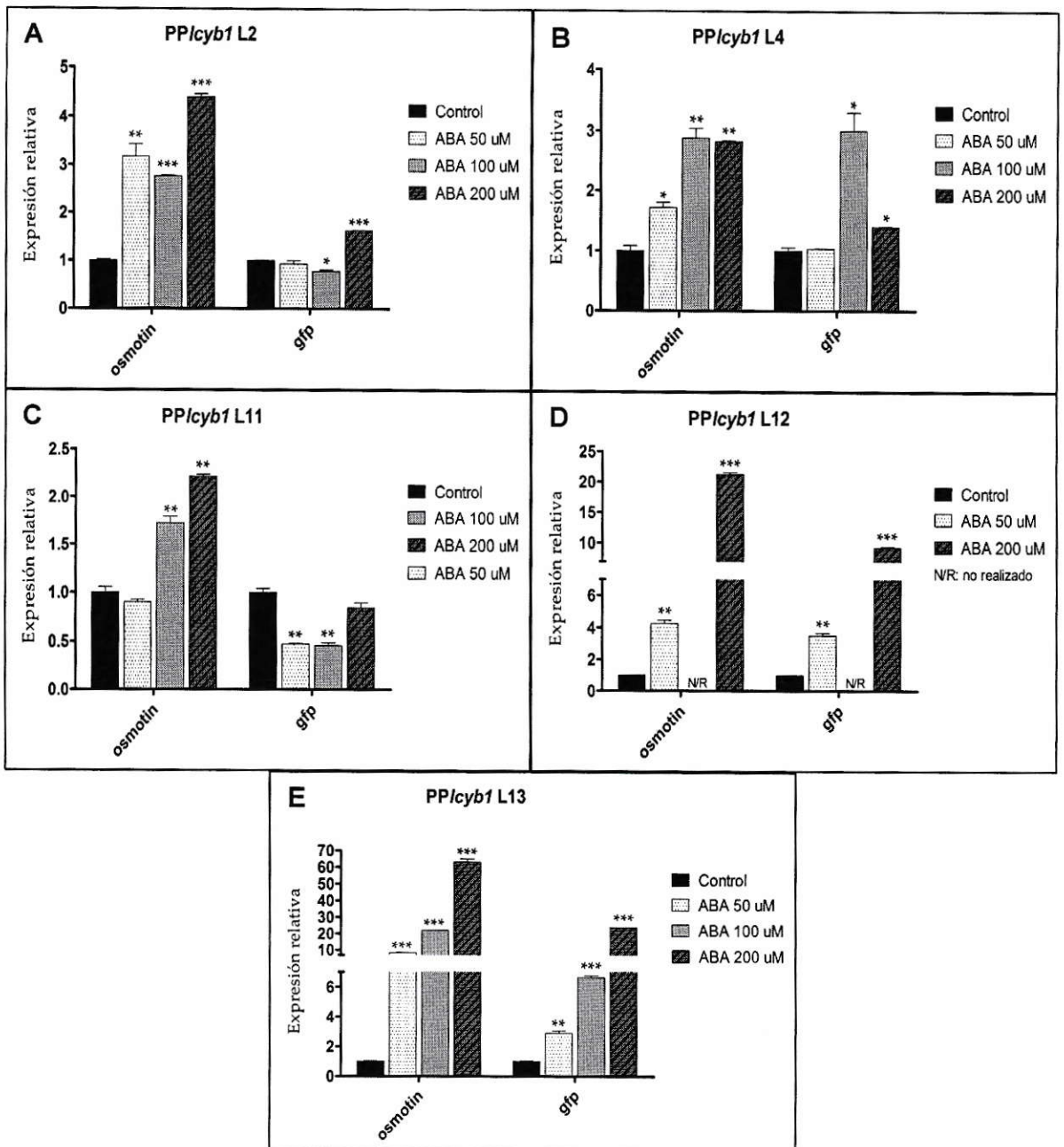
Considerando que el gen *lcyb1* presentó una inducción mediada por ABA en plántulas de zanahoria silvestres (Fig. 26A), se evaluó el efecto de esta hormona en la actividad del promotor parcial de *lcyb1* en plantas de tabaco transgénicas.

Luego de la síntesis de los cDNAs correspondientes, su calidad se evaluó mediante PCR del gen constitutivo *18S* (Figura 35).

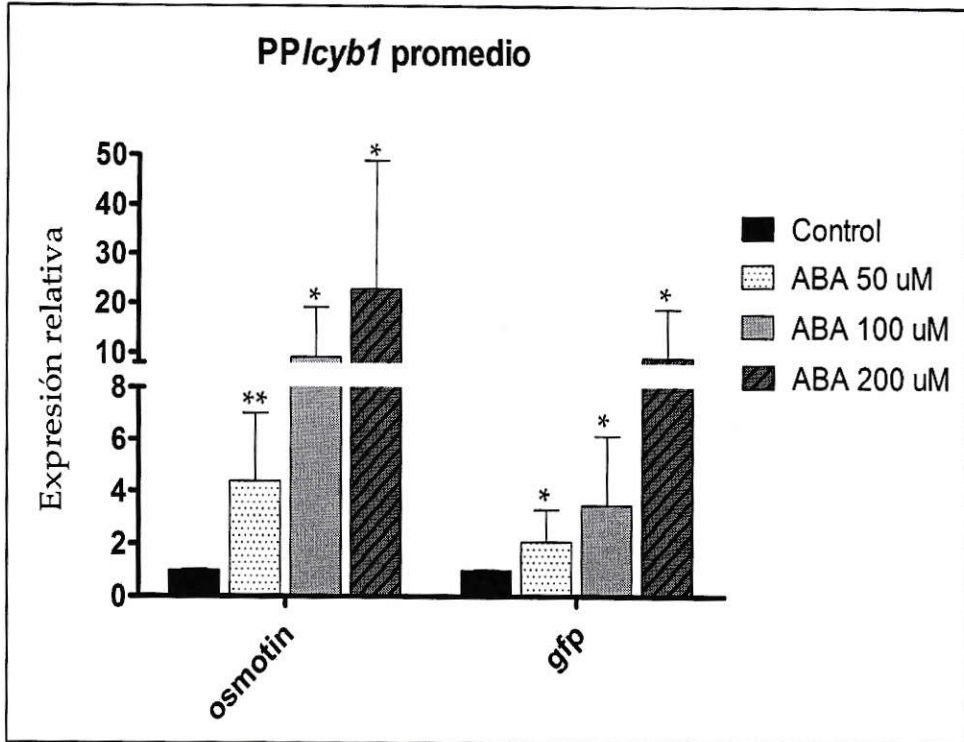


**Figura 35: Amplificación del gen *18S* a partir de cDNAs de hojas de tabacos transgénicos para el promotor parcial de *lcyb1* tratadas con ABA.** 1 a 12: cDNAs del tratamiento control, ABA 50, 100 y 200  $\mu$ M en las líneas 2, 4 y 11. 13-15: cDNAs del tratamiento control, ABA 50 y 200  $\mu$ M en la línea 12. 16-19: cDNAs del tratamiento control, ABA 50, 100 y 200  $\mu$ M en la línea 13. Fragmento esperado: 196 pb. PM: marcador de peso molecular.

Al igual que para el promotor parcial de *psy2* (Figura 30A), en este caso se observó una inducción del gen control *osmotin* (entre 1,7 y 63 veces) en las 5 líneas independientes evaluadas, indicando que el tratamiento hormonal se realizó correctamente. En 4 de las 5 líneas evaluadas se observó a su vez una inducción del gen reportero *gfp* (entre 1,4 y 24 veces), lo cual indica que el promotor de *lcyb1* es inducible por ABA, al igual que el promotor parcial de *psy2*. Esta respuesta se observa más claramente al graficar el promedio de los niveles de expresión de *osmotin* y *gfp* de las 4 líneas inducidas (Figura 37), los cuales presentan la misma curva de inducción, que ocurre de manera dosis dependiente.



**Figura 36:** Niveles de expresión de *osmotin* y *gfp* en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial de *lcyb1* tratadas con ABA. A-E: Líneas 2, 4, 11, 12 y 13. Cada valor corresponde al promedio de 2 réplicas técnicas. Todos los valores fueron normalizados con respecto a la expresión de *18S* y calibrados frente a su control. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (tratamiento sin hormona) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

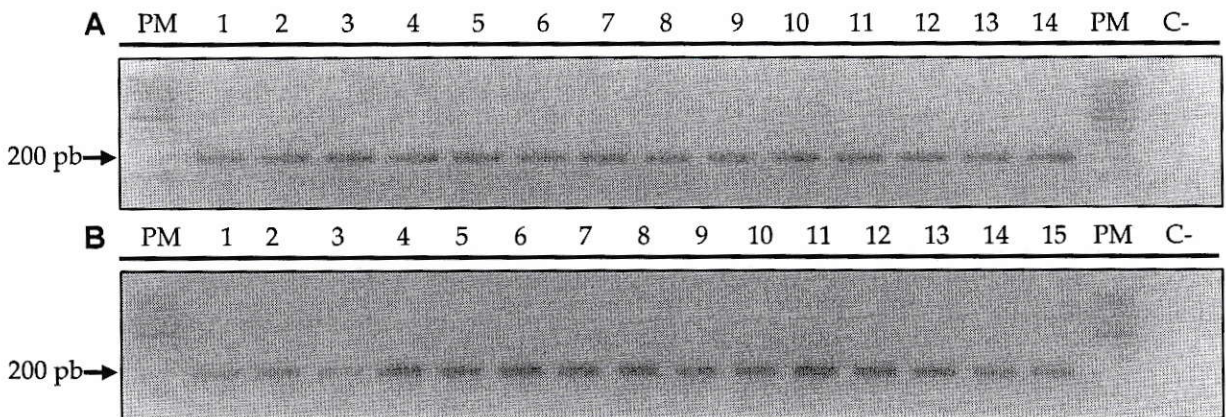


**Figura 37: Niveles de expresión promedio de *osmotin* y *gfp* en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial de *lcyb1* tratadas con ABA.** Los valores corresponden al promedio de la expresión del gen *osmotin* y *gfp* en las 4 líneas de tabaco transgénicas para PPlcyb1 que presentaron una inducción del gen reportero *gfp* en presencia de ABA. Todos los valores fueron normalizados con respecto a la expresión de *18S* y calibrados frente a su control. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (tratamiento sin hormona) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

### 3.8.4 Efecto del GA3 en la expresión de *gfp* en plantas de tabaco transgénicas portadoras de los promotores parciales y mínimos de *lcyb1*

De manera análoga y considerando la inducción que presentó el gen *lcyb1* en respuesta a GA3 en las plántulas silvestres de zanahoria, se evaluó si los promotores parciales y mínimos de este gen eran capaces de ser inducidos por esta hormona en plantas de tabaco transgénicas.

Primeramente, se verificó la calidad y uniformidad del cDNA sintetizado a partir de las muestras foliares de los tabacos transgénicos (T0) tratados con dos concentraciones de GA3 mediante la amplificación del gen *18S*, como se ilustra en la figura 38.



**Figura 38: Amplificación del gen *18S* a partir de cDNAs de hojas de tabacos transgénicos para el promotor parcial y mínimo de *lcyb1* tratadas con GA3.** A: Plantas de tabaco transformadas con el promotor parcial de *lcyb1* y tratadas con GA3. 1-2: línea 4 del promotor parcial de *lcyb1* tratada con GA3 50 uM y control; 3-14: líneas 5, 7 y 10 del promotor parcial de *lcyb1* tratadas con GA3 50 y 100 uM, y control. B: Plantas de tabaco transformadas con el promotor mínimo de *lcyb1*, tratadas con GA3. 1 a 15: líneas 1, 2, 3, 4, 6 y 7 tratadas con GA3 50 y 100 uM, y control. Fragmento esperado: 196 pb. PM: marcador de peso molecular.

A diferencia de lo ocurrido para los tratamientos de ABA y 2,4-D, en este caso no fue posible encontrar un gen control propio de tabaco que se indujera o reprimiera



en respuesta a GA3. Sin embargo, afortunadamente la respuesta de las plantas presentó una tendencia relativamente clara.

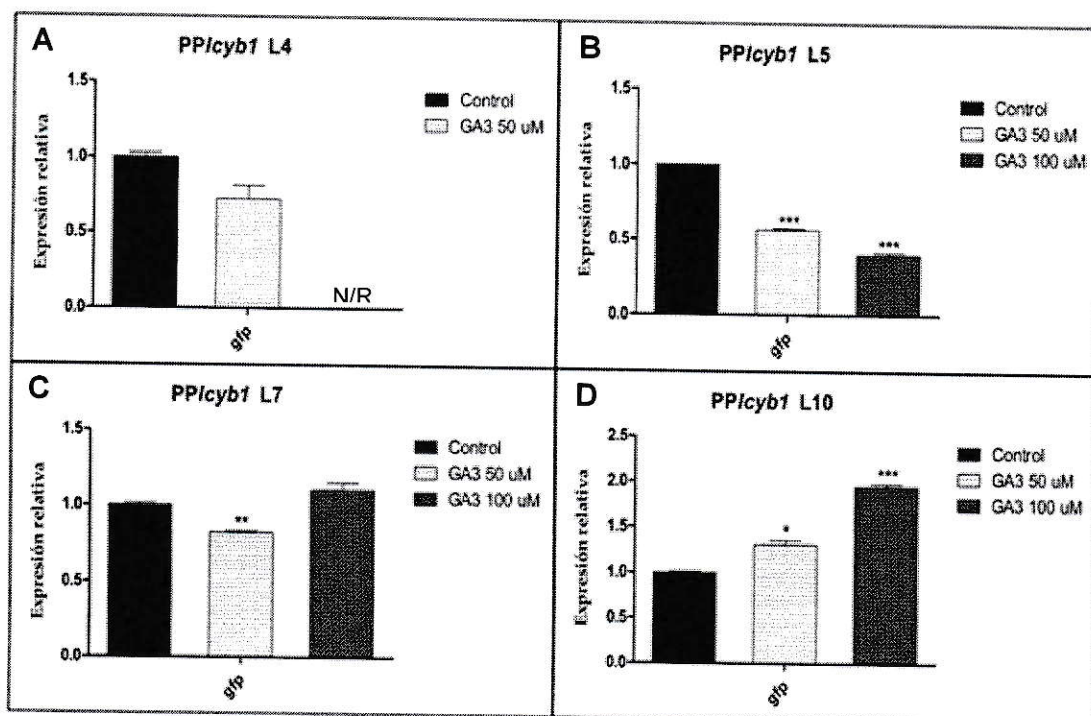
En la figura 39 se observa que las líneas 5 y 7 de las plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial de *lcyb1* presentan una represión significativa de la expresión de *gfp* en presencia de GA3 (de 60% y 20%, respectivamente), y la línea 4 presenta una tendencia similar. La línea 10, en cambio, fue la única que presentó una tendencia opuesta, al inducirse la expresión de *gfp* tras los tratamientos con 50 y 100 uM de GA3 (30% y 95%, respectivamente).

En las plantas transgénicas para el promotor mínimo de *lcyb1* (Figura 40) se observó prácticamente la misma respuesta, caracterizada por la represión de *gfp* en las líneas 1, 2, 4 y 7, en 1 o ambas concentraciones evaluadas. La línea 6 muestra la misma tendencia de represión y solo la línea 3 se comportó de manera opuesta, observándose la inducción de *gfp* en GA3 100 uM.

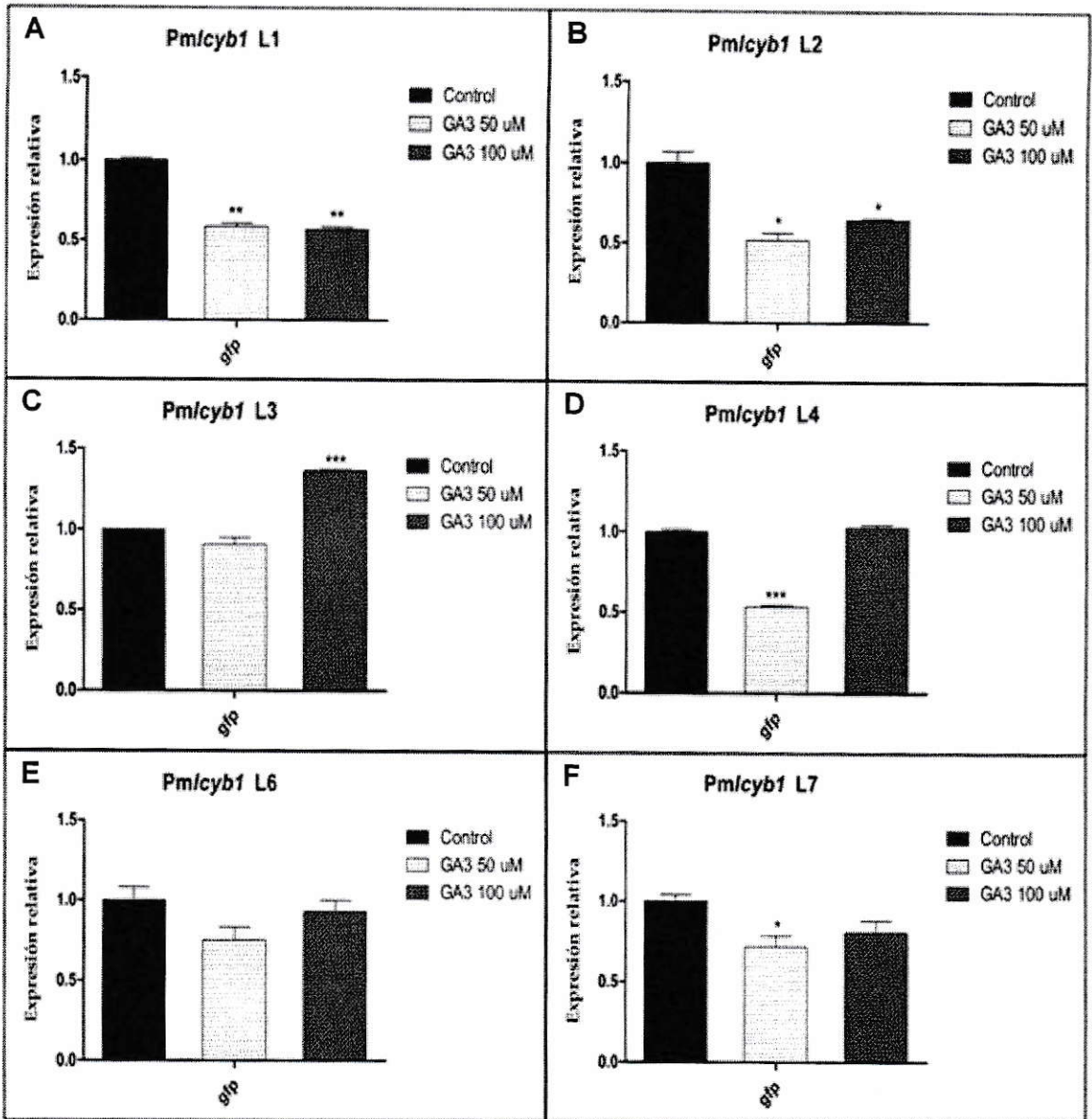
Para observar más claramente estas respuestas, en la figura 41 se graficó el promedio de la expresión de *gfp* en las plantas portadoras del promotor parcial y mínimo de *lcyb1* tratadas con GA3. Se excluyeron de este análisis las líneas 10 del promotor parcial y la línea 3 del promotor mínimo, que fueron las únicas que presentaron una tendencia contraria a la mayoría de las plantas analizadas (al inducir la expresión de *gfp* en presencia de la hormona).

De esta figura es posible concluir que tanto el promotor parcial como el mínimo de *lcyb1* se reprimen levemente en presencia de GA3 (30% aproximadamente), lo que contrasta con la inducción del gen *lcyb1* observada en las zanahorias silvestres.

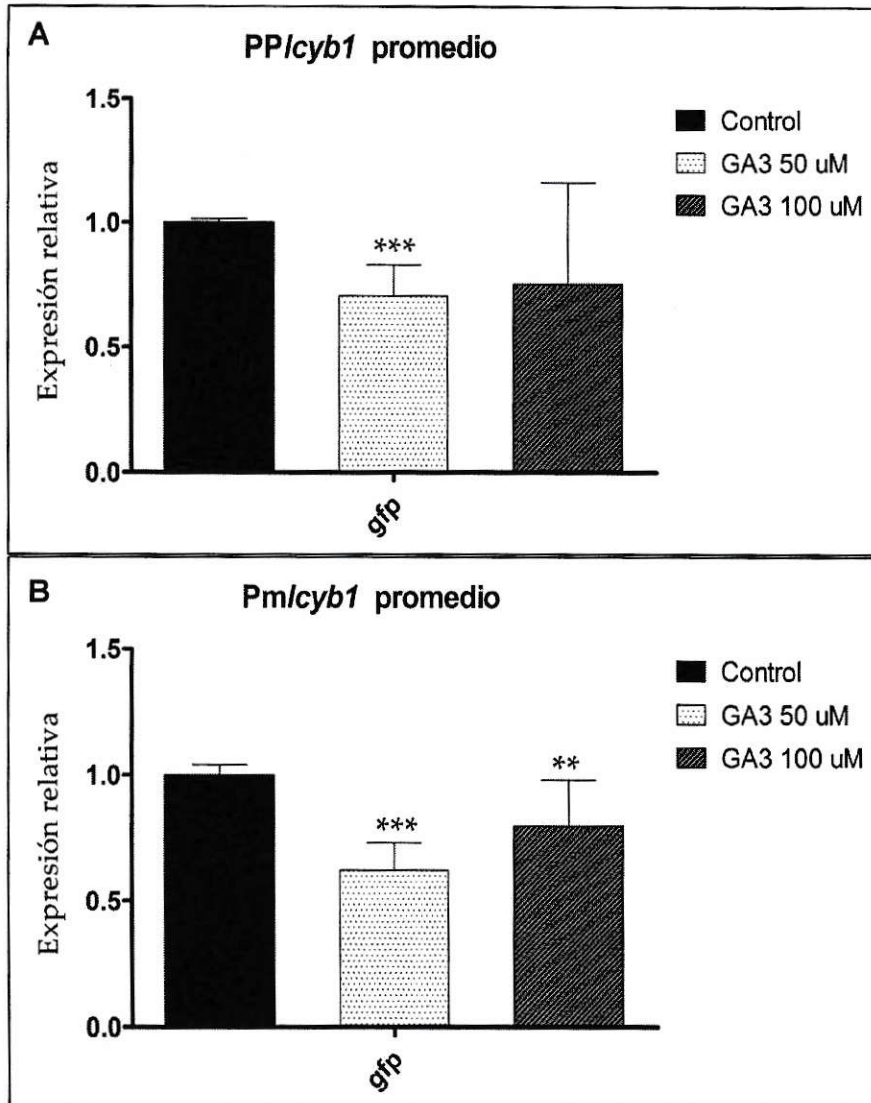
Considerando el análisis de los motivos regulatorios encontrados bioinformáticamente (Tabla I), no se esperaba una respuesta del promotor parcial ni del mínimo de *lcyb1* en presencia de GA3, ya que los motivos de respuesta a giberelinas se encuentran río arriba de ambos promotores. La leve represión observada tanto en plantas portadoras del promotor parcial como del mínimo en presencia de GA3 da indicios de la presencia del algún elemento represor en ellos, que no fue identificado computacionalmente.



**Figura 39: Niveles de expresión de *gfp* en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial de *lcyb1* tratadas con GA3. A-D: Líneas 4, 5, 7 y 10. Cada valor corresponde al promedio de 2 réplicas técnicas. Todos los valores fueron normalizados con respecto a la expresión de *18S* y calibrados frente a su control. N/R: no realizado. Asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (tratamiento sin hormona) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .**



**Figura 40: Niveles de expresión de *gfp* en plantas de tabaco transgénicas para el promotor mínimo de *Icyb1* tratadas con GA3. A-F: Líneas 1 a 4, 6 y 7. Cada valor corresponde al promedio de 2 réplicas técnicas. Todos los valores fueron normalizados con respecto a la expresión de *18S* y calibrados frente a su control. Asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (tratamiento sin hormona) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .**

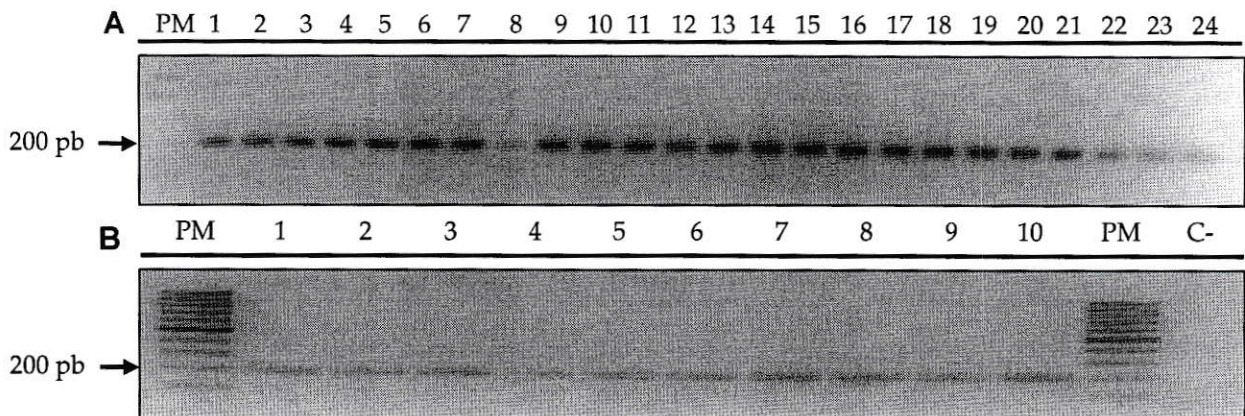


**Figura 41: Niveles de expresión promedio de *gfp* en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial y mínimo de *lcyb1* tratadas con GA3.** A: Promedio de la expresión de *gfp* en las líneas 4, 5 y 7 transgénicas para el promotor parcial de *lcyb1*; B: Promedio de la expresión de *gfp* en las líneas 1, 2, 4, 6 y 7 transgénicas para el promotor mínimo de *lcyb1*. Todos los valores fueron normalizados con respecto a la expresión de *18S* y calibrados frente a su control (tratamiento sin hormona). Asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.8.5 Inducción por luz de la expresión de *gfp* en plantas de tabaco transgénicas portadoras de los promotores parciales y mínimos de *psy2* y *lcyb1*

Como último estímulo a analizar se escogió la luz, debido al elevado número de elementos de respuesta a éste, presentes en los promotores de los genes *psy2* y *lcyb1* (Figura 11A, Tabla I).

Primeramente, en la figura 42 se ilustra la amplificación homogénea del gen *18S*, indicativo de la calidad y uniformidad de los cDNAs sintetizados.



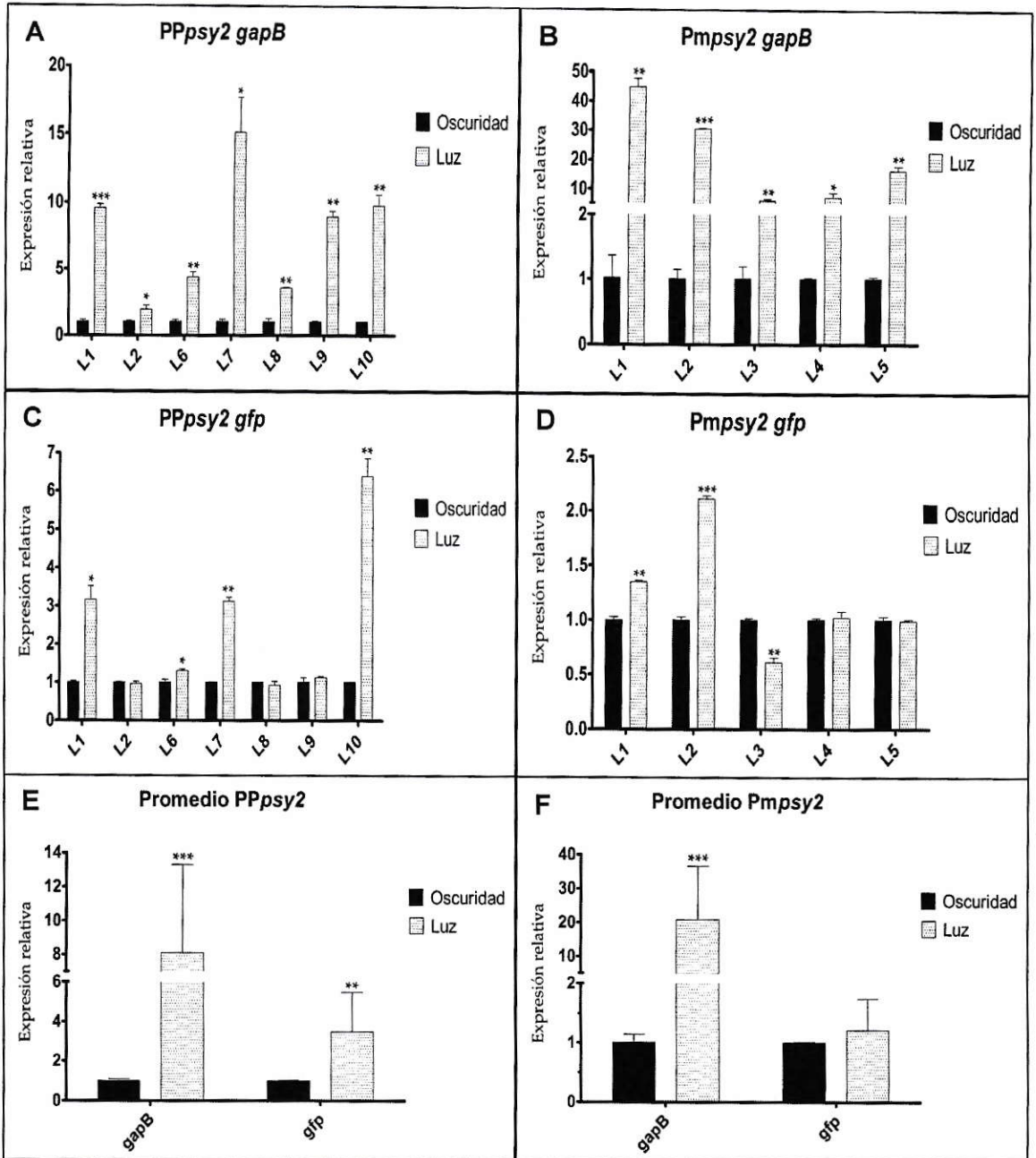
**Figura 42: Amplificación del gen *18S* a partir de cDNAs de hojas de tabacos transgénicos para el promotor parcial y mínimo de *psy2* y *lcyb1* inducidos por luz.** A: Plantas de tabaco transformadas con el promotor parcial y mínimo de *psy2*, en oscuridad y luz; 1 a 7 y 13 a 19: líneas 1, 2, 6, 7, 8, 9, y 10 del promotor parcial de *psy2* en oscuridad y luz, respectivamente; 8 a 12 y 20 a 24 líneas 1, 2, 3, 4 y 5 del promotor mínimo de *psy2* en oscuridad y luz, respectivamente.; B: Plantas de tabaco transformadas con el promotor parcial y el mínimo de *lcyb1*, en oscuridad y luz; 1 a 3 y 6 a 8: líneas 4, 5 y 10 del promotor parcial de *lcyb1*, en oscuridad y luz, respectivamente; 4-5 y 9-10: líneas 3 y 7 del promotor mínimo de *lcyb1*, en oscuridad y luz, respectivamente. Fragmento esperado: 196 pb. PM: marcador de peso molecular.

En la figura 43 se observa la inducción mediada por luz del gen *gapB* (normalmente inducido por este estímulo en tabaco (Shih y Goodman, 1988), en las 7 líneas de tabaco transgénicas para el promotor parcial de *psy2* (Fig. 43A) y en 5 líneas del promotor mínimo de *psy2* (Fig. 43B), corroborándose que el tratamiento de

inducción por luz aplicado (sección 2.8) fue efectivo. En la figura 43C es posible observar la inducción por luz del gen reportero *gfp* en 4 de las 7 líneas de PP*psy2* analizadas (líneas 1, 6, 7 y 10). Si bien estas presentaron distintos niveles de inducción (entre 0,3 y 6,5 veces), estos se correlacionan con los niveles de inducción del gen control *gapB* para las distintas líneas. Esta tendencia de inducción se observa más claramente al graficar el promedio de expresión de *gapB* y *gfp* en las 4 líneas inducidas (Fig. 43E). Por el contrario, no se observa una tendencia clara para las líneas transgénicas para el promotor mínimo de *psy2*, de las cuales algunas se inducen y otras se reprimen (Fig. 43D), lo cual se ve reflejado más claramente al graficar el promedio de expresión de todas estas líneas, donde los niveles de *gapB* aumentan pero los de *gfp* permanecen inalterables (Fig. 43F), indicando que el promotor mínimo de *psy2* no responde a luz.

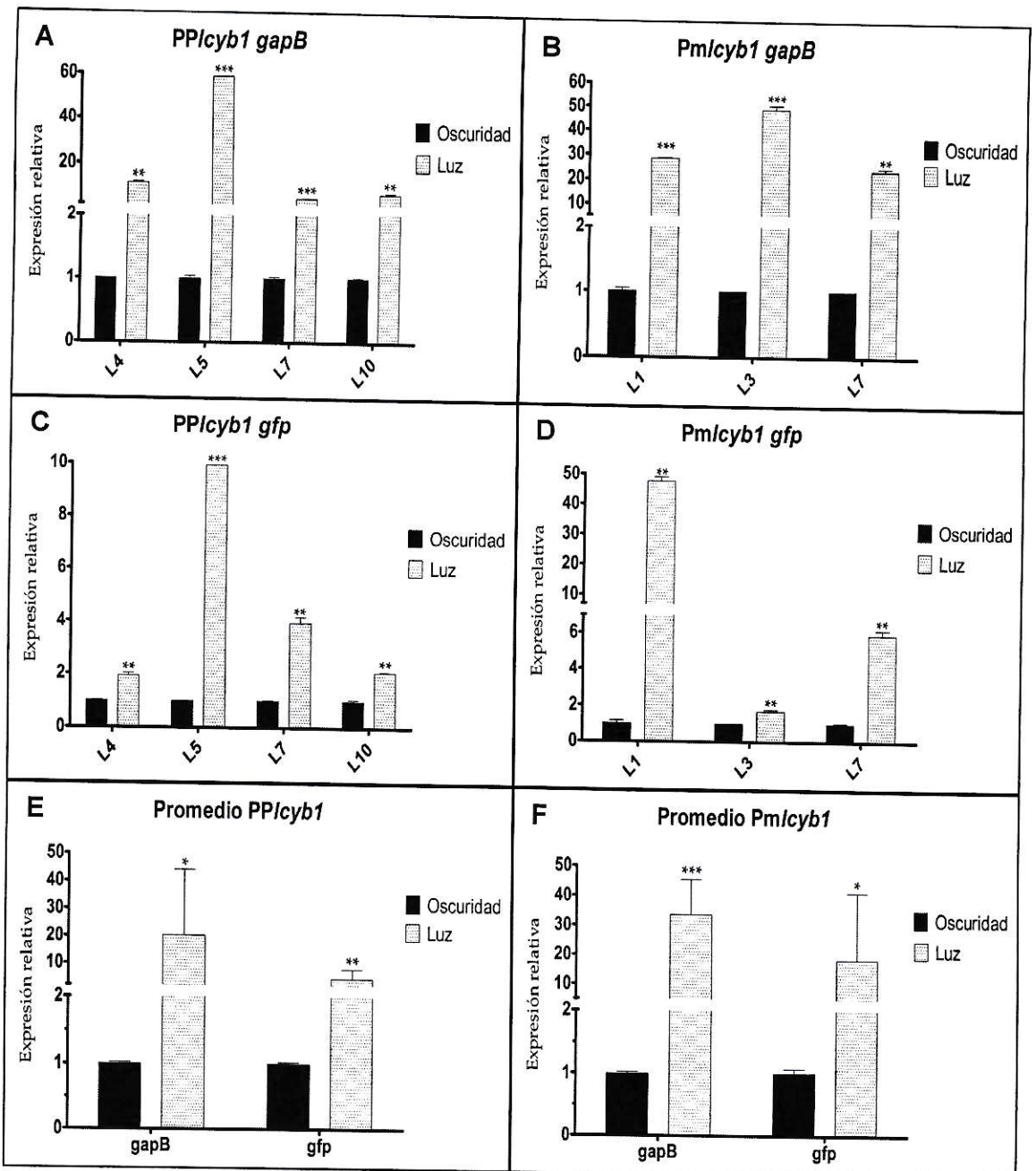
De manera análoga, en la figura 44 se observa la inducción por luz de las plantas transgénicas para los promotores parciales y mínimos de *lcyb1*. Nuevamente se observa la inducción del gen *gapB* en todas las líneas evaluadas. Las 4 líneas transgénicas para el promotor parcial de *lcyb1* presentaron una inducción de *gfp*, con niveles variables entre 2 y 10 veces (Fig. 44C), que se correlacionan con los niveles de inducción de *gapB* en cada línea (Fig. 44A). De igual manera, las 3 líneas del promotor mínimo de *lcyb1* presentaron una inducción de *gfp* de entre 1,7 y 48 veces (Fig. 44D), aunque en este caso no hay una correlación directa entre los niveles de expresión de *gfp* y de *gapB* en las líneas evaluadas (Fig. 44 B y D). En las figuras 44 E y F se observa el promedio de los niveles de expresión de *gapB* y *gfp* en las líneas del promotor parcial de *lcyb1* y del mínimo, respectivamente, corroborándose la inducción por luz de ambos promotores.

De lo anterior se concluye que los promotores parciales de *psy2* y *lcyb1*, y el promotor mínimo de *lcyb1*, se inducen por luz, lo que se correlaciona con los elementos de respuesta a luz presentes en estos promotores.



**Figura 43: Niveles de expresión de *gfp* en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial y mínimo de *psy2* luego de un tratamiento de inducción por luz.** A y C: Expresión del gen control *gapB* y de *gfp* en 7 líneas transgénicas independientes para PPpsy2. E: expresión promedio de *gapB* y *gfp* de las 7 líneas transgénicas independientes para PPpsy2. B y D: Expresión del gen control *gapB* y de *gfp* en 5 líneas transgénicas independientes para Pmpsy2. F: expresión promedio de *gapB* y *gfp* de las 5 líneas transgénicas independientes para Pmpsy2. Cada valor corresponde al promedio de 2 réplicas técnicas. Todos los valores fueron normalizados con respecto a la expresión de *18S* y calibrados frente a su control. Asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (tratamiento sin hormona) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .





**Figura 44: Niveles de expresión de *gfp* en plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial y mínimo de *lcyb1* luego de un tratamiento de inducción por luz.** A y C: Expresión del gen control *gapB* y de *gfp* en 4 líneas transgénicas independientes para PP*lcyb1*. E: expresión promedio de *gapB* y *gfp* de las 4 líneas transgénicas independientes para PP*lcyb1*. B y D: Expresión del gen control *gapB* y de *gfp* en 3 líneas transgénicas independientes para Pm*lcyb1*. F: expresión promedio de *gapB* y *gfp* de las 3 líneas transgénicas independientes para Pm*lcyb1*. Cada valor corresponde al promedio de 2 réplicas técnicas. Todos los valores fueron normalizados con respecto a la expresión de *18S* y calibrados frente a su control. Asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (tratamiento sin hormona) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## DISCUSIÓN

### 4.1 Identificación de las regiones promotoras de *lcyb1* y *psy2*

El primer objetivo de este trabajo consistió en la identificación de las regiones promotoras de los genes *psy2* y *lcyb1*, obteniendo para cada gen, un promotor de 769 y de 1850 pb, respectivamente. Estos promotores fueron obtenidos a partir de una amplificación por GenomeWalker en el caso del de *psy2* y por medio de 2 amplificaciones sucesivas en el caso del promotor de *lcyb1*. La confirmación de que las secuencias obtenidas mediante la técnica de GenomeWalker corresponden efectivamente a las regiones promotoras de *psy2* y *lcyb1* viene dada por la presencia de una secuencia nucleotídica contenida entre el adaptador del GenomeWalker en su extremo 5' y el partidor en antisentido diseñado dentro de la región 5'NTR, específica de cada gen, además de un cierto número de pares de bases de la región 5'NTR río arriba del partidor antisentido (Figura 7; sección 2.4.7). La presencia del partidor en antisentido y las bases conocidas río arriba de este confirman que la secuencia obtenida corresponde efectivamente a la región promotora de cada gen, ya que la región 5'NTR de los genes corresponde a una especie de "huella digital" de estos, con un porcentaje de identidad con otras secuencias menor al 50%. Por ejemplo, para los genes parálogos *psy1* y *psy2* de zanahoria, la identidad de sus regiones 5'NTR es de un 24,7% y la de sus regiones 3'NTR de un 35%. En el caso del promotor de *lcyb1*, este se obtuvo mediante dos amplificaciones sucesivas por GenomeWalker. La segunda de estas se llevó a cabo utilizando un partidor en antisentido diseñado dentro de la primera región promotora identificada, por lo que en este caso la identidad de la segunda secuencia obtenida se corrobora por la presencia del segundo partidor

antisentido y de las bases sobrelapadas entre ambas regiones promotoras identificadas (Figura 9).

En plantas, el largo de las regiones promotoras es muy variable y depende tanto del organismo como del tipo de genes. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* el largo promedio de los promotores en su genoma es de 1,1 kb, mientras que los promotores de los genes de respuesta a estrés abiótico poseen promotores de 1,6 kb en promedio (Kristiansson y col., 2009). Por otra parte, el tamaño de los promotores se correlaciona también directamente con el número de estímulos a los cuales responde determinado gen en *C.elegans*, *D.melanogaster* y *A. thaliana* (Nelson y col., 2004; Walther y col., 2007). Además, promotores que poseen una caja TATA son de mayor tamaño y responden a un mayor número de estímulos que los que carecen de ella (Walther y col., 2007).

Considerando lo anterior, el promotor parcial clonado de *lcyb1* (1.051 pb) sería de un buen tamaño, mientras que el promotor parcial de *psy2* (769 pb) se encontraría levemente por debajo del promedio. Sin embargo, ambos fueron capaces de dirigir la expresión del gen reportero *gfp* y de responder a diversos estímulos, particularmente a ABA y luz.

El promotor total identificado para *lcyb1* se obtuvo a partir de dos amplificaciones sucesivas mediante Genome Walker (sección 2.4.7, Figuras 7B y 9). Para *psy2* solo fue posible obtener un fragmento de 769 pb a partir de la primera amplificación. No se obtuvo un fragmento de mayor tamaño posiblemente porque el fragmento de promotor de *psy2* río arriba del identificado fue digerido por las enzimas utilizadas para generar las 4 bibliotecas de digestión (BD, sección 2.4.7), o debido a

que no se lograron establecer las condiciones de PCR adecuadas para su amplificación o bien, a que la región de la cromatina donde se encuentra es de difícil acceso para la DNA polimerasa o de alto contenido de las bases G-C, lo que dificulta su amplificación (GenomeWalker™, Universal Kit, User Manual). Actualmente, se está intentando obtener esa región mediante una técnica alternativa, denominada PCR inverso.

Por otra parte, si bien se logró identificar un fragmento promotor de 1.850 pb para *lcyb1*, este no se logró amplificar desde el DNA genómico de zanahoria, luego de numerosos intentos. Mediante análisis de secuencia constatamos que el promotor completo corresponde efectivamente al promotor de *lcyb1* de *D. carota* ya que el promotor parcial de *lcyb1*, el cual sí se logró amplificar desde DNA genómico, comienza dentro de la segunda región del promotor de *lcyb1* (más río arriba) (sección 2.4.7, Figura 10). La dificultad para amplificar el promotor completo identificado podría deberse a que se encuentra en una zona de alta compactación de la cromatina. El porcentaje de G-C muy alto (sobre 60%) también dificulta las amplificaciones, sin embargo, el % de G-C de esta región es de 48%, por lo que este efecto podría descartarse, debido a que se probaron diferentes condiciones de PCR. A futuro se intentará amplificar este promotor utilizando un set de partidores río abajo del diseñado actualmente (PP/*lcyb1* F, Tabla V), y mediante PCR inverso.

## 4.2 Los promotores de los genes *lcyb1* y *psy2* de *D. carota* presentan varios elementos de respuesta a luz, fitohormonas y estrés

Tras la identificación de las regiones promotoras, estas fueron evaluadas bioinformáticamente para identificar los motivos regulatorios presentes en ellas. Para tal fin, existe una amplia gama de programas bioinformáticos, siendo el más conocido el programa PLACE. Sin embargo, este programa no realiza ningún tipo de filtro de las secuencias encontradas y por lo tanto es más probable que arroje resultados poco precisos. Por esta razón, se decidió utilizar el programa Motifscanner (sección 2.5), el cual identifica las regiones regulatorias presentes en dos o más genes co-expresados o co-regulados (Aerts y col., 2003). Los genes *psy2* y *lcyb1* de *D. carota* se co-expresan durante el desarrollo de la raíz modificada (Figura 3), lo cual los hace adecuados para este tipo de análisis.

La presencia de un gran número de elementos de respuesta a luz encontrados dentro de los promotores de los genes *psy2* y *lcyb1* de zanahoria (Tabla I, Figura 11A), puede relacionarse con la importancia de los carotenoides tanto en la captación de luz durante la fotosíntesis como en la disipación del exceso de la energía lumínica mediante el ciclo de las xantófilas (Niyogi, 1999; Demmig-Adams y col., 1996; Pogson y col., 2006; Demmig-Adams y Adams, 2006; Dall'Osto y col., 2010), lo que implicaría una respuesta de estos genes frente a este estímulo. Apoyando lo anterior, nosotros observamos que los genes *psy2* y *lcyb1* se expresan en las hojas de zanahoria normalmente expuestas a este estímulo (Figura 3) y que la luz modula su expresión en la raíz, induciendo su expresión en raíces de plantas jóvenes (4 y 8 semanas de desarrollo) expuestas a luz y reprimiéndola en plantas adultas (Fuentes, 2009). En otros modelos vegetales, se ha reportado que la mayor parte de los genes

carotenogénicos son inducidos por la luz durante la de-etiolación de plántulas. Por ejemplo, la expresión del gen de la IPP isomerasa es inducido durante la transición de etioplastos de maíz a cloroplastos por exposición a la luz (Albrecht y Sandmann, 1994), al igual que la expresión del gen *psy* durante la de-etiolación de plántulas de *Arabidopsis*, mediante la participación de fitocromo (von Lintig y col., 1997; Welsch y col., 2000; Rodríguez- Villalón, 2009 a y b; Toledo-Ortiz y col., 2010; Pizarro y Stange 2009). La expresión de los genes carotenogénicos es inducida durante el estrés lumínico y por diferentes tipos de luz (Hirschberg, 2001; Rossel y col., 2002; Welsch y col., 2008; Li y col., 2008), favoreciéndose la síntesis de xantófilas de la rama  $\beta$ , de vital importancia para la disipación del exceso de energía lumínica. Por otra parte, y probablemente debido a la importancia de los carotenoides en el proceso fotosintético, se ha reportado que el gen *psy*, el principal gen responsable de la activación de la ruta carotenogénica, se co-expresa con varios genes asociados a la fotosíntesis, tales como los genes de la plastoquinona, el complejo de la NAD(P)H deshidrogenasa, la tiorredoxina, la plastocianina y la ferredoxina, así como con proteínas estructurales de los fotosistemas I y II (Meier y col., 2011).

El elemento de respuesta a luz (LRE): ATCTA, identificado en ambos promotores (Figura 10), también se encuentra en el promotor del gen *psy* de *Arabidopsis thaliana* donde se ha demostrado su funcionalidad (Welsch y col., 2003). Este elemento ha sido propuesto además como regulador general tanto de la ruta carotenogénica como de genes asociados a procesos fotosintéticos, ya que está presente en los promotores de los genes carotenogénicos *dxs* y *psy* de *A. thaliana* y *pds* de tomate (*Solanum lycopersicum*) y maíz (*Zea mays*), así como en los genes *cab* (que codifican para la proteína de unión a clorofila a/b) de mostaza (*Sinapis alba*) y

*Arabidopsis thaliana* y en los genes *pc* (que codifican para la plastocianina) de *Arabidopsis thaliana* y arveja (Welsch y col., 2003).

Por otra parte, las cajas G (G-box) han sido reportadas como importantes mediadoras de la inducción por luz (Ha y An, 1988; Donald y Cashmore, 1990; Puente y col., 1996). En el promotor del gen *psy* de *Arabidopsis*, se concluyó que dos elementos tipo G-Box presentes entre las bases -300 y la caja TATA (elementos G1, de secuencia consenso CACGAG y G2, de secuencia consenso CTCGAG) eran responsables de la respuesta del promotor a diferentes tipos de luz (Welsch y col., 2003; Welsch y col., 2007). Los elementos G-Box, en particular G1, presentes en los promotores de *psy2* y *lcyb1* (Tabla I, sección 3.2), podrían estar involucradas en la inducción por luz de estos genes en las hojas de la zanahoria, naturalmente expuestas a este estímulo, y serían probablemente inactivos en la raíz modificada de ésta.

Otros elementos importantes encontrados en ambos promotores corresponden a elementos *enhancer* (caja CAAT) y cajas TATA putativas (Tabla I), los cuales se encuentran en gran número en los dos promotores en estudio.

En las plantas, los elementos *enhancer* pueden ser funcionales en regiones proximales de los promotores o bien en zonas más alejadas (Sieburth y Meyerovitz, 1997; Clark y col., 2006). Incluso, se ha reportado que elementos *enhancer* por si mismos son capaces de activar la transcripción de un determinado gen, incluso estando ubicados a 3kb del promotor mínimo (Singer y col., 2011). La caja CAAT es un elemento *enhancer* activador de varios promotores de animales y plantas (Maity y de Crombrugghe, 1998) y podría dar cuenta de la elevada expresión del gen *lcyb1* principalmente, tanto en las hojas como en la raíz de la zanahoria (Figura 3).

De los elementos de respuesta a estrés abiótico encontrados en el promotor de *lcyb1*, los elementos DRE y MBS parecen interesantes, debido a que responden a deshidratación y sequía, respectivamente (Tabla I). La escasez de agua ha sido demostrada como capaz de inducir la expresión del gen *psy3* en maíz y arroz (Li y col., 2008; Welsch y col., 2008) mediante la inducción de la síntesis de ABA, hormona reconocida por su acción en la defensa frente a la falta de agua (Swarup y col., 2002). Además, se ha demostrado que el elemento DRE puede actuar como un elemento acoplador a un elemento ABRE, formando un módulo funcional de respuesta frente a la deshidratación mediada por ABA, como ha sido previamente descrito para el promotor del gen *rd29A* de *Arabidopsis thaliana* (Narusaka y col., 2003). Sin embargo, no fue posible evaluar la funcionalidad de estos elementos durante este trabajo, ya que se encuentran río arriba del promotor parcial de *lcyb1*.

En la zanahoria, la expresión de los genes carotenogénicos, especialmente *lcyb1* y *psy2*, se ve aumentada durante el desarrollo de las raíces modificadas en oscuridad, en conjunto con un aumento en los niveles de carotenoides, especialmente  $\beta$ -caroteno (Figuras 2 y 3). Por esta razón, es de esperar que existan estímulos activadores de los promotores de los genes *psy2* y *lcyb1* en la raíz modificada relacionados específicamente con el desarrollo y la inducción de la expresión génica en oscuridad y/o raíces. Estos elementos pueden tener que ver con diversas fitohormonas, dada la influencia de éstas en el desarrollo de diversos órganos vegetales (Kende y Zeevaart, 1997; Kuppusamy col., 2009). Con respecto a lo anterior, se sabe por ejemplo que la hormona ABA es capaz de inducir la expresión del gen *psy* exclusivamente en las raíces de *Arabidopsis*, a través de la activación del factor de transcripción ABI3, lo cual implica a su vez una mayor síntesis de ABA (Rodríguez-



Villalón, en preparación). De manera análoga, la expresión del gen *psy3* de arroz y maíz se ve aumentada por la presencia de ABA, especialmente en la raíces de estas plantas (Welsch y col., 2008; Li y col., 2008), lo que indicaría que el ABA estaría relacionado con la activación de la ruta carotenogénica en las raíces de las plantas, en respuesta a estrés abiótico y/o como un mecanismo de retro-alimentación positiva.

Con respecto a los elementos regulatorios de respuesta a hormonas presentes en los promotores de *psy2* y *lcyb1*, la mayor parte de ellos correspondió a motivos de respuesta a ABA. Dentro de ellos, se encontraron 4 elementos ABRE en el promotor parcial de *lcyb1*, de los cuales 3 se encuentran dentro del promotor mínimo, y 3 en el promotor parcial de *psy2*, dos de los cuales están incluidos en el promotor mínimo. Además, se identificó un elemento acoplador CE3 dentro del promotor parcial de *lcyb1* (Figura 10, Tabla I). Los elementos ABRE por si mismos generalmente son insuficientes para conferir respuesta a ABA, y deben estar asociados con otros ABRE o bien con un elemento acoplador para ser funcionales (Marcotte y col., 1989; Shen y Ho, 1995; Shen y col., 1996; Hobo y col., 1999).

Los elementos ABRE son reconocidos en plantas por los factores de transcripción de la familia b-zip (Guiltinan y col., 1990; Uno y col., 2000; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005), de entre los cuales los más reconocidos son ABI3, ABI4 y ABI5. El ABA induce la expresión del factor ABI5 (Brocard y col., 2002) y ABI3, aunque solo en la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Brady y col., 2003), el cual a su vez es capaz de inducir la expresión de ABI5 (Söderman y col., 2000). Lo anterior indica que estos factores de transcripción actúan en conjunto para mediar los efectos del ABA en varios procesos fisiológicos, tales como la dormancia de las semillas, ramificación de la raíz y diferenciación de plastidios (Brocard y col., 2002; Rohde y col., 2000) y podrían

estar activando los promotores de los genes carotenogénicos *psy2* y *lcyb1* de zanahoria, para aumentar por ejemplo los niveles de los carotenoides precursores del ABA. Lo anterior ya se demostró para el factor ABI3, el cual es capaz de inducir la expresión del gen *psy* de *Arabidopsis thaliana* (Rodríguez-Villalón, en preparación).

Otros elementos regulatorios de respuesta a hormonas presentes en los promotores de *psy2* y *lcyb1* corresponden a los motivos de respuesta a auxina (Tabla I, Figura 11). La relación de las auxinas con la expresión de los genes carotenogénicos ha sido demostrada al observar el aumento de la expresión del gen *nced*, responsable de la síntesis de ABA, por efecto de la auxina IAA (Kraft y col., 2007). Sin embargo, no existen más reportes de la regulación de otros genes carotenogénicos mediada por esta hormona.

Finalmente, se encontraron elementos de respuesta a giberelinas en ambos promotores (4 en cada uno). No existen reportes a la fecha que indiquen un efecto de las giberelinas sobre la expresión de los genes carotenogénicos. Sin embargo, recientemente se reportó la presencia de elementos de respuesta a giberelinas en los promotores de los genes *psy1* y *psy2* de melón (Qin y col., 2011), lo que sienta las bases para un estudio más profundo de la funcionalidad de estos elementos dentro de los promotores de los genes *psy2* y *lcyb1* de zanahoria.

Una posible función de las giberelinas en la ruta carotenogénica deriva de su regulación cruzada con la señalización mediada por luz en la promoción de la fotomorfogénesis (Alabadí y col., 2008; de Lucas y col., 2008; Feng y col., 2008). Durante la de-etiolación, los niveles de giberelinas disminuyen, lo cual inhibe la unión de los factores represores de transcripción PIF a los elementos G-box en diversos

genes inducidos por luz, permitiendo su activación y el desarrollo fotomorfogénico (Kuppusamy y col., 2009). Además, recientemente se reportó que los factores de transcripción PIF, especialmente PIF1, reprimen en oscuridad la expresión del gen *psy* de *Arabidopsis*, disminuyendo a la vez los niveles de carotenoides (Toledo-Ortiz y col., 2010).

Los antecedentes expuestos indican que los promotores de los genes *psy2* y *lcyb1* de *D. carota* serían capaces de responder a una serie de estímulos, lo cual es congruente con la importancia biológica de los carotenoides, y el rol clave de estos genes dentro de la ruta carotenogénica.

El análisis bioinformático es una primera aproximación, pero no siempre predice con asertividad lo que ocurre *in vivo*. Por ejemplo, en el promotor del gen *Dc3* (gen inducible por estrés abiótico) de zanahoria se identificaron 5 elementos ABRE mediante análisis bioinformático, sin embargo, ninguno de ellos resultó ser funcional. En cambio, los autores identificaron un nuevo elemento de secuencia TCGTGT, responsable de la inducción mediada por ABA en este promotor (Chung y col., 2005). Este elemento se encuentra también dentro del promotor identificado en este trabajo para el gen *lcyb1* de zanahoria, en la posición -1.516 con respecto al ATG. Lo anterior evidencia la necesidad de correlacionar la funcionalidad de los elementos predichos computacionalmente con la regulación de los genes *in vivo*.

#### **4.3 Los promotores parciales y mínimos de *lcyb1* y *psy2* son funcionales en plantas de tabaco transformadas transitoriamente**

La verificación de la actividad de los promotores parciales y mínimos de *psy2* y *lcyb1* en hojas de tabaco y en frutos de tomate y pimentón (sección 3.4, Figura 16)

indica que estos promotores son capaces de activarse en diferentes órganos, en particular, órganos ricos en cloroplastos (hojas de tabaco) y órganos con cromoplastos (frutos de tomate y pimentón). Esto se correlaciona con el hecho de que tanto el gen *psy2* como el gen *lcyb1* son expresados en las hojas (ricas en cloroplastos) y en la raíz modificada de zanahoria (Figura 3), cuyas células contienen cromoplastos y da un indicio de la diversidad de estímulos que podrían estar activando estos promotores.

Mediante este ensayo se pudo determinar cualitativamente la presencia del transcrito de *gfp* mediante qRT y de la proteína GFP evidenciado por la fluorescencia de esta proteína en epidermis de tabaco. Sin embargo, no fue posible cuantificar las diferencias en la expresión de los distintos promotores (parciales y mínimos) debido a que los niveles de expresión del gen reportero dependen de la cantidad de células efectivamente transformadas, lo que hace que una cuantificación de los niveles de mensajero sea poco precisa en un ensayo de expresión transitoria.

#### **4.4 Los promotores parciales y mínimos de *lcyb1* y *psy2* son funcionales en plantas de tabaco transformadas establemente**

Los promotores parciales y los mínimos de *psy2* y *lcyb1* fueron capaces de dirigir la expresión de *gfp* en las hojas de las plantas de tabaco transgénicas (Figuras 23 y 24). Sumado al resultado obtenido en las transformaciones transitorias, lo anterior confirma la identidad de estas secuencias como regiones regulatorias funcionales en diversos sistemas heterólogos (hojas de tabaco y frutos de tomate y pimentón). Además indica que estas regiones contendrían elementos activadores de la transcripción en su secuencia que serían reconocidos por factores de transcripción relativamente universales, que estarían presentes tanto en tabaco como en frutos de

tomate y pimentón. Esto sugiere una posible proyección biotecnológica para el uso de estos promotores en diversos modelos vegetales.

Si bien la funcionalidad total de cada promotor debe ser evaluada en zanahoria, con el fin de analizarlos en un ambiente que posee todos los factores necesarios para su activación, la expresión de *gfp* bajo la dirección de los promotores en tabaco permitió definir diferencias en la actividad basal de los promotores parciales y mínimos, así como en su respuesta a diversos estímulos.

De esta manera, fue posible determinar que el promotor parcial de *psy2* posee mayor actividad (reflejada en una mayor expresión del gen reportero *gfp*) que el promotor mínimo de *psy2* (30%, Figura 23). Si bien esta diferencia es significativa, no es tan elevada, lo que indicaría que el promotor mínimo del gen *psy2* es capaz de activar eficientemente la expresión de un gen río abajo en hojas, sugiriendo además que los elementos regulatorios presentes dentro del promotor parcial, pero ausentes en el mínimo, aumentarían de manera leve la expresión basal del gen reportero en tejido fotosintético. Esto se concluye tras la observación del promedio de expresión del gen *gfp* entre las líneas más homogéneas entre sí (Figura 23B). Sin embargo, dentro de las 7 líneas transgénicas para el promotor parcial de *psy2* analizadas, dos de ellas (Líneas 8 y 9) presentaron una expresión basal de *gfp* del doble de los niveles de expresión de las demás líneas (Figura 23A), lo que podría sugerir que en estas plantas ocurrió una inserción de dos copias de la construcción portadora del promotor parcial de *psy2* dirigiendo la expresión de *gfp*. Lo mismo puede concluirse para la línea 3 de las plantas transgénicas para el promotor mínimo de *psy2* (Figura 23A). Para resolver esta hipótesis, debería llevarse a cabo un *Southern blot* y definir el número de copias del transgen en la líneas transgénicas de tabaco. Las diferencias de expresión observadas

pueden deberse también al entorno genómico en el cual se insertaron las construcciones, lo cual puede ocasionar un aumento o disminución en la actividad de los promotores en el caso de que existan elementos *enhancer* o represores, respectivamente, en la vecindad de estos.

Contrariamente, en el caso de las plantas transgénicas para el promotor de *lcyb1*, se observó una gran diferencia entre los niveles de expresión de *gfp* basales al comparar el promotor parcial con el mínimo (expresión 20 veces mayor en el promotor parcial, Figura 24B). De igual manera, para este análisis se utilizaron las plantas con niveles de expresión más similares. En el caso de las plantas transgénicas para el promotor mínimo de *lcyb1*, la expresión basal de *gfp* presentó una elevada variabilidad (Figura 24A), obteniéndose en 3 de las 6 plantas analizadas una expresión baja de *gfp*, en otra planta una expresión intermedia y menor a la de las plantas transgénicas para el promotor parcial y en dos plantas niveles de expresión de *gfp* similares, e incluso mayores, que los obtenidos para las plantas portadoras del promotor parcial de *lcyb1*. La gran variabilidad observada en este caso puede explicarse por que todas las líneas transgénicas corresponden a la generación T0, de eventos de transformación independientes entre sí, y que pudieron verse afectados por el entorno genómico en el que se insertaron las construcciones de promotor::*gfp*.

Las diferencias en la expresión basal observadas entre las diferentes líneas transgénicas para los distintos promotores de *psy2* y *lcyb1* pueden deberse a la influencia de diversos factores. Por ejemplo, elementos *enhancer* situados cerca a ellos podrían ser capaces de activar aún más la transcripción del gen reportero (Kellum y Elgin, 1998). Otra variable es la configuración y metilación de la cromatina de la zona

donde se inserten, lo cual puede favorecer o no la transcripción de los genes (Gelvin y Kim, 2007).

De este análisis, a diferencia de lo observado para las plantas transgénicas portadoras de los promotores parciales y mínimos de *psy2*, es posible concluir que los elementos regulatorios situados dentro del promotor parcial de *lcyb1* y ausentes del mínimo, tendrían una función importante en aumentar la activación de la expresión génica. De los 7 elementos *enhancer* presentes en el promotor parcial de *lcyb1*, solo 3 de ellos se encuentran dentro del promotor mínimo, al igual que 2 de los 5 elementos G-box presentes en él. Considerando que la alta actividad del promotor parcial de *lcyb1* se observó en órganos foliares, es muy probable que la inducción por luz sea un factor importante en determinar la fuerza de este promotor.

Es importante destacar que las plantas portadoras del promotor parcial de *lcyb1* presentaron los mayores niveles de expresión de *gfp* de entre todas las plantas transgénicas, los cuales llegaron a ser 2,5 veces mayores que los niveles en las plantas transgénicas para el promotor parcial de *psy2* (datos no mostrados). Esto resalta la importancia de este gen en la síntesis de carotenoides en hojas de tabaco lo que se correlaciona con lo observado en zanahorias silvestres (Figura 3). Es importante estudiar más detalladamente la expresión de este promotor, especialmente en la raíz modificada de zanahoria (en oscuridad), con el fin de evaluar si también posee una alta actividad en órganos desarrollados en oscuridad y/o portadores de cromoplastos, lo que lo convertiría en una herramienta biotecnológica importante para la expresión de genes en plantas, principalmente en las raíces.

#### **4.5 Los genes *lcyb1* y *psy2* responden a tratamientos con fitohormonas en plántulas de zanahoria silvestres**

Con el fin de correlacionar los elementos regulatorios encontrados bioinformáticamente en los promotores de *psy2* y *lcyb1*, con la respuesta *in vivo*, se evaluó la expresión de ambos genes en zanahorias silvestres en respuesta a las fitohormonas ABA, auxina y ácido giberélico. Los genes *psy2* y *lcyb1* resultaron ser regulados diferencialmente por las hormonas analizadas, lo cual nos permitió priorizar los tratamientos hormonales a analizar en las plantas de tabaco transgénicas transformadas con los promotores parciales y mínimos de ambos genes (sección 3.7).

El diseño experimental consideró el tratamiento de plántulas de zanahoria de entre 16 y 19 días de cultivo, de manera similar a lo descrito para el estudio en *Arabidopsis thaliana* (Raghavan y col., 2005). Si bien se limita la respuesta a los factores presentes en plántulas jóvenes, resultó ser una aproximación válida y suficientemente consistente para evaluar cambios en la expresión de estos genes frente a las tres hormonas analizadas. Con el fin de correlacionar la influencia de estas hormonas con la acumulación de carotenoides en la zanahoria, es importante realizar a futuro un análisis similar considerando por separado las hojas y la raíz modificada de la zanahoria, en diferentes estados de desarrollo.

En los tratamientos con ABA, la expresión del gen *psy2* resultó ser altamente inducida por esta hormona (casi 6 veces con respecto al control sin hormona, Figura 26A), mientras que su gen parálogo, *psy1*, fue reprimido levemente por la misma, demostrando que el mismo estímulo es capaz de modular respuestas diferenciales, e incluso antagónicas, entre ambos genes parálogos. Es interesante hacer notar que el



gen *psy2* en *D.carota* se expresa mayoritariamente en hojas de plántulas de 4 semanas, mientras que el gen *psy1* lo hace en hojas de plantas maduras (Figura 3; Fuentes, 2009), lo cual apoya el resultado de una regulación diferencial de ambos genes. Por otra parte, tanto el gen *lcyb1* como el gen *lcyb2* presentaron una inducción en su expresión en presencia de ABA, siendo esta mayor para el gen *lcyb1*.

La inducción de ambos genes, en particular *psy2*, respalda los reportes de que el ABA es capaz de inducir este gen en Arabidopsis, maíz y arroz (Rodríguez-Villalón, en preparación; Welsch y col., 2008; Li y col., 2008), además de indicar de manera directa que los elementos de respuesta a ABA encontrados en los promotores de los genes *psy2* y *lcyb1* de zanahoria, o bien otros elementos nuevos, serían funcionales en su respuesta a ABA.

La inducción por ABA de este gen en plántulas de zanahoria podría estar relacionada con la activación de esta ruta con el fin de asegurar los niveles de carotenoides necesarios para el proceso fotosintético en las hojas de estas plántulas o bien con un mecanismo de retro-alimentación positiva en respuesta a estrés abiótico. Para determinar efectivamente la influencia de la inducción por ABA del gen *psy2*, es necesario evaluar la respuesta de este gen frente a esta hormona en plantas adultas de zanahoria, y particularmente en la raíz modificada, con el fin de determinar si es que existe una inducción de esta ruta por ABA que pudiera relacionarse con los altos niveles de carotenoides acumulados en ella. La información disponible actualmente daría un indicio de que efectivamente ocurriría una retroalimentación positiva de esta ruta mediada por esta hormona, ya que las raíces de las plantas se encuentran normalmente expuestas a diferentes tipos de estrés abiótico, como la sequía y la falta de agua. Tales estímulos son capaces de inducir la síntesis de ABA en las raíces de

maíz y tomate por ejemplo, activando genes de la ruta carotenogénica con el fin de asegurar un suministro suficiente de carotenoides precursores y aumentando de esta forma los niveles de la misma (Li y col., 2008; Thompson y col., 2000 a y b, 2007).

Por otra parte, la inducción de los genes de la licopeno  $\beta$ -ciclasa 1 y 2 corresponden al primer reporte de la inducción de genes *lcyb* mediada por ABA, y al igual que para el gen *psy2*, podría tener correlación con la regulación de la respuesta de las plántulas de zanahoria frente a sequía o deshidratación.

Por otra parte, la auxina sintética 2,4-D produjo un efecto contrario al ABA, reprimiendo en un 50% la expresión del gen *psy2*, sin afectar la expresión de *lcyb1* ni de *lcyb2* (Figura 26B). Esto sugiere que los elementos de respuesta a auxinas encontrados en el promotor del gen *psy2* serían funcionales y estarían gatillando la represión de este gen en plántulas de zanahoria, mientras que los elementos encontrados en el promotor de *lcyb1* no serían funcionales, o bien serían reconocidos por factores de transcripción ausentes en plantas de zanahoria en el estadio de desarrollo evaluado.

Hasta la fecha solo se había reportado la inducción de los genes carotenogénicos *nced* (Guo y col., 2009) y *ccd7* y *ccd8* (Hayward y col., 2009) mediada por auxinas, por lo que este resultado constituye el primer reporte de la regulación mediada por esta hormona sobre la expresión del gen *psy*. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar la implicancia biológica de la represión de este gen por auxinas, principalmente considerando que esta hormona activa los genes directamente involucrados en la síntesis de las hormonas ABA (*nced*) y las estrigolactonas (*ccd7* y *ccd8*). Hasta el momento, se ha reportado que las auxinas y el

ABA actúan de forma antagónica, como lo visto en este caso para la expresión del gen *psy2* de zanahoria, en los procesos de apertura de estomas y en la formación de las raíces laterales (Swarup y col., 2002), lo que podría deberse a una regulación cruzada de ambas hormonas (Wilson y col., 1990).

Por su parte, el ácido giberélico (GA3) fue capaz de inducir la expresión del gen *psy1*, sin afectar la expresión del gen *psy2*, demostrando una vez más la regulación diferencial de ambos genes parálogos. Además, esta hormona provocó un aumento leve, aunque significativo, en la expresión del gen *lcyb1* (de aproximadamente un 50%, Figura 26C), mientras que los niveles de expresión del gen *lcyb2* permanecieron inalterados. Lo anterior da indicios de que los elementos regulatorios de respuesta a giberelinas identificados en el promotor del gen *lcyb1* (Tabla I, Figura 11) serían funcionales, mientras que los presentes en el promotor de *psy2* no serían funcionales, estarían siendo bloqueados por reguladores negativos o estarían ausentes los factores positivos que los reconocen en el estado de desarrollo de plántula.

#### **4.6 Los promotores parciales de *psy2* y *lcyb1* se inducen por ABA en plantas de tabaco transgénicas**

Del análisis de 7 líneas de tabaco transgénicas para el promotor parcial de *psy2* y de 5 para el promotor mínimo de *psy2*, fue posible concluir que el promotor parcial de *psy2*, pero no así el mínimo, es capaz de ser inducido por ABA. En 6 de las 7 líneas del promotor parcial de *psy2* que fueron evaluadas, se observó una inducción de la expresión de *gfp* en una o más de las concentraciones evaluadas, y particularmente en el caso de las líneas 2, 7, 8 y 9, los niveles de expresión de *gfp* presentaron prácticamente la misma curva de inducción (respuesta en las diferentes concentraciones de ABA) que el gen control de la inducción, *osmotin* (Figuras 28 y 30).

En cambio, en el promotor mínimo de este gen no se observó una correlación clara en un número suficiente de líneas, aún cuando el gen *osmotin* se indujo en todas ellas, excepto en la línea 1 (Figura 29), corroborando que el tratamiento hormonal fue adecuado.

De manera similar, en 4 de las 5 líneas transgénicas para el promotor parcial de *lcyb1* se observó una inducción del gen reportero *gfp*, así como del gen control *osmotin* (Figura 36), lo cual se ve reflejado más claramente al graficar el promedio de expresión de ambos genes en las 4 líneas inducidas (Figura 37), donde se observa la misma curva de inducción, dosis dependiente en este caso, tanto para el gen control como para el reportero. Lo anterior confirma que el promotor parcial de *lcyb1* es capaz de ser inducido por ABA.

En el promotor de *psy2* se encontraron 3 elementos de respuesta a ABA, todos similares al elemento ABRE (Tabla I). Los ABRE 1 y 2 se encuentran muy próximos entre sí, mientras que el tercero se encuentra más cercano al ATG (Figura 11). Además, el ABRE 2 es muy similar a la parte distal del elemento "box B" de *B. napus*, el cual es un elemento capaz de responder a ABA (Ezcurra y col., 1999). Buscando manualmente se encontró el elemento proximal del "box B" de *B. napus*, 30 pares de bases más abajo del elemento ABRE 2. Ambos elementos (ABRE 2 y la parte proximal del box B) podrían constituir un módulo inducible por ABA, de manera similar al que se encuentra presente en el promotor del gen *napA* de *B. napus* (Ezcurra y col., 1999). Sin embargo, estos elementos se encuentran dentro del promotor mínimo de *psy2*, el cual no responde a ABA. Por lo tanto, el elemento ABRE 1, presente solo en el promotor parcial de *psy2* y no en el mínimo, u otro(s) elemento(s) presente solo en el

promotor parcial o total de *psy2* (no identificado bioinformáticamente), jugaría(n) un rol clave en la inducción del promotor de *psy2* mediada por ABA.

En el promotor parcial de *lcyb1* existen 5 elementos putativos de respuesta a ABA (Figura 11, Tabla I). Estos elementos, o bien otros no identificados bioinformáticamente, podrían conferir inducibilidad por ABA al promotor parcial de *lcyb1*. Es importante analizar el efecto de esta hormona en el promotor mínimo de *lcyb1* (que contiene 3 de los 5 elementos de respuesta a ABA presentes en el promotor parcial de *lcyb1*, Tabla I) con el fin de intentar acotar la región del promotor o los elementos funcionales en él responsables de la respuesta a ABA.

La inducción del promotor parcial de *psy2*, así como del promotor parcial de *lcyb1*, en plantas de tabaco transgénicas tratadas con ABA se correlaciona directamente con la inducción de ambos genes en zanahorias silvestres incubadas con la misma hormona (Figura 26A) e indica que tal inducción sería consecuencia de la activación de los promotores de *psy2* y *lcyb1* mediada por ABA.

La inducción por ABA del promotor de *lcyb1* de *D. carota* en plantas de tabaco transgénicas corresponde al primer reporte de un efecto de esta hormona sobre el promotor de genes de la licopeno b-ciclasa. Sin embargo, la inducción del promotor del gen *psy2* mediada por ABA se correlaciona con lo observado para los promotores de los genes *psy3* de maíz y arroz (Li y col., 2008; Welsch y col., 2008) y para el gen *psy* de *Arabidopsis thaliana* (Rodríguez-Villalón, en preparación). En el caso de los genes *psy3* de arroz y maíz, esta inducción se observó principalmente en la raíz de esas plantas y se asoció a un mecanismo de retro-alimentación positiva de la ruta carotenogénica con el fin de asegurar una gran cantidad de precursores para la

síntesis de ABA, hormona mediadora de respuestas frente a estrés abiótico (Welsch y col., 2008; Li y col., 2008). De esta forma, los genes *psy3* de maíz y arroz serían claves en la síntesis de carotenoides en las raíces de ambas plantas en respuesta a estrés abiótico (sequía y salinidad).

En nuestro caso, la inducción de los genes *psy2* y *lcyb1* mediada por ABA se observó en plántulas completas de zanahoria, así como la inducción de sus promotores se observó en las hojas de las plantas de tabaco transgénicas. Por esta razón no es posible aún asociar la inducción de uno o ambos promotores mediada por ABA a un aumento preferencial de la síntesis de carotenoides en la raíz modificada de la zanahoria. Para tal fin, a futuro se evaluará la inducción por ABA de los promotores de *psy2* y *lcyb1*, reflejada en un aumento de la expresión del gen reportero *gfp*, en las raíces modificadas y en las hojas de las plantas de zanahoria transgénicas para ambas construcciones.

#### **4.7 El promotor mínimo de *psy2* se reprime por 2,4-D en plantas de tabaco transgénicas**

A diferencia de lo ocurrido en los tabacos transgénicos portadores del promotor parcial de *psy2* en presencia de ABA, en las plantas transgénicas para el promotor parcial de *psy2* tratadas con la auxina sintética 2,4-D no fue posible observar una respuesta clara, aún cuando el gen control *parC* presentó una inducción clara y dosis-dependiente en todas las plantas, comprobando la efectividad del tratamiento aplicado (Figura 32). Esto se debió a que dentro de las plantas analizadas se observó una gran variabilidad de respuesta, que podría deberse al efecto de la zona de inserción de las construcciones dentro del genoma de tabaco. También puede explicarse porque cada evento de inserción corresponde a una planta independiente, y factores regulatorios

presentes en una planta pueden estar ausentes en otra. Sin embargo, la ausencia de una respuesta clara nos sugiere que el promotor parcial de *psy2* no responde frente a la auxina sintética 2,4-D y plantea la necesidad de analizar a futuro el efecto de esta hormona en las plantas de zanahoria transgénicas para este promotor.

En cambio, en las 5 líneas de tabaco transgénicas para el promotor mínimo de *psy2* se observó una tendencia más clara de represión de la expresión de *gfp* en presencia de 2,4-D (Figura 34). Esto se correlaciona con la represión del gen *psy2* en plántulas de zanahoria silvestres tratadas con esta auxina sintética (Figura 26B), determinando nuevamente un mecanismo de represión mediado directamente por el promotor de este gen. En el promotor de *psy2* se encontraron 4 elementos de respuesta a auxinas, y los 4 se encontraron dentro del promotor mínimo (Tabla I, Figura 11), dando luces de que podrían estar relacionados con la represión del promotor mínimo de *psy2*. Sin embargo, el promotor mínimo está incluido dentro del parcial, lo que sugiere la presencia de otros elementos regulatorios entre las bases -769 y -421, que podrían bloquear la respuesta a auxina en el promotor parcial de *psy2*.

Si bien se ha reportado que las auxinas son capaces de inducir genes de la ruta carotenogénica involucrados en la síntesis de ABA y estrigolactonas (sección 4.5), este es el primer reporte donde se indica que esta hormona reprime el promotor de un gen carotenogénico.

#### **4.8 Los promotores parciales y mínimos de *lcyb1* se reprimen por GA3 en plantas de tabaco transgénicas**

El análisis bioinformático del promotor del gen *lcyb1* indica que los 4 motivos de respuesta a giberelinas encontrados se encuentran dentro del promotor total

identificado de *lcyb1*, pero ausentes en el promotor parcial y el mínimo (Tabla I, Figura 11). Por esta razón, no se esperaba una inducción de estos promotores de *lcyb1* en respuesta a GA3. De acuerdo a lo esperado, no se observó una inducción clara ni generalizada de la expresión de *gfp* ni en las plantas de tabaco transgénicas para el promotor parcial de *lcyb1* (excepto para la línea 10) ni en las transgénicas para el mínimo (excepto en la línea 3, Figuras 39 y 40). Por el contrario, se observó una leve, pero significativa, represión de *gfp* al graficar el promedio de la expresión de este gen en las líneas del promotor parcial y del mínimo (Figura 41). Este resultado fue inesperado y podría atribuirse a la presencia de algún elemento regulatorio reprimible por giberelinas presente en los promotores parciales y mínimos de *lcyb1*.

Sin embargo, es probable también que la respuesta de estos promotores frente a esta hormona sea diferente en zanahoria, ya que el tabaco es un sistema heterólogo y no necesariamente cuenta con los factores de transcripción que regulan efectivamente estos promotores.

Por otra parte, existe un único reporte previo de la presencia de elementos de respuesta a giberelinas en los promotores de los genes *psy1* y *psy2* de melón (Qin y col., 2011). Los elementos encontrados en ellos son los motivos GARE y Box P, presentes también en el promotor de *lcyb1* (Tabla I). Sin embargo, no se ha determinado la funcionalidad de éstos en la regulación de la ruta carotenogénica. Considerando que tanto los carotenoides como las giberelinas comparten el precursor GGPP (Meier y col., 2011), no sería de extrañar que existiera algún mecanismo de regulación cruzada entre ambas rutas, por lo que sería importante evaluar la funcionalidad de estos motivos en zanahoria.



#### **4.9 Los promotores parciales de *psy2* y *lcyb1* y el mínimo de *lcyb1* son inducibles por luz en plantas de tabaco transgénicas**

Finalmente, se decidió evaluar si los promotores de los genes *psy2* y *lcyb1* eran capaces de responder a un estímulo lumínico en las plantas de tabaco transgénicas. La luz blanca (400-700 nm) ha sido reportada como capaz de inducir al doble la expresión del gen *psy* de *Arabidopsis thaliana* (Welsch y col., 2000; Welsch y col., 2003). En el caso del promotor del gen *psy* de *Arabidopsis*, la luz azul ocasionó el mayor aumento de expresión del gen reportero, indicando la activación de éste mediado por criptocromo (Welsch y col., 2003). Sin embargo, previamente se había demostrado que este promotor es capaz de ser regulado por luz blanca y roja, vía fitocromo (von Lintig y col., 1997). Por ello, para este estudio, decidimos utilizar luz blanca, que contiene ambos tipos de luz.

La efectividad del tratamiento de inducción por luz aplicado se verificó mediante la expresión del gen control *gapB*, que se induce en respuesta al estímulo lumínico en tabaco (Shih y Goodman, 1988). La inducción de este gen en todas las líneas de tabaco transgénicas analizadas (Figuras 43 y 44) nos indica que el tratamiento de inducción por luz aplicado resultó correcto.

En 4 de las 7 líneas transgénicas para el promotor parcial de *psy2* se observó una inducción del gen reportero *gfp*, pero en cantidades muy variables (entre 0,3 y 6,5 veces, Figura 43C). Dado que la mayor parte de las líneas presentó algún grado de inducción, concluimos que este promotor sería inducible por este estímulo en plantas de tabaco transgénicas. Además, las líneas que presentaron la mayor inducción del gen control *gapB* son las mismas que presentaron la mayor inducción de *gfp* (Figura 43 A y C), apoyando la conclusión anterior. Por el contrario, no fue posible observar una

tendencia clara para el promotor mínimo de *psy2* (Figura 43D) y al graficar el promedio de la expresión de *gfp* de las 5 líneas analizadas no se observan cambios (Figura 43F), por lo que el promotor mínimo de *psy2* no sería inducible por luz en tabaco. Sin embargo, es importante evaluar la respuesta de este promotor en plantas de zanahoria, considerando que las dos líneas donde se observó la mayor inducción del gen *gapB* (líneas 1 y 2, Figura 43B) son las únicas líneas que presentaron una inducción del gen reportero *gfp*.

En el caso del promotor de *lcyb1*, en todas las líneas transgénicas para el promotor parcial y el mínimo evaluadas se observó una inducción significativa de la expresión del gen reportero *gfp* mediada por luz (Figura 44 C y D), lo cual se observó también al graficar el promedio de la expresión de *gapB* y *gfp* de todas las líneas (Figura 44 E y F). Esto nos permite concluir que tanto el promotor parcial como el mínimo de *lcyb1* serían inducibles por luz en plantas de tabaco transgénicas. En este caso se observó también que la línea 5 del promotor parcial de *lcyb1* presentó la mayor inducción de *gapB* y *gfp*, apoyando la conclusión anterior (Figura 44 A y C).

Los diferentes niveles de inducción del gen *gapB* y *gfp* entre las distintas líneas transgénicas para una misma construcción podrían deberse a que no todas las plantas recibieron la misma cantidad de luz. La correlación observada entre los niveles de inducción del gen *gapB* y de *gfp* en líneas transgénicas para el promotor parcial y mínimo de *psy2* (Figura 43 A y C, y B y D) y parcial de *lcyb1* (Figura 44 A y C) apoya esta hipótesis.

La inducción por luz de estos promotores se correlaciona con la observada para diferentes genes carotenogénicos, especialmente *psy*, así como para genes

relacionados al proceso fotosintético (Welsch y col., 2003; von Lintig y col., 1997; Welsch y col., 2000; Rodríguez- Villalón, 2009 a y b; Toledo-Ortiz y col., 2010) y tendría relación con la activación de estos genes en las hojas de la zanahoria, naturalmente expuestas a luz. Sin embargo, es probable que estos elementos no sean funcionales en la raíz modificada de zanahoria, desarrollada en oscuridad. Para evaluar lo anterior, es necesario determinar las diferencias de expresión del gen reportero entre raíces de zanahoria transgénicas para los distintos promotores crecidas en presencia de luz y desarrolladas en oscuridad.

Con respecto a los LRE, estos se encontraron en gran número y distribuidos homogéneamente dentro del promotor de *psy2* y de *lcyb1* (Figura 11, Tabla I). Dado que el mayor número de elementos de respuesta a luz encontrados son del tipo G-Box (sección 4.2), es probable que estos sean responsables de la activación por luz de los promotores de *psy2* y *lcyb1*.

## CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas de este trabajo son las siguientes:

1. Se lograron identificar y clonar regiones regulatorias (promotores) de los genes *psy2* (769 pb) y *lcyb1* (1.051pb) de zanahoria mediante GenomeWalker.
2. Los promotores de *psy2* y *lcyb1* de *D.carota* descritos en este trabajo son los primeros promotores de genes carotenogénicos identificados y caracterizados en esta planta.
3. Los promotores de los genes *psy2* y *lcyb1* de zanahoria poseen diversos elementos regulatorios en sus promotores. La mayor parte de estos corresponde a elementos de respuesta a luz, a estrés y fitohormonas (principalmente ABA, auxinas y giberelinas).
4. Los promotores parciales y mínimos de ambos genes fueron capaces de dirigir la expresión del gen reportero *gfp* en diversos modelos (hojas de tabaco y frutos de tomate y pimentón) transformados transitoriamente, así como en plantas de tabaco transgénicas estables.
5. Al analizar la expresión basal de *gfp*, se determinó que la actividad del promotor parcial de *psy2* es levemente superior a la del promotor mínimo de *psy2* (30%), mientras que la del promotor parcial de *lcyb1* es 20 veces la observada para el promotor mínimo.

6. El gen *psy2* de *D.carota* se induce por ABA y se reprime por 2,4-D en plántulas de zanahoria, mientras que el gen *lcyb1* se induce levemente por ABA y GA3 en plántulas de zanahoria.
7. En plantas transgénicas de tabaco, el promotor parcial del gen *psy2* se induce por ABA, demostrando que la inducción del gen *psy2* en plántulas de zanahoria es consecuencia directa de la activación de su promotor.
8. En plantas transgénicas de tabaco, el promotor mínimo del gen *psy2* se reprime por 2,4-D, demostrando que la represión del gen *psy2* en plántulas de zanahoria es consecuencia directa de la represión de su promotor.
9. Los promotores parciales y mínimos de *lcyb1* se reprimen por GA3 en plantas transgénicas de tabaco. Esto sugiere la presencia de elementos regulatorios dentro del promotor mínimo de *lcyb1* capaces de reprimir su expresión que no fueron identificados en el análisis bioinformático.
10. Los promotores parciales de *psy2* y *lcyb1*, así como el promotor mínimo de este último, son inducibles por luz en plantas transgénicas de tabaco. Esto se correlaciona con la importancia biológica de los carotenoides en las hojas de las plantas.
11. Los resultados expuestos confirman la hipótesis planteada en este trabajo, que indica que las regiones promotoras de los genes *psy2* y *lcyb1* de *Daucus carota* L. poseen elementos regulatorios en cis relacionados con la activación génica mediada por luz y fitohormonas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aerts, S., Thijs, G., Coessens, B., Staes, M., Moreau, Y. y De Moor, B. 2003. "TOUCAN : Deciphering the Cis-Regulatory Logic of Coregulated Genes". *Nucl. Acids Res.* 31 (6): 1753-1764.
- Alabadí, D., Gallego-Bartolome, J., Orlando, L., Garcia-Carcel, L., Rubio, V. y Martinez, C. 2008. Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. *Plant J.* 53: 324–335.
- Albrecht, M. y Sandmann, G. 1994. Light-stimulated carotenoid biosynthesis during transformation of maize etioplasts is regulated by increases activity of isopentenyl pyrophosphate isomerase. *Plant Physiology.* 105: 529-534.
- Alquézar, B., Zacarías, L. y Rodrigo, M.J. 2009. Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene  $\beta$ -cyclase from *Citrus* and its relation to lycopene accumulation. *Journal of Experimental Botany.* 60 (6): 1783–1797.
- Aluru, M., Xu, Y., Guo, R., Wang, Z., Li, S., White, W. y Rodermeil, S. 2008. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *J. Exp. Bot.* 59: 3551-3562.
- Arango, J., Wüst, F., Beyer, P. y Welsch, R. 2010. Characterization of phytoene synthases from cassava and their involvement in abiotic stress-mediated responses. *Planta.* 232 (5): 1251-1262.
- Armstrong, G.A. y Hearts, J.E. 1996. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB J.* 10: 228-237.
- Beisel, K.G., Jahnke, S., Hofmann, D., Köppchen, S., Schurr U. y Matsubara, S. 2010. Continuous turnover of carotenes and chlorophyll a in mature leaves of *Arabidopsis thaliana* revealed by  $^{14}\text{CO}_2$  pulse-chase labeling. *Plant Physiol.* 152 (4): 2188–2199.
- Bouquin, T., Meier, C., Foster, R., Nielsen, M.E. y Mundy, J. 2001. Control of specific gene expression by gibberellin and brassinosteroid. *Plant Physiology.* 127: 450–458.
- Brady, S.M., Sarkar, S.F., Bonetta, D. y McCourt, P. 2003. The *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3)* gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 34: 67-75.
- Bramley, P. 2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J. Exp. Bot.* 53: 2107-2113.
- Breimer, L. 1990. Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol. Carcinog.* 3: 188-197.

- Briggs, W., y Olney, M. 2001. Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two Cryptochromes, one phototropin, and one superchrom. *Plant Physiol.* 125: 85-88.
- Briggs, W., Tseng, T.S., Cho, H-T., Swartz, T., Sullivan, S., Bogomolni, R., Kaiserli, E. y Christie, J. 2007. Phototropins and their LOV domains: versatile plant blue-light receptors. *J. Integr. Plant Biol.* 49: 4-10.
- Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB J.* 9: 1551-1558.
- Britton, G. 1998. Overview of carotenoid biosynthesis. Pages 13-147. En: G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.), *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism*. Birkhauser Verlag. Basel, Switzerland.
- Brocard, I.M., Lynch, T.J. y Finkelstein, R.R. 2002. Regulation and Role of the Arabidopsis Abscisic Acid-Insensitive 5 Gene in Abscisic Acid, Sugar, and Stress Response. *Plant Physiol.* 129 (4): 1533-1543.
- Cazzonelli, C.I., Cuttriss, A.J., Cossetto, S.B., Pye, W., Crisp, P., Whelan, J., Finnegan, E.J., Turnbull, C. y Pogson, B.J. 2009. Regulation of carotenoid composition and shoot branching in Arabidopsis by a chromatin modifying histone methyltransferase, SDG8. *Plant Cell.* 21 (1): 39-53.
- Cazzonelli, C.I., Nisar, N., D. Hussain, Carmody, M.E. y Pogson, B.J. 2010. Biosynthesis and Regulation of Carotenoids in Plants—Micronutrients, Vitamins and Health Benefits. *Plant Developmental Biology.* 2: 117-137.
- Cazzonelli, C.I. y Pogson, B.J. 2010. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science.* 15 (5): 266-274.
- Chen, W.P. y Punja, Z.K. 2002. Transgenic herbicide- and disease-tolerant carrot (*Daucus carota* L.) plants obtained through Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Cell Rep.* 20: 929-935.
- Chen H., Zhang J., Neff M.M., Hong S., Zhang H., Deng X. y Xiong L. 2008. Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *PNAS* (105) 11: 4495-4500.
- Chung, H-J., Fu, H.Y. y Thomas, T.L. 2005. Abscisic acid-inducible nuclear proteins bind to bipartite promoter elements required for ABA response and embryo-regulated expression of the carrot *Dc3* gene. *Planta.* 220: 424-433.
- Clark, R.M., Wagler, T.N., Quijada, P. y Doebley, J. 2006. A distant upstream enhancer at the maize domestication gene *tb1* has pleiotropic effects on plant and inflorescence architecture. *Nature Genet.* 38:594-597.

- Clotault, J., Peltier, D., Berruyer, R., Thomas, M., Briard, M. y Geoffriau, E. 2008. Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *J. Exp. Bot.* 59: 3563-3573.
- Corona, V., Aracri, B., Kosturkova, G.E., Bartley, L., Pitto, L., Giorgetti, P.A., Scolnik, P.A. y Giuliano, G. 1996. Regulation of carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development. *Plant Journal.* 9: 505-512.
- Crozier, A., Kamiya, Y., Bishop G. y Yolota T. 2000. Biosynthesis of hormone and elicitor molecules. Pp: 865-872. En: B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones (eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologist.
- Cunningham, F.X. Jr y Gantt, E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 49: 557-83.
- Cunningham, F.X. Jr. 2002. Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure Appl. Chem.* 74: 1409-1417.
- Dalal, M., Chinnusamy, V. y Bansal, K.C. 2010. Isolation and functional characterization of *Lycopene  $\beta$ -cyclase (CYC-B)* promoter from *Solanum habrochaites*. *BMC Plant Biology.* 10: 61 doi: 10.1186/1471-2229-10-61.
- Dall'Osto, L., Cazzaniga, S., Havaux, M. y Bassia, R. 2010. Enhanced Photoprotection by Protein-Bound vs. Free Xanthophyll Pools: A Comparative Analysis of Chlorophyll b and Xanthophyll Biosynthesis Mutants. *Molecular Plant.* 3 (3): 576-593.
- Davuluri, G.R., Van Tuinen, A., Mustilli, A.C., Manfredonia, A., Newman, R., Burgess, D., Brummell, D.A., King, S.K., Palys, J., Uhlig, J., Pennings, H.M. y Bowler, C. 2004. Manipulation of *DET1* expression in tomato results in photomorphoenic phenotypes caused by post-transcriptional gene silencing. *Plant J.* 40: 344-354.
- DellaPenna, D. y Pogson, B.J. 2006. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 711-738.
- de Lucas, M., Daviere, J.M., Rodriguez-Falcon, M., Pontin, M., Iglesias- Pedraz, J.M. y Lorrain, S. 2008. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature.* 451: 480-484.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A.M. y Adams, W.W. Jr. 1996. *In vivo* function of carotenoids in higher plants. *FASEB Journal.* 10: 403-412.
- Demmig-Adams, B. y Adams III, W.W. 2006. Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytologist.* 172 (1): 11-21.
- Deruere, J., Romer, S., d'Harlingue, A., Backhaus, R.A., Kuntz, M. y Camara, B. 1994. Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *Plant Cell.* 6: 119-133.



- Diretto, G., Al-Babili, S., Tabaza, R., Papacchioli, V., Beyer, P. y Guiliano, G. 2007. Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of bacterial mini-pathway. *PLoS ONE* 4:e350.
- Donald, R.G.K. y Cashmore, A.R. 1990. Mutation of either G-box or I-box sequences profoundly affects expression from the *Arabidopsis rbcS-1A* promoter. *EMBO J.* 9: 1717–1726.
- Doyle, J.J. y Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 19: 11-15.
- Ebener, W., Fowler, T.J., Suzuki, H., Shaver, J. y Tierney, M.L. 1993. Expression of *DcPRP1* 1s Linked to carrot storage root formation and is induced by wounding and auxin treatment. *Plant Physiol.* 101: 259-265.
- El-Agamey, A., Lowe, G.M., McGarvey, A.M., Phillip, D.M., Truscott T.G. y Young, A.J. 2004. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 430 (1): 37-48.
- Ezcurra, I., Ellerström, M., Wycliffe, P., Stålberg, K. y Rask, L. 1999. Interaction between composite elements in the *napA* promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Molecular Biology.* 40: 699–709.
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J. y Wang, F. 2008. Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 451: 475–479.
- Franklin, K., Lerner, V. y Whitelam, G. 2005. The signal transducing photoreceptor of plants. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 653-664.
- Fraser, P.D. y Bramley, P.M. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid. Res.* 43: 228–265.
- Fuentes, P. 2009. Efecto del desarrollo y de la luz en los niveles de RNA mensajero de seis genes de la ruta carotenogénica en *Daucus carota* L. (zanahoria). Tesis de Pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Fuentes, P., Pizarro, L., Handford, M., Rodríguez-Concepción, M. y Stange, C. 2011. Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Molecular Biology.* En revision.
- Galpaz, N., Wang, Q., Menda, N., Zamir, D. y Hirschberg, J. 2008. Abscisic acid deficiency in the tomato mutant high-pigment 3 leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content. *Plant J.* 53 (5): 717–730.
- Gelvin, S. B. y Kim, S-I. 2007. Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1769: 410–421.

- Giorio, G., Stigliani, A.L. y D'Ambrosio, C. 2007. Agronomic performance and transcriptional analysis of carotenoid biosynthesis in fruits of transgenic HighCaro and control tomato lines under field conditions. *Transgenic Res.* 16: 15–28.
- Giuliano, G., Pichersky, E., Malik, V.S., Timko, M.P., Scolnik, P.A. y Cashmore, A.R. 1988. An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 7089–7093.
- Giuliano, G., Bartley, G.E. y Scolnik, P.A. 1993. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell.* 5: 379-387.
- Gómez-Porras, J.L., Riaño-Pachón, D.M., Dreyer, I., Mayer, J.E. y Mueller-Roeber, B. 2007. Genome-wide analysis of ABA-responsive elements ABRE and CE3 reveals divergent patterns in *Arabidopsis* and rice. *BMC Genomics.* 8:260 doi: 10.1186/1471-2164-8-260.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P.B., Puech-Pagès, V., Dun, E.A., Pillot, J.P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.C., Bouwmeester, H., Bécard, G., Beveridge C.A., Rameau, C. y Rochange, S.F. 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455: 189–194.
- Grossmann, K. y Hansen, H. 2001. Ethylene-triggered abscisic acid: a principle in plant growth regulation? *Physiologia Plantarum.* 113: 9–14.
- Grossmann, K. 2003. Mediation of Herbicide Effects by Hormone Interactions. *Journal of Plant Growth Regulation.* 22 (1): 109-122.
- Grotewold, E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 761-780.
- Guiltinan, M.J., Marcotte, W.R. y Quatrano Jr, R.S. 1990. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science.* 250 (4978): 267-271.
- Guo, D., Liang, J. y Li, L. 2009. Abscisic acid (ABA) inhibition of lateral root formation involves endogenous ABA biosynthesis in *Arachis hypogaea* L. *Plant Growth Regul.* 58: 173–179.
- Ha, S.-B. y An, G. 1988. Identification of upstream regulatory elements involved in the developmental expression of the *Arabidopsis thaliana cab1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 8017–8021.
- Hanson, M.R. y Köhler, R.H. 2001. GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *Journal of Experimental Botany.* 52 (356): 529-539.
- Hartley, J.L., Temple, G.F. y Brasch, M.A. 2000. DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genome Res.* 10: 1788-1795.
- Hayward, A., Stirnberg, P., Beveridge, C. y Leyser, O. 2009. Interactions between Auxin and Strigolactone in Shoot Branching Control. *Plant Physiology.* 151: 400–412.
- Hirschberg, J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology.* 4: 210-218.

- Hobo, T., Asada, M., Kowyama, Y. y Hattori, T. 1999. ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *Plant J.* 19 (6): 679-689.
- Howitt, C.A. y Pogson, B.J. 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ.* 29: 435-445
- Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M. y Angenon, G. 1997. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science.* 122: 101-108.
- Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H. y Yano, M. 2004. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol.* 134: 824-837.
- Kellum, R. y Elgin, S.C.R. 1998. Chromatin boundaries: Punctuating the genome. *Current Biology.* 8 (15): R521-R524.
- Kende, H. y Zeevaart, J.A.D. 1997. The five 'classical' plant hormones. *Plant Cell.* 9: 1197-1210.
- 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. *J. Agric. Food Chem.* 55: 3414-3420.
- Kitamiya, E., Suzuki, S., Sano, T. y Nagata, T. 2000. Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. *Plant Cell Reports.* 19: 551-557.
- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Higashi, K., Satoh, S., Kamada, H. y Harada, H. 1992. Isolation and characterization of a cDNA that encodes ECP31, an embryogenic-cell protein from carrot. *Plant Molecular Biology* 19: 239-249.
- Kolotilin, I., Koltai, H., Tadmor, Y., Bar-Or, C., Reuveni, M., Meir, A. Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L. y Levin, I. 2007. Transcriptional profiling of *high pigment-2dg* tomato mutant links early fruit plastid biogenesis with its overproduction of phytonutrients. *Plant Physiol.* 145: 389-401.
- Koyama, K., Sadamatsu, K. y Goto-Yamamoto, N. 2010. Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape. *Funct. Integr. Genomics.* 10: 367-381.
- Kraft, M., Kuglitsch, R., Kwiatkowski, J., Frank, M. y Grossmann, K. 2007. Indole-3-acetic acid and auxin herbicides up-regulate 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene expression and abscisic acid accumulation in cleavers (*Galium aparine*): interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany.* 58 (6): 1497-1503.
- Krinsky, N.I. y Johnson, E.J. 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Aspects Med.* 26: 459-516.

- Kristiansson, E., Thorsen, M., Tama, M.J. y Nerman, O. 2009. Evolutionary Forces Act on Promoter Length: Identification of Enriched Cis-Regulatory Elements. *Mol. Biol. Evol.* 26(6): 1299–1307.
- Kuppusamy, K.T., Walcher, C.L. y Nemhauser, J.L. 2009. Cross-regulatory mechanisms in hormone signaling. *Plant Mol. Biol.* 69: 375–381.
- Lamers, P.P., Janssen, M., De Vos, R.C., Bino, R.J. y Wijffels, R.H. 2008. Exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell factory applications. *Trends Biotechnol.* 26: 631-638.
- Li, F., Vallabhaneni, R. y Wurtzel, E.T. 2008. PSY3, a New Member of the Phytoene Synthase Gene Family Conserved in the Poaceae and Regulator of Abiotic Stress-Induced Root Carotenogenesis. *Plant Physiology* 146: 1333–1345.
- Lu, S. y Li, L. 2008. Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *J. Integr. Plant Biol.* 50: 778–785.
- Maity, S.N. y de Crombrughe, B. 1998. Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. *Trends in Biochemical Sciences.* 23 (5): 174-178.
- Marcotte, W.R. Jr., Russell, S.H. y Quatrano, R.S. 1989. Abscisic acid-responsive sequences from the *em* gene of wheat. *Plant Cell.* 1(10): 969-976.
- Mayne, S. 1996.  $\beta$ -carotene, carotenoids and disease prevention in humans. *The FASEB J.* 10: 690-701.
- Meier, S., Tzfadia, O., Vallabhaneni, R., Gehring, C. y Wurtzel, E.T. 2011. A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*.
- Merzlyak, M.N. y Solovchenko, A.E. 2002. Photostability of pigments in ripening apple fruit: a possible photoprotective role of carotenoids during plant senescence. *Plant Sci.* 163: 881–888.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* 15 (3): 473–497.
- Narusaka, Y., Nakashima, K., Shinwari, Z.K., Sakuma, Y., Furihata, T., Abe, H., Narusaka, M., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. Interaction between two *cis*-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J.* 34: 137-148.
- Nelson, J.L., Bemstein, P.S., Schmidt, M.C., Von Tress, M.S. y Askew, E.W. 2003. Dietary modification and moderate antioxidant supplementation differentially affect serum carotenoids, antioxidant levels and markers of oxidative stress in older human. *J. Nut.* 133: 3117-3123.
- Nelson, C.E., Hersh, B.M. y Carroll, S.B. 2004. The regulatory content of intergenic DNA shapes genome architecture. *Genome Biology.* 5 (4): R25.1-R25.15.

- Ni, M., Tepperman, J.M. y Quail, P.H. 1998. PIF3, a phytochrome interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* 95: 657-667.
- Niyogi, K.K. 1999. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 333–359.
- Núñez, B. 2007. Construcción y evaluación de vectores que permitan aumentar la tolerancia al frío en frutos. Seminario de Investigación para Licenciatura en Biología (PUC). Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Pecker, I., Gabbay, R., Cunningham, F.X.Jr y Hirschberg, J. 1996. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene  $\beta$ -cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Molecular Biology* 30: 807-819.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29 (9): 2002-2007.
- Pichersky, E. 2008. Raging hormones in plants. *Nature Chemical Biology* 4: 584-586.
- Pogson, B.J., Rissler, H.M. y Frank, H.A. 2006. The roles of carotenoids in photosystem II of higher plants. En Wydrzynski, T. y Satoh, K., (eds), *Photosystem II: the Light-driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase*. pp. 515–537. Springer-Verlag.
- Puente, P., Wei, N. y Deng, X.-W. 1996. Combinatorial interplay of promoter elements constitutes the minimal determinants for light and developmental control of gene expression in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 15: 3732–3743.
- Qin, G., Gu, H., Ma, L., Peng, Y., Deng, X.W., Chen, Z. y Qu, L.J. 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.
- Qin, X., Coku, A., Inoue, K. y Tian, L. 2011. Expression, subcellular localization, and *cis*-regulatory structure of duplicated phytoene synthase genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Planta* DOI 10.1007/s00425-011-1442-8.
- Raghavan, C., Ong, E.K., Dalling, M.J. y Stevenson, T.W. 2005. Effect of herbicidal application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Arabidopsis*. *Funct. Integr. Genomics.* 5: 4–17.
- Raghavan, C., Ong, E.K., Dalling, M.J. y Stevenson, T.W. 2006. Regulation of genes associated with auxin, ethylene and ABA pathways by 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid in *Arabidopsis*. *Functional and Integrated Genomics.* 6: 60–70.
- Rao, A.V. y Rao, L.G. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological Res.* 55: 207-216.
- Rodríguez-Villalón, A., Gas, E. y Rodríguez-Concepción, M. 2009a. Colors in the dark: A model for the regulation of carotenoid biosynthesis in etioplasts *Plant Signal Behav.* 4: 965-967.

- Rodríguez-Villalón, A., Gas, E. y Rodríguez-Concepción, M. 2009b. Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* 60 (3): 424-435.
- Rohde, A., Kurup, S. y Holdsworth, M. 2000. ABI3 emerges from the seed. *Trends in Plant Science.* 5 (10): 418-419.
- Römer, S. y Fraser, P.D. 2005. Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta* 221: 305-308.
- Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D. y Hirshberg, J. 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of gene for lycopene epsilon cyclase is down regulated during ripening and is elevated in the mutant *delta*. *Plant J.* 17: 341-351.
- 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 mutation in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 11102-11107.
- Rossel, J.B., Wilson, L.W. y Pogson, B.J. 2002. Global Changes in Gene Expression in Response to High Light in *Arabidopsis*. *Plant Physiology.* 130: 1109–1120.
- Sakai, T., Takahashi, Y. y Nagata, T. 1996. Analysis of the Promoter of the Auxin-Inducible Gene, *parC*, of Tobacco. *Plant Cell Physiol.* 37(7): 906-913.
- Schmid, V. H. 2008. Light-harvesting complexes of vascular plants. *Cell Mol. Life Sci.* 65: 3619-3639.
- Shen, Q.J. y Ho, T.H. 1995. Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *Plant Cell.* 7 (3): 295-307.
- Shen, Q.J., Zhang, P. y Ho, T.H. 1996. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell.* 8 (7): 1107-1119.
- Shewmaker, C.K., Sheehy, J.A., Daley, M., Colburn, S. y Ke, D.Y. 1999. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J.* 20:401-412.
- Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A. y Lukyanov, S. A. 1995. An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23: 1087–1088.
- Sieburth, L.E. y Meyerowitz, E. 1997. Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell.* 9: 355–365.
- Simkin, A.J., Zhu, C., Kuntz, M. y Sandmann, G. 2003. Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*) leaves. *J. Plant Physiology* 160: 439-443.
- Singer, S.D., Cox, K.D. y Liu, Z. 2011. Enhancer–promoter interference and its prevention in transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 30: 723–731.

- Skelton, R.L., Yu, Q., Srinivasan, R., Manshardt, R., Moore, P.H. y Ming, R. 2006. Tissue differential expression of lycopene  $\beta$ -cyclase gene in papaya. *Cell Research*. 16: 731-739.
- Snodderly, D. 1995. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 1448S-1461S.
- Söderman, E., Brocard, I., Lynch, Y. y Finkelstein, R. 2000. Regulation and function of the *Arabidopsis* ABA-insensitive4 gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiol.* 124: 1752-1765
- Sparkes, I.A., Runions, J., Kearns, A. y Hawes, C. 2006. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols*. 1 (4): 2019-2025.
- Spolaore, S., Trainotti, L y Casadoro, G. 2001. A simple protocol for transient gene expression in ripe fleshy fruit mediated by *Agrobacterium*. *Journal of Experimental Botany*. 52 (357): 845-850.
- 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. *Biol. Res.* 41: 289-301.
- Steinmuller, D. Y Tevini, M. 1985. Composition and function of plastoglobuli. *Planta* 163: 201-207.
- Swarup, R., Parry, G., Graham, N., Allen, T. y Bennett, M. 2002. Auxin cross-talk: integration of signalling pathways to control plant development. *Plant Molecular Biology*. 49: 411-426.
- Takano, H., Obitsu, S., Beppu, T. y Ueda, K. 2005. Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3 (2): Identification of extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. *J. Bacteriol.* 187: 1825-1832.
- Tanumihardjo, S.A. y Yang, Z. 2005. Carotenoids: Epidemiology of health effects. En: Caballero B, Allen L, Prentice A (eds). *Encyclopedia of human nutrition*, 2° edición. Elsevier Ltd., Oxford, Pp: 339-345.
- Taylor, M. y Ramsay, G. 2005. Carotenoid biosynthesis in plant storage organs: recent advances and prospects for improving plant food quality. *Physiologia Plantarum* 124: 143-151.
- Telfer, A. 2005. Too much light? How beta-carotene protects the photosystem II reaction centre. *Photochem. Photobiol. Sci.* 4: 950-956.
- Thompson, A.J., Jackson, A.C., Parker, R.A., Morpeth, D.R., Burbidge, A. y Taylor, I.B. 2000a. Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol.* 42: 833-845.
- Thompson, A.J., Jackson, A.C., Symonds, R.C., Mulholland, B.J., Dadswell, A.R., Blake, P.S., Burbidge, A. y Taylor, I.B. 2000b. Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. *Plant J.* 23: 363-374.

- Thompson, A.J., Thorne, E.T., Burbidge, A., Jackson, A.C., Sharp, R.E. y Taylor, I.B. 2004. Complementation of *notabilis*, an abscisic acid-deficient mutant of tomato: importance of sequence context and utility of partial complementation. *Plant, Cell and Env.* 27 (4): 459–471.
- Thompson, A.J., Mulholland, B.J., Jackson, A.C., McKee, J.M., Hilton, H.W., Symonds, R.C., Sonneveld, T., Burbidge, A., Stevenson, P. y Taylor, I.B. 2007. Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots. *Plant Cell Environ.* 30: 67–78.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. y Rodríguez-Concepción, M. 2010. Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107 (25): 11626- 11631.
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K., Kozuka, J. y Yamaguchi, S. 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455: 195-200.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (21): 11632-11633.
- Vishnevetsky, M., Ovadis, M. y Vainstein, A. 1999. Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant. Sci.* 4: 232–235.
- von Lintig, J., Welsch, R., Bonk, M., Giuliano, G., Batschauer, A. y Kleinig, H. 1997. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapsis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J.* 12: 625-634.
- Walther, D., Brunnemann, R. y Selbig, J. 2007. The Regulatory Code for Transcriptional Response Diversity and Its Relation to Genome Structural Properties in *A. thaliana*. *PLoS Genetics.* 3 (2): 216-229.
- Welsch, R., Beyer, P., Huguency, P., Kleinig, H. y von Lintig, J. 2000. Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* 211: 846-854.
- Welsch, R., Medina, J., Giuliano, G., Beyer, P. y von Lintig, J. 2003. Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 523-534.
- Welsch, R., Maass, D., Voegel, T., DellaPenna, D. y Beyer, P. 2007. Transcription Factor RAP2.2 and Its Interacting Partner SINAT2: Stable Elements in the Carotenogenesis of *Arabidopsis* Leaves. *Plant Physiology* 145: 1073–1085.
- 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: 367–380.



- Wilson, A.K., Pickett, F.B., Turner, J.C. y Estelle, M. 1990. A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Mol. Gen. Genet.* 222: 377–383.
- Woitsch, S. y Römer, S. 2003. Expression of xanthophyll biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation. *Plant Physiol.* 132: 1508-1517.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. 2005. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant. Sci.* 10 (2): 88-94.
- Yang, Y., Li, R. y Qi, M. 2000. *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J.* 22 (6): 543-551.
- Yang, G-X., Jan, A., Shen, S-H., Yazaki, J., Ishikawa, M., Shimatani, Z., Kishimoto, N., Kikuchi, S., Matsumoto, H. y Komatsu, S. 2004. Microarray analysis of brassinosteroids- and gibberellin-regulated gene expression in rice seedlings. *Mol. Gen. Genomics.* 271: 468–478.
- Ye, X., Al-Babili, S., Klot, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. y Potrykus, I. 2000. Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305.
- Zhang, M., Yuan, B. y Leng, P. 2009. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany.* 60 (6): 1579–1588.
- Zhu, Y., Tepperman, J.M., Fairchild, C.D. y Quail, P. 2000. Phytochrome B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 13419-13424.

## ANEXO

**Tabla II: Resistencia a antibiótico de los vectores usados en este trabajo**

Vector	Gen de resistencia en bacterias	Antibiótico al que resiste en bacterias	Gen de resistencia en plantas	Antibiótico al que resiste en plantas
pCR <sup>®</sup> 8	<i>Spn<sup>R</sup></i>	espectinomicina	No tiene	No aplica
pMDC111	<i>nptII</i>	kanamicina	<i>hptII</i>	higromicina
pCAMBIA 1302	<i>nptII</i>	kanamicina	<i>hptII</i>	higromicina

**Tabla III: Medios de cultivo de plantas de zanahoria (*D.c.*) y tabaco (*N.t.*)**

Medio	Higromicina (mg/L)	2,4-D (mg/L)	IBA (mg/L)	BAP (mg/L)	Cefotaxime (mg/L)
Dc.I	2	1	---	---	300
Dc.II	4	0,5	---	---	150-300
Dc.III	6	---	---	---	150-300
Nt.I	10	---	5	1	300
Nt.II	15	---	---	---	150-300
Nt.III	15	---	---	---	150-300

**Tabla IV: Programas de PCR utilizados en este trabajo**

**1: RT-PCR**

	<b>Segmento 1</b>	<b>Segmento 2</b>
<b>Paso 1</b>	70°C/ 5 min.	42°C/ 60 min.
<b>Paso 2</b>	25°C/ 5 min.	70°C/ 15 min.
<b>N° de ciclos</b>	1	1

**2: PCR convencional**

	<b>Segmento 1</b>	<b>Segmento 2</b>	<b>Segmento 3</b>
<b>Paso 1</b>	94°C/ 3-5 min.	94°C/ 45 seg.	72°C/8 min.
<b>Paso 2</b>	--	T°H/45 seg.	--
<b>Paso 3</b>	--	72°C/30seg-2 min	--
<b>N° de ciclos</b>	1	33-36	1

**3: PCR de colonias**

	<b>Segmento 1</b>	<b>Segmento 2</b>	<b>Segmento 3</b>
<b>Paso 1</b>	94°C/ 5 min.	94°C/ 1 min.	72°C/8 min.
<b>Paso 2</b>	--	T°A/45 seg.	--
<b>Paso 3</b>	--	72°C/30seg-2 min.	--
<b>N° de ciclos</b>	1	35	1

**4: GW1**

	<b>Segmento 1</b>	<b>Segmento 2</b>	<b>Segmento 3</b>	<b>Segmento 4</b>
<b>Paso 1</b>	95°C/ 3 min.	95°C/ 25 seg.	95°C/ 25 seg.	72°C/ 10 min.
<b>Paso 2</b>	--	72°C TD*/ 3 min.	66,8°C/ 3 min.	--

<b>Paso 3</b>	--	--	--	--
<b>Nº de ciclos</b>	1	7	35	1

5: GW2

	<b>Segmento 1</b>	<b>Segmento 2</b>	<b>Segmento 3</b>	<b>Segmento 4</b>
<b>Paso 1</b>	95°C/ 3 min.	95°C/ 25 seg.	95°C/ 25 seg.	72°C/ 10 min.
<b>Paso 2</b>	--	72°C TD*/ 3 min.	65°C/ 25 seg.	--
<b>Paso 3</b>	--	--	72°C/ 2min. y 25 seg.	--
<b>Nº de ciclos</b>	1	7	32	1

\*TD: touchdown, baja en un grado la T° de extensión en cada ciclo.

6: qPCR

	<b>Segmento 1</b>	<b>Segmento 2</b>	<b>Segmento 3</b>
<b>Paso 1</b>	95°C/ 3 min.	95°C/10 seg.	95°C/1 min.
<b>Paso 2</b>	--	60°C/ 20 seg.	60°C/ 30 seg.
<b>Paso 3</b>	--	--	95°C/ 30 seg.
<b>Nº de ciclos</b>	1	40	1

**Tabla V: Partidores utilizados durante este trabajo**

Nombre	Secuencia (5'-3')	T° disociación, TD (°C)	Tamaño (pb)	Descripción
18S F	TTGATTACGTCCCTG CCCTTT	52-60	196	Gen housekeeping. Utilizado para verificar la calidad del cDNA y DNA y como gen normalizador. TD fragmento: 83°C
18S R	ACAATGATCCTTCCG CAGGT			
<i>ubiq</i> F	GCTCGAGGACGGCA GAAC	53-60	121	Gen housekeeping. Utilizado para verificar la calidad del cDNA y como gen normalizador. TD fragmento: 84°C.
<i>ubiq</i> R	CTTGGGCTTGGTGT AGGTCTTC			
AP1	GTAATACGACTCACT ATAGGGC	51,9	NA	Partidor de unión al adaptador en GenomeWalker primario
AP2	ACTATAGGGCACGC GTGGT	57,8	NA	Partidor de unión al adaptador en GenomeWalker anidado
PCP1	AGAAACCCGACCTA CCACGGCTTGCTCC TT	67,8	NA	Partidor para el control positivo en el PCR primario de GenomeWalker
PCP2	CCCTTTCCTCGCAGA GGTTTTCTCTCCAGC	65,6	NA	Partidor para el control positivo en el PCR anidado de GenomeWalker
GW1 <i>lcyb1</i>	GCAAGAGGGATTGG AGGTAGATACAGA	59,2	NA	Partidor primario para GenomeWalker de <i>lcyb1</i>
GW1 <i>psy2</i>	TAACCTCCTTTGGTT TGTCCTTTTCCGGCG	63,2	NA	Partidor primario para GenomeWalker de <i>psy2</i>
GW2 <i>lcyb1</i>	AGGTGTAAGCTGCA CTCACTTGAAACA	60,8	NA	Partidor anidado para GenomeWalker de <i>lcyb1</i>
GW2 <i>psy2</i>	GCTTATTTGGGAATT GGGATTCAATGGGT G	60,6	NA	Partidor anidado para GenomeWalker de <i>psy2</i>
GW2.2 <i>lcyb1</i> 1	TAATTGCGTTGCGCT CACTGCCCGCTTT	66,5	NA	Partidor anidado para el segundo GenomeWalker de <i>lcyb1</i>
PP <i>lcyb1</i> F	CGTATTACCGCCTTT GAGTGAG	55,5	1.057	Partidor para amplificar el promotor parcial de <i>lcyb1</i> . En combinación con PC <i>lcyb1</i> R.

PP <sub>psy2</sub> F	CAGAAAAACCCAAA AAGAAATGTG	52,2	769	Partidor para amplificar el promotor parcial de <i>psy2</i> . En combinación con PC <i>psy2</i> R.
Pm/ <i>lcyb1</i> F	GCCTGATAGTCACCT GTTTCGTTGC	59,9	504	Partidor para amplificar el promotor mínimo de <i>lcyb1</i> . En combinación con PC <i>lcyb1</i> R.
Pm <sub>psy2</sub> F	GCGTTGGTTGTTTG GATTTTGAA	55,2	421	Partidor para amplificar el promotor mínimo de <i>psy2</i> . En combinación con PC <i>psy2</i> R.
PC <i>lcyb1</i> R	GGATCCTATATCTCC AAAAACAAAATCTG		NA	Partidor antisentido para amplificar el promotor de <i>lcyb1</i>
PC <i>psy2</i> R	GCTGGAGTTAGTGC TACCCAATAAAC	57,5	NA	Partidor antisentido para amplificar el promotor de <i>psy2</i>
GFP F.1	TGGGCACAAATTTTC TGTCAGTGGA	52-60	583	Gen reportero para analizar los promotores en las plantas transgénicas. TD fragmento: 85,3°C
GFP R.1	GTCTCTCTTTTCGTT GGGATCTTTTCGAA			
GFP R.2	CAGGTAATGGTTGTC TGG	50,1	NA	Partidor antisentido de <i>gfp</i> para PCR direccionales de las plantas transgénicas
GFP F.1	CAACTTCAAGACCC GCCACAACAT	60	116	Partidor de <i>gfp</i> que con GFP R.2 amplifica <i>gfp</i> en plantas transformadas transitoriamente.
HptII F	TTTGTGTACGCCCG ACAGT	52-58	235	Gen de resistencia a higromicina.
HptII R	AAGACCTGCCTGAA ACCGA			
q/ <i>lcyb1</i> F*	TGAGTGCAGCTTACA CCTACTTGATTA	50-58	161	Gen carotenogénico <i>lcyb1</i> de <i>D. carota</i> . TD fragmento: 75 °C
q/ <i>lcyb1</i> R*	AACTGCAGAAGATAT TGGAGA			
q/ <i>lcyb2</i> F	CAAGTAGATTCTCT GTGTCCAT	57-60	84	Gen carotenogénico <i>lcyb2</i> de <i>D. carota</i> . TD fragmento: 73 °C
q/ <i>lcyb2</i> R	TTACATGATTGCCCA GAAAGACTC			
q <sub>psy2</sub> F*	GCTAATAAACTTCCG TGGGTGTTTC	53-57	112	Gen carotenogénico <i>psy2</i> de <i>D. carota</i> . TD fragmento: 75°C
q <sub>psy2</sub> R*	GCTGGAGTTAGTGC TACCC			
q <sub>psy1</sub> F	AGTCGATGGAGCAT TACCATAATTC	53-57	95	Gen carotenogénico <i>psy1</i> de

qpsy1 R	CTAATGGGTTACAGA GGGTTGTGTTA			<i>D. carota</i> . TD fragmento: 72°C
qDcarg-1 F	GGGGTTACAGATTG TGACCGAAGAGAA	57-60	132	Gen <i>Dcarg-1</i> de <i>D. carota</i> . Inducible por auxinas. TD fragmento:78°C
qDcarg-1 R	TGATAGGCAAGCAA GGCGGCTGATAAT			
qNt <i>osmotin</i> F	CTTCCTCCTTGCCTT GGTGACTTATACT	57-60	165	Gen <i>osmotin</i> de <i>N. tabacum</i> . Inducible por ABA. TD fragmento: 84°C
qNt <i>osmotin</i> R	CGTGCCATTTTAGTA CCTCGTGGTGTCAT			
qNt <i>parC</i> F	GCCCCTAGTTTGCTC CCTTCTGATCCTT	57-60	127	Gen <i>parC</i> de <i>N. tabacum</i> . Inducible por auxinas. TD fragmento:79°C
qNt <i>parC</i> R	CCTCCTGCTCTTCTC CTTTTGTTGCCAT			
qNt <i>gapB</i> F	GGTCGTGGCTTGGT ACGATAACGA	57-60	121	Gen <i>gapB</i> de <i>N. tabacum</i> . Inducible por luz. TD fragmento:80°C
qNt <i>gapB</i> R	CATCCAATGGGATCT CCACTTCCTG			

NA: No aplica

TD: Temperatura de denaturación calculada con BioMath Calculators  
([http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm#melt\\_results](http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm#melt_results))