

UCH-FC
MAG-B
S613
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

“Identificación de factores de transcripción capaces de transactivar al promotor del gen *PSY2* de *D. carota*.”

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

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

Por

Kevin Matías Simpson Alfaro

Septiembre, 2015

Directora de Tesis: Dra. Claudia Stange K.

Co-Director de Tesis: Dr. Pablo Figueroa

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

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato:

Kevin Matías Simpson Alfaro

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 05 de Agosto del 2015.

Director de Tesis

Dra. Claudia Stange



Co-Director de Tesis

Dr. Pablo Figueroa



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marcelo Baeza



Dra. Lorena Norambuena



A mi Tata y a mi Lela

AGRADECIMIENTOS

Una página de una tesis no es suficiente para agradecer todo el cariño y el apoyo que he recibido en esta vida. Muchas son las personas a las que debo el haber podido completar esta etapa. Solo espero tener el tiempo suficiente para devolver todo lo que se me ha dado.

Índice de Contenidos

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
1.1 Estructura y función de los carotenoides	5
1.2 Biosíntesis de los carotenoides.....	6
1.3 Regulación de la biosíntesis de carotenoides en plantas	7
1.4 Regulación de la síntesis de carotenoides por ABA	9
1.5 Elementos de respuesta a ABA.....	11
1.6 Factores de transcripción de unión a motivos ABRE que controlan la expresión de genes regulados por ABA	12
1.7 Respuesta a ABA del promotor de <i>PSY2</i> de <i>D. carota</i>	13
1.8 Factores de transcripción tipo Alfin	16
1.9 Estrategia a utilizar	17
1.9.1 Transfección transitoria de protoplastos	18
1.9.2 Ensayo mono-híbrido en levadura	19
1.10 Hipótesis.....	21
1.11 Objetivo general	21
1.12 Objetivos específicos.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1 Cultivo de cepas bacterianas	22
2.2 Preparación de células quimiocompetentes	23
2.2.1 Preparación de <i>E. coli</i> quimiocompetente	23
2.2.2 Preparación de <i>A. tumefaciens</i> quimiocompetente	23
2.3 Transformación de células bacterianas quimiocompetentes	24
2.3.1 Transformación de <i>E. coli</i> quimiocompetentes	24
2.3.2 Transformación de <i>A. tumefaciens</i> quimiocompetentes	24
2.4 Cultivo de cepas de levadura.....	25
2.5 Transformación de levaduras	25
2.6 Extracción de ADN plasmidial a partir de células de <i>E. coli</i>	26
2.7 Extracción de ARN a partir de tejido vegetal.....	26

2.8 Digestiones enzimáticas.....	27
2.9 Diseño de partidores	27
2.10 Electroforesis en geles de agarosa	28
2.11 Purificación de bandas desde geles de agarosa	29
2.12 Reacción en cadena de la polimerasa PCR	29
2.12.1 PCR convencional	29
2.12.2 PCR convencional con enzima <i>Pfu</i> ADN polimerasa	30
2.12.3 PCR de colonias	30
2.12.4 RT-PCR.....	31
2.13 Generación de las construcciones pK7RWG2-FT, pDEST22-FT y pDEST32-FT	32
2.13.1 Obtención de las secuencias de interés	32
2.13.2 Clonación de las secuencias de interés en el vector pCR8.....	32
2.13.3 Recombinación mediante tecnología Gateway	33
2.14 Análisis bioinformático.....	34
2.15 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Daucus carota</i>	35
2.16 Inducción de callos a partir de explantes de <i>Daucus carota</i>	35
2.17 Obtención de cultivos de suspensiones celulares de <i>Daucus carota</i>	36
2.18 Obtención de protoplastos de <i>Daucus carota</i> a partir de de suspensiones celulares	36
2.19 Transfección de protoplastos de <i>D. carota</i>	37
2.20 Transformación transitoria de hojas de <i>Nicotiana tabacum</i>	38
2.21 Microscopía.....	39
2.22 Generación de las construcciones pP1-AbAi y pP2-AbAi.....	39
2.23 Generación de la cepa de levadura reportera.....	41
2.24 Ensayo mono-híbrido en levadura	42
2.25 Caracterización de las transformantes MaV203	45
RESULTADOS	47
3.1 Identificación de secuencias que codifiquen para factores de transcripción de tipo AREB/ABF y Alfin en <i>D. carota</i>	47
3.1.1 Predicción de sitios de unión de factores de transcripción al promotor del gen <i>PSY2</i> de <i>D. carota</i>	47

3.1.2 Predicción de secuencias con homología a factores de transcripción del tipo ABRE y Alfin.....	48
3.2 Determinación de la localización subcelular de los factores de transcripción seleccionados	53
3.2.1 Amplificación de las secuencias de interés	53
3.2.2 Clonación de las secuencias de interés en el vector de entrada pCR8.....	54
3.2.3 Recombinación de los vectores pCR8-FT con el vector de destinación pK7RWG2	56
3.2.4 Transformación transitoria de <i>N. tabacum</i>	57
3.3 Transfección de protoplastos de <i>D. carota</i>	60
3.3.1 Obtención de protoplastos a partir de cultivos celulares de <i>D. carota</i>	60
3.3.2 Transfección de protoplastos de <i>D. carota</i> con las construcciones pK7RWG2-FT	61
3.4 Determinación de la capacidad de activar la transcripción de las secuencias.....	64
3.4.1 Generación de los vectores pDEST22-FT y pDEST32-FT	64
3.4.2 Transformación de levaduras MaV203.....	66
3.4.3 Caracterización de levaduras MaV203 transformadas con las construcciones pDEST32-FT	68
3.5 Determinación la unión de las secuencias al promotor de <i>PSY2</i> de <i>D. carota</i>	70
3.5.1 Generación de las construcciones pP1-AbAi y pP2-AbAi	70
3.5.2 Transformación de levaduras Y1HGold	72
3.5.3 Determinación de la interacción entre las secuencias de interés y el promotor de <i>PSY2</i> de <i>D. carota</i>	74
DISCUSIÓN	79
4.1 Elementos reguladores de la transcripción presentes en el promotor del gen <i>PSY2</i> de <i>D. carota</i>	79
4.2 Identificación de factores de transcripción de tipo AREB/ABF y Alfin en el transcriptoma de <i>D. carota</i>	82
4.3 Generación de las construcciones portadoras de las secuencias identificadas.....	84
4.4 Localización sub-celular de las secuencias seleccionadas	85
4.5 Transfección de protoplastos	87
4.6 Ensayos de mono-híbrido en levadura.....	90
4.6.1 Interacción de los factores de transcripción con el promotor de <i>PSY2</i>	90

4.6.2 Activación de la transcripción de genes reporteros en levadura por los factores de transcripción	94
CONCLUSIONES	98
REFERENCIAS.....	99
ANEXO.....	105

Índice de Tablas

Tabla I. Partidores utilizados en este trabajo.....	28
Tabla II. Placas utilizadas para la caracterización de las células de levadura transformadas con los vectores pDEST32-FT.....	46
Tabla III. Enzimas de restricción utilizadas para digerir los vectores pCR8-FT y definir la orientación de clonación.....	54
Tabla IV. Tamaño de bandas esperado al digerir los vectores pK7RWG2-FT con la enzima de restricción <i>Ava</i> I.....	56
Tabla V. Enzimas de restricción utilizadas para digerir los vectores pDEST22-FT y pDEST32-FT.	65
Tabla A. Programas PCR.....	105

Índice de Figuras

Figura 1. Ruta de biosíntesis de carotenoides.	7
Figura 2. Efecto de ABA en los niveles de expresión del gene <i>PSY2</i> de <i>D. carota</i>	14
Figura 3. Niveles de transcrito de <i>GFP</i> en plantas de tabaco transgénicas con las construcciones del promotor de <i>PSY2</i> tratadas con ABA.....	15
Figura 4. Vector de destinación pK7RWG2.	38
Figura 5. Vector pAbAi.....	41
Figura 6. Ensayo para la detección de interacciones ADN-proteína utilizando el kit comercial Matchmaker Gold One-Hybrid System.....	43
Figura 7. Vectores de destinación pDEST22 y pDEST32.....	45
Figura 8. Distribución de los elementos de respuesta a ABA y sitios de unión para factores de transcripción de tipo Alfin en el promotor <i>PSY2</i> de <i>D. carota</i>	47
Figura 9. Identificación de dominios conservados en las secuencias de <i>D. carota</i>	52
Figura 10. Amplificación de las secuencias de interés a partir de ADNc de <i>D. carota</i>	53
Figura 11. Digestión de los vectores pCR8-FT.....	55
Figura 12. Digestión de los vectores pK7RWG2-FT.....	57
Figura 13. Transformación transitoria doble de hojas de <i>N. tabacum</i> con las construcciones pK7RWG2-FT y el vector pCAMBIA1302.	60
Figura 14. Transcurso temporal de la obtención de protoplastos.	61
Figura 15. Transfección de protoplastos con los vectores pK7RWG2-FT.....	63
Figura 16. Fluorescencia basal de protoplastos luego de la transfección.....	64
Figura 17. Digestión de colonias <i>E. coli</i> que portan los vectores pDEST22-FT y pDEST32-FT.	66
Figura 18. PCR realizado a levaduras MaV203 transformadas con los vectores pDEST32-FT.....	67
Figura 19. Ensayo de expresión de los genes reporteros <i>URA3</i> , <i>HIS3</i> y <i>lacZ</i> en levaduras MaV203 transformadas con las construcciones pDEST32-FT.....	70
Figura 20. PCR realizado a colonias transformadas con las construcciones pCR8-P1 y pCR8-P2.....	71
Figura 21. Digestión de los vectores pCR8-P1, pCR8-P2 y pAbAi.	71
Figura 22. Digestión de los vectores pP1-AbAi y pP2-AbAi.....	72
Figura 23. PCR realizado a colonias de levaduras Y1HGold transformadas con las construcciones pP1-AbAi y pP2-AbAi.....	73

Figura 24. PCR realizado a colonias de levaduras Y1HGold-pP2-AbAi transformadas con las construcciones pDEST22-FT.	75
Figura 25. Esquema de la detección de la interacción entre los factores de transcripción y el promotor de <i>PSY2</i>	76
Figura 26. Interacción entre los factores de transcripción y el promotor de <i>PSY2</i>	78

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2,4-D : Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- ABA : Ácido abscísico
- AbA : Aureobasidin A
- ABF : Factor de unión a elementos de respuesta a ABA
- ABRE : Elementos de respuesta a ABA
- ADN : Ácido desoxirribonucleico
- ADNc : Ácido desoxirribonucleico complementario
- AREB : De unión a elementos de respuesta a ABA
- ARN : Ácido ribonucleico
- bZIP : Cremallera de leucina de carácter básico
- CE : Elemento acoplador
- D.O. : Densidad Óptica
- dNTP : Desoxinucleótido trifosfato
- GAL4 AD : Dominio de activación de GAL4
- GAL4 DBD : Dominio de unión a ADN de GAL4
- GFP : Proteína fluorescente verde
- Kb : Kilobase
- P1 y P2 : Promotores del gen *PSY2* 1 y 2
- pb : Pares de bases
- PCR : Reacción en cadena de la Polimerasa
- PHD : Homeodominio de planta
- PSY : Fitoeno sintasa
- RFP : Proteína fluorescente roja
- SD : Sintético definido

RESUMEN

Los carotenoides son compuestos isoprenoides sintetizados por organismos fotosintéticos y por algunos no fotosintéticos. Uno de los mecanismos más importantes en la regulación de la síntesis de carotenoides en plantas es la regulación a nivel transcripcional, la cual puede ocurrir en respuesta a luz y a hormonas, como el ácido abscísico. Esta fitohormona es sintetizada en el citoplasma a partir de la ruta de los carotenoides, y se encuentra involucrada en importantes procesos del desarrollo de plantas, además de mediar la respuesta a estrés abiótico. La mayoría de los genes regulados por ABA contienen elementos de respuesta a ABA (ABRE), de secuencia ACGTGG/TC, en sus promotores, la cual es reconocida por factores de transcripción del tipo bZIP. En particular los miembros de la subfamilia A de *A. thaliana*, denominada AREB/ABF, han mostrado unirse a motivos ABRE *in vitro* y activar la expresión génica dependiente de ABA.

En *Daucus carota*, nuestro modelo de estudio, se ha demostrado que el promotor del gen *PSY2* es capaz de responder a ABA. *PSY2* codifica para la enzima fitoeno sintasa (PSY) y que es considerada el primer paso limitante de la ruta de síntesis de carotenoides. El análisis bioinformático de este promotor reveló la existencia de 3 motivos ABRE, de los cuales 2 se encuentran próximos entre sí. También se encontraron 11 sitios de unión para factores de transcripción Alfin, los cuales están involucrados en procesos como el desarrollo de la raíz, la elongación de pelos radiculares y la regulación de la tolerancia a estrés por sal.

Mediante el alineamiento entre el transcriptoma de *D. carota* y la base de datos de factores de transcripción PlantTFDB, en este trabajo se identificaron 5 secuencias con homología a factores de transcripción de la subfamilia AREB/ABF (ABRE1-5) y 3 a la familia Alfin (Alfin1-3). Los 5 factores de transcripción ABRE poseen el dominio

característico de la familia de factores de transcripción bZIP, mientras que los tres factores de transcripción Alfin poseen los dominios DUF3594 y PHD. La infiltración de hojas de tabaco y la transfección de protoplastos de *D. carota* permitió determinar que todas las proteínas analizadas localizan en el núcleo, a excepción de Alfin2 que además posee localización citoplasmática. Mediante un ensayo de mono-híbrido en levadura se determinó que los factores de transcripción ABRE y Alfin analizados transactivan al promotor del gen *PSY2* de *D. carota*. Sin embargo, los factores de transcripción CAREB1 y CAREB2, los cuales se unen a motivos ABRE del promotor del gen *Dc3* demostraron no ser capaces transactivar al promotor de *PSY2*. El trabajo realizado permitió encontrar en *D. carota* factores de transcripción pertenecientes a la familia de factores de transcripción AREB/ABF y Alfin capaces de transactivar al promotor del gen carotenogénico *PSY2* de *D. carota*.

ABSTRACT

Carotenoids are isoprenoids compounds synthesized by photosynthetic and some non-photosynthetic organisms. One of the most important regulation mechanisms of the carotenoid synthesis is the regulation at the transcriptional level, which can occur in response to light and hormones, like abscisic acid (ABA). This fitohormone is synthesized in the cytoplasm through the carotenoid pathway, and is involved in important plant development processes, and in mediating abiotic stress response. Most of ABA-regulated gene promoters contain ACGTGG/TC motifs, denominated ABA responsive elements (ABRE), which is recognized by bZIP transcription factors. Particularly the members of the subfamily A of *A. thaliana* AREB/ABF have shown to bind to ABRE *in vitro* and activate the ABA-dependent gene expression.

In *Daucus carota*, our study model, it was demonstrated that the *PSY2* gene promoter is able to respond to ABA. *PSY2* gene encodes the enzyme phytoene synthase, the first committed step in the carotenoid biosynthesis pathway. Bioinformatic analysis of this promoter showed the presence of 3 ABRE, of which 2 are close to each other. Furthermore, 11 Alfin transcription factor binding sites were found, which are involved in processes such as root development, root hair elongation, and regulation of salt stress tolerance. Through the alignment between the transcriptome of *D. carota* and the data base of transcription factors PlantTFDB, in this work we identified 5 sequences with homology to the subfamily of transcription factors AREB/ABF (ABRE1-5) and 3 to the Alfin family (Alfin1-3). All ABRE transcription factors showed to contain the characteristic domain of of the bZIP transcription factors family, while the three Alfin transcription factor showed to contain the DYF3594 and PHD domains. The infiltration of tobacco leaves and transfection of *D. carota* protoplasts allowed to determine that all proteins localized in the nucleus, except for Alfin2 which also has a cytoplasmic

localization. Using a yeast one-hybrid assay we found that the ABRE and Alfin transcription factors analyzed transactivate the *D. carota* *PSY2* promoter. However, the transcription factors CAREB1 and CAREB2, which bind to ABRE present in the carrot Dc3 gene promoter, were not able to transactivate the *PSY2* promoter. This work allowed to find in *D. carota* transcription factors with homology to the AREB/ABF and Alfin transcription factors family which can transactivate the promoter of *D. carota* *PSY2* gene.

INTRODUCCIÓN

1.1 Estructura y función de los carotenoides

Los carotenoides son un grupo de compuestos isoprenoides sintetizados por organismos fotosintéticos y también por algunas bacterias y hongos no fotosintéticos (Lu y Li, 2008). Estas moléculas se forman a partir de la condensación de ocho unidades isoprenoides para formar un esqueleto hidrocarbonado de 40 carbonos, el cual contiene hasta 15 doble enlaces conjugados y un grupo lineal o cíclico en cada extremo. Esta estructura es capaz de actuar como un cromóforo al absorber luz y generar color (Giorio y col., 2007; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Se han descrito más de 700 diferentes carotenoides, los cuales pueden dividirse en dos grandes grupos: los carotenos, que están compuestos solo por átomos de carbono e hidrógeno, y las xantófilas, que poseen átomos de oxígeno en su estructura (Giorio y col., 2007).

Los carotenoides han sido reconocidos como nutrientes esenciales y compuestos importantes para la salud (Fraser y Bramley, 2004; Krinsky y Johnson, 2005), y debido a que los animales no son capaces de sintetizarlos, estos necesitan incorporarlos en la dieta ya que son precursores de la vitamina A y retinoides (Bollag, 1996). En plastidios de organismos fotosintéticos los carotenoides funcionan como estabilizadores de membrana, además de actuar como pigmentos cosechadores de luz accesorios durante la fotosíntesis y proveer la coloración roja, naranja y amarilla a órganos no fotosintéticos como raíces, frutos y flores, facilitando la polinización (Grotewold, 2006; Rodríguez-Concepción, 2010). También protegen a la célula vegetal del daño foto-oxidativo mediante la disipación del exceso de energía lumínica y la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través del ciclo de las xantófilas (Davison y col., 2002). Adicionalmente, los carotenoides participan en la

biosíntesis de reguladores del crecimiento como ácido abscísico (ABA) y estrigolactonas (Botella-Pavia y col., 2004; Pizarro y Stange, 2009).

1.2 Biosíntesis de los carotenoides

Los carotenoides son sintetizados en los plastidios de organismos fotosintéticos a partir de la condensación de dos moléculas de GGPP, la cual es catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY), y como resultado se genera fitoeno (Figura 1) (Giuliano y col., 2008). La síntesis de fitoeno catalizada por PSY es un punto clave de regulación en la producción de carotenoides (Welsch y col., 2007; Lu y Li, 2008; Maass y col., 2009; Rodríguez-Villalón y col., 2009). La acción secuencial de 4 enzimas convierten al fitoeno en licopeno, y la ciclación de los extremos de la molécula de licopeno divide la ruta de biosíntesis de carotenoides en dos ramas principales. Por un lado, la ciclación de un extremo de esta molécula por la enzima licopeno β -ciclasa (LCYB) y del otro extremo por la licopeno ϵ -ciclasa (LCYE) permite la síntesis de α -caroteno, mientras que la ciclación de ambos extremos por la sola acción de LCYB conduce a la formación de β -caroteno (Cunningham y Gantt, 1998). Tanto α - como β -caroteno pueden ser posteriormente hidroxilados para formar luteína y zeaxantina, respectivamente. La zeaxantina puede ser transformada en violaxantina mediante la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP), para generar como resultado final de esta ruta el ABA. (Milborrow, 2001; Nambara y Marion-Poll, 2005). Además, la degradación del β -caroteno por dioxigenasas (CCD7, CCD8) genera diversos apocarotenoides, entre los que se encuentran las estrigolactonas (Auldridge y col., 2006; Ruyter-Spira y col., 2013).

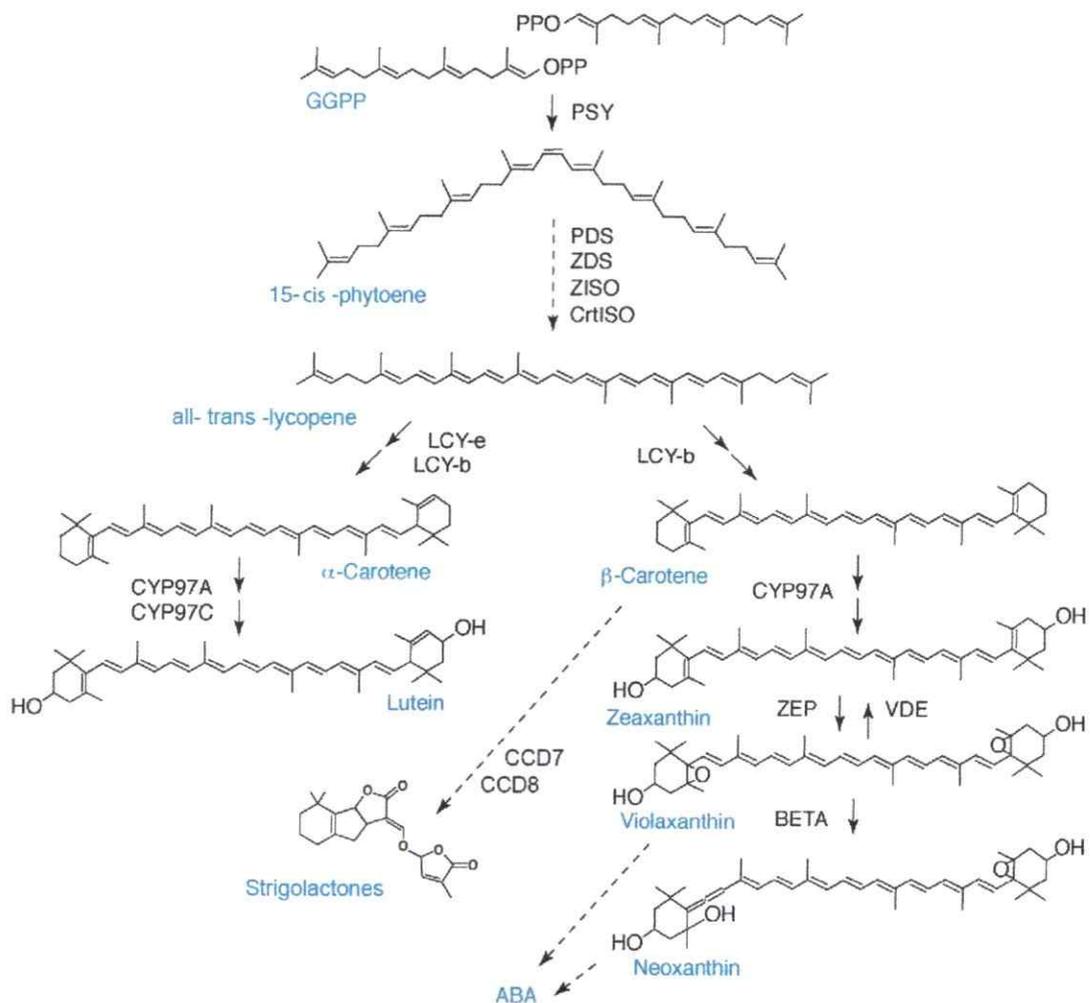


Figura 1. Ruta de biosíntesis de carotenoides. Se ilustra la ruta de síntesis de carotenoides a partir de la condensación de dos moléculas de geranil-geranil difosfato (GGPP) hasta la síntesis del ácido abscísico (ABA). El nombre de los compuestos se presenta en azul y el de las enzimas en negro. PSY: fitoeno sintasa; PDS: fitoeno desaturasa; ZDS: ζ-caroteno desaturasa; ZISO: ζ-caroteno isomerasa; CrtISO: caroteno isomerasa; LCY-b: licopeno β-ciclasa; LCY-e: licopeno ε-ciclasa; CYP97A: citocromo P450 caroteno β-hidroxilasa; CYP97C: citocromo P450 caroteno ε-hidroxilasa, VDE: violaxantina de-epoxidasa; ZEP: zeaxantina epoxidasa; BETA: beta ciclasa específica de cromoplastos; CCD7 y CCD8: dioxigenasas de ruptura de carotenoides 7 y 8. Esquema modificado a partir de Giuliano y col. 2008.

1.3 Regulación de la biosíntesis de carotenoides en plantas

Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos para controlar la síntesis y acumulación de carotenoides, permitiendo así una expresión diferencial de

carotenoides en los tejidos y durante el desarrollo de la planta (Lu y Li, 2008). Se ha descrito que la regulación de su biosíntesis puede ocurrir a nivel génico, en donde diferentes isoformas de la misma enzima se encuentran presentes en la misma planta. Por ejemplo, en tomate se han descrito dos genes que codifican para las enzimas PSY y LCYB, en donde *PSY1* y *CYCB* participan en la síntesis de carotenoides durante la maduración de frutos mientras que *PSY2* y *LCYB* se expresan preferentemente en hojas (Giorio y col., 2008). También se ha demostrado que genes parálogos pueden ser inducidos bajo diferentes estímulos; en maíz y arroz el gen *PSY3* es inducido en respuesta a ABA y es expresado principalmente en raíz, mientras *PSY1* y *PSY2* son inducidos por luz y se expresan principalmente en las hojas (Li y col., 2008; Welsch y col., 2008).

Además la síntesis de carotenoides puede ser regulada mediante su secuestro y acumulación en diferentes tipos de plastidios (Deruere y col., 1994; Vishnevetsky y col., 1999); a nivel post-traducciona l e incluso a nivel epigenético (Cazzonelli y col., 2009).

Sin embargo, uno de los mecanismos más importantes en la regulación de la síntesis de carotenoides es la regulación a nivel transcripcional, permitiendo que la expresión de genes involucrados directamente en la síntesis de carotenoides ocurra en un contexto espacio-temporal determinado (Cazzonelli y Pogson, 2010). La regulación a nivel transcripcional ocurre en respuesta a diversos estímulos, como luz, durante el desarrollo y maduración de frutos, estrés biótico y abiótico, retroalimentación negativa y en respuesta a fitohormonas (Lu y Li, 2008). Se ha demostrado que la expresión de *PSY* aumenta cuando las hojas son expuestas a la luz debido a la degradación de factores de transcripción que reprimen la expresión de este gen, gatillando un incremento en la producción de carotenoides (Toledo-Ortiz y col., 2010).

Por otro lado, tanto en maíz como en arroz, se ha reportado que la expresión del gen *PSY3* es inducido por estrés salino y por sequía, y que la inducción de estos genes está relacionada con un aumento en los niveles de ABA y carotenoides (Li y col., 2008; Welsch y col., 2008).

1.4 Regulación de la síntesis de carotenoides por ABA

La hormona ABA es un apocarotenoide sintetizado en el citoplasma de la célula vegetal a partir de la ruta de los carotenoides (Figura 1). Esta fitohormona participa en muchos procesos fisiológicos y de desarrollo en plantas (Zeevaart y Creelman, 1988). Entre otros procesos, se encuentra involucrada en el establecimiento de la dormancia de yemas y semillas, regulación del crecimiento, senescencia foliar y abscisión, control del cierre estomático y la respuesta a varios estreses abióticos, como frío, sequía y salinidad (Leung y Giraudat, 1998; Finkelstein y col., 2002; Himmelbach y col., 2003; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005). El alto grado de versatilidad alcanzado por esta hormona se logra a través de un riguroso control de la biosíntesis de ABA y la intercomunicación con otras hormonas (Fedoroff, 2002; Seo y Koshiba, 2002). En particular, esta fitohormona se encuentra estrechamente relacionada con procesos de deshidratación celular durante la maduración de semillas y el crecimiento vegetativo. El incremento en los niveles de ABA en respuesta a estrés osmótico, como sequía y salinidad, induce la expresión de una gran cantidad de genes involucrados en la respuesta y tolerancia a deshidratación tanto en semillas como en tejido vegetativo (Finkelstein y col., 2002).

El estrés osmótico es capaz de inducir la síntesis *de novo* de ABA, y se ha determinado que en hojas la enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED), responsable de convertir la violaxantina y neoxantina en los precursores de ABA, es una enzima limitante en la biosíntesis de esta hormona inducida por estrés (Schwartz y

col., 1997; Thompson y col., 2000; Iuchi y col., 2001). Sin embargo, se ha determinado que los niveles de carotenoides no limitan el flujo de precursores hacia la síntesis de ABA en hojas debido a que en este tejido estos pigmentos son abundantes (Iuchi y col., 2000; Thompson y col., 2000).

Por otro lado, se ha reportado que en raíz también existe un aumento en los niveles de ABA en respuesta a estrés osmótico. Si bien al igual que en hojas la enzima NCED también sería limitante en la biosíntesis de ABA en raíces (Thompson y col., 2000), se ha determinado que también sería necesario un aumento en la síntesis de carotenoides para elevar los niveles de ABA en respuesta a estrés osmótico en raíz (Audran y col., 1998; Thompson y col., 2000; Thompson y col., 2007). En este sentido, se ha reportado que ABA es capaz de regular la síntesis de sus propios precursores metabólicos mediante la regulación de genes involucrados directamente en la síntesis de carotenoides. Específicamente, tanto el estrés salino como la aplicación exógena de ABA produce un aumento en la expresión del gen *PSY* solo en la raíz de plántulas de *A. thaliana* (Ruiz-Sola y col., 2014). Del mismo modo, la expresión de los genes *PSY3* de arroz y maíz también se ve aumentada especialmente en raíz luego de estrés salino, sequía y la aplicación exógena de ABA (Li y col., 2008; Welsch y col., 2008; Li y col., 2009). En contraste con los otros dos genes *PSY* encontrados en arroz, los niveles de transcrito de *PSY3* no se encuentran regulados por luz, mientras que su expresión aumentan en respuesta a ABA. El análisis bioinformático de las regiones promotoras de estos genes muestra que los promotores de *PSY1* y *PSY2* poseen un elemento I y tres IV, además de una AE-box, involucrados en la respuesta a luz y ausentes en *PSY3*, lo que explicaría su incapacidad de responder a luz. Además, al igual que el promotor de *PSY* de *A. thaliana*, los tres promotores de *PSY* de arroz comparten una G-box, la cual mostró ser la principal responsable de la inducción por luz de *PSY* de *A.*

thaliana (Welsch y col., 2003). Sin embargo, esta G-box estaría involucrada en mediar la respuesta a ABA en el gen de *PSY3* (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005).

1.5 Elementos de respuesta a ABA

Una parte importante de la respuesta fisiológica a ABA se lleva a cabo mediante la regulación a nivel transcripcional de genes (Busk y Pages, 1998). El análisis de la región promotora de genes regulados por ABA permitió determinar que la secuencia ACGTGG/TC, muy conservada en la mayoría de los promotores, es un elemento en *cis* determinante en la respuesta a ABA, y fue denominada como elemento de respuesta a ABA (ABRE) (Busk y Pages, 1998; Hattori y col., 2002; Gomez-Porras y col., 2007). Este elemento pertenece a la familia G-box, la cual ha sido implicada en un amplio rango de mecanismos en plantas (Menkens y col., 1995), y fue primero identificado en los promotores de los genes *Em* de trigo y *rab-16A* de arroz, ambos inducibles por ABA, en donde se determinó que esta secuencia era capaz de conferir expresión en respuesta a ABA (Marcotte y col., 1989; Mundy y col., 1990). Los motivos ABRE contiene la secuencia central ACGT, la cual es reconocida por varios factores de transcripción del tipo cremallera de leucina de carácter básico (bZIP) (Guiltinan y col., 1990; Hobo y col., 1999; Choi y col., 2000; Uno y col., 2000). Se ha establecido que una copia de un motivo ABRE es necesaria pero no suficiente para inducir la transcripción en respuesta a ABA, ya que se necesita un elemento adicional, generalmente conocido como elemento acoplador (CE), para establecer un complejo mínimo de respuesta a ABA (ABRC) (Shen y col., 1996). La mayoría de los CE conocidos son similares a los motivos ABRE, y contienen un motivo A/GCGT. Sin embargo, también se ha descrito que un motivo ABRE puede funcionar como un CE para otro motivo ABRE (Hobo y col., 1999).

1.6 Factores de transcripción de unión a motivos ABRE que controlan la expresión de genes regulados por ABA

Los factores de transcripción juegan un papel importante en el control de la expresión de genes regulados por ABA mediante la interacción con elementos *cis* presentes en sus promotores (Fujita y col., 2011). En 1990 Guiltinan y col. mostraron que la proteína de unión a motivos ABRE EmBP-1 poseía un dominio básico junto a un dominio de cremallera de leucina, ambos presentes en la familia de factores de transcripción bZIP: (Guiltinan y col., 1990). Diez años más tarde se identificó una subfamilia de factores de transcripción bZIP del grupo A en *A. thaliana* capaces de unirse a motivos ABRE, los cuales fueron denominados como proteínas de unión a ABRE (AREB) (AREB1-AREB3) (Uno y col., 2000) o factores de unión a ABRE (ABF) (ABF1-ABF4) (Choi y col., 2000). Los AREB/ABF no solo demostraron unirse a motivos ABRE *in vitro* y activar la expresión génica dependiente de ABA, sino que también regular la respuesta a ABA asociada al estrés en plantas (Fujita y col., 2005; Furihata y col., 2006; Kim, 2006). La sobreexpresión de genes que codifican para ABF3 o ABF4 en *A. thaliana* altera los niveles de expresión de genes regulados por ABA, confiere hipersensibilidad a ABA y tolerancia a la sequía y a otros estreses abióticos (Kang y col., 2002; Kim y col., 2004a). Además, consistente con su papel como activadores en la respuesta ABA, mutantes knockout de ABF3 y ABF4 son parcialmente insensibles a ABA y sensibles a sequía (Kim y col., 2004c).

El dominio bZIP está compuesto por una α -hélice ininterrumpida, la cual comprende dos motivos: una región básica, necesaria y suficiente para la unión a ADN, seguida de una cremallera de leucina, responsable de la dimerización de estos factores de transcripción (Schumacher y col., 2000; Miller y col., 2003). Interesantemente, si bien en el genoma de *A. thaliana* se conocen más de 75 miembros de la familia bZIP,



clasificados en más de 10 grupos, todos los factores de transcripción bZIP involucrados en la señalización de ABA pertenecen al grupo A (Fujita y col., 2011). El análisis filogenético (Bensmihen y col., 2002; Yoshida y col., 2010) de los factores de transcripción bZIP del grupo A ha permitido dividirlos en 2 grupos: la familia de 5 genes ABI5/AtDPBF (ABI5, EEL, DPBF2/AtbZIP67, DPBF4, y AREB3), los cuales poseen un papel en la maduración y desarrollo de semillas (Lopez-Molina y Chua, 2000; Bensmihen y col., 2002; Kim y col., 2002; Bensmihen y col., 2005; Kim, 2006), y la familia de genes AREB/ABF (AREB1/ABF2, AREB2/ABF4, ABF1, y ABF3), los cuales se expresan principalmente en tejido vegetativo bajo estrés abiótico (Choi y col., 2000; Uno y col., 2000; Kang y col., 2002; Kim y col., 2002; Fujita y col., 2005).

En *D. carota* se han descrito algunos factores de transcripción pertenecientes a la familia b-ZIP que están involucrados en la vía de señalización de ABA durante la embriogénesis somática. Un homólogo de *ABI3* de *A. thaliana* (*C-ABI3*) se expresa específicamente en células embrionarias, embriones somáticos y semillas en desarrollo de *D. carota*, en donde el incremento en la expresión de *C-ABI3* se observó antes de que se produjera el incremento en los niveles de ABA endógeno (Shiota y col., 1998). Otros dos factores de transcripción del tipo b-ZIP, *CAREB1* y *CAREB2*, expresados en embriones somáticos de *D. carota* fueron encontrados mediante el sistema de monohíbrido, y ambos se unieron *in vitro* a motivos ABRE (Guan y col., 2009).

1.7 Respuesta a ABA del promotor de *PSY2* de *D. carota*

Como se mencionó anteriormente, dentro de los motivos regulatorios encontrados mediante el análisis bioinformático de la región promotora del gen *PSY2* de *D. carota* (Fuentes, 2011) se encontraron 3 motivos ABRE. Dos de estos elementos se encuentran cercanos entre sí, sugiriendo que estos dos motivos ABRE podrían estar actuando como un complejo de respuesta a ABA, lo que indicaría que este

promotor posee la capacidad de responder a ABA (Gomez-Porras y col., 2007). La capacidad de responder a ABA de este promotor fue demostrada mediante la aplicación de ABA exógeno a plántulas de *D. carota*, en donde se observó que la adición de tres concentraciones diferentes de ABA produce un aumento significativo de entre 5 a 6 veces en la expresión del gen *PSY2* con respecto a su control (Figura 2) (Fuentes, 2011).

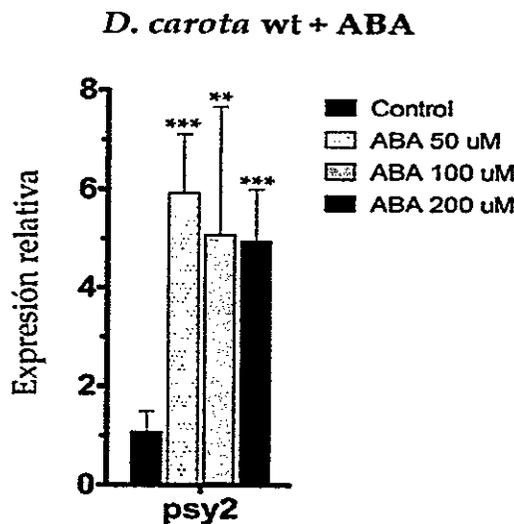


Figura 2. Efecto de ABA en los niveles de expresión del gen *PSY2* de *D. carota*. Niveles de transcrito del gen *PSY2* en plantas de *D. carota* silvestres tratadas con ABA. Todos los valores están normalizados frente a la expresión del gen *ubiquitina* y calibrados frente a su control (sin tratamiento). Los asteriscos denotan diferencias significativas entre la cada valor y su control, determinadas por Test de T de dos colas no pareado. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Figura modificada de (Fuentes, 2011).

Además, la capacidad del promotor del gen *PSY2* de *D. carota* de responder a ABA y que los dos motivos ABRE cercanos entre sí constituirían un complejo de respuesta a ABA fue demostrado en plantas de tabaco transgénicas que expresan el gen reportero *GFP* bajo la dirección de la región promotora de *PSY2* con 3 motivos ABRE (dos de ellos separados por 37 pb), denominada como P2, en donde se observó

un aumento significativo en la expresión de *GFP* luego de la aplicación exógena de ABA (Figura 3B). Sin embargo, plantas de tabaco que expresan *GFP* bajo la dirección de una versión más corta del promotor de *PSY2*, la cual posee solo 2 motivos ABRE separados por 288 pb, denominado como P1, no responden al tratamiento con ABA (Figura 3A) (Fuentes, 2011). Estos resultados sugieren que los motivos ABRE identificados *in-silico* en el promotor de *PSY2* de *D. carota* son funcionales, y que probablemente los motivos ABRE próximos entre sí constituyen un módulo funcional de respuesta a ABA, necesario para producir la activación del gen en respuesta a ABA.

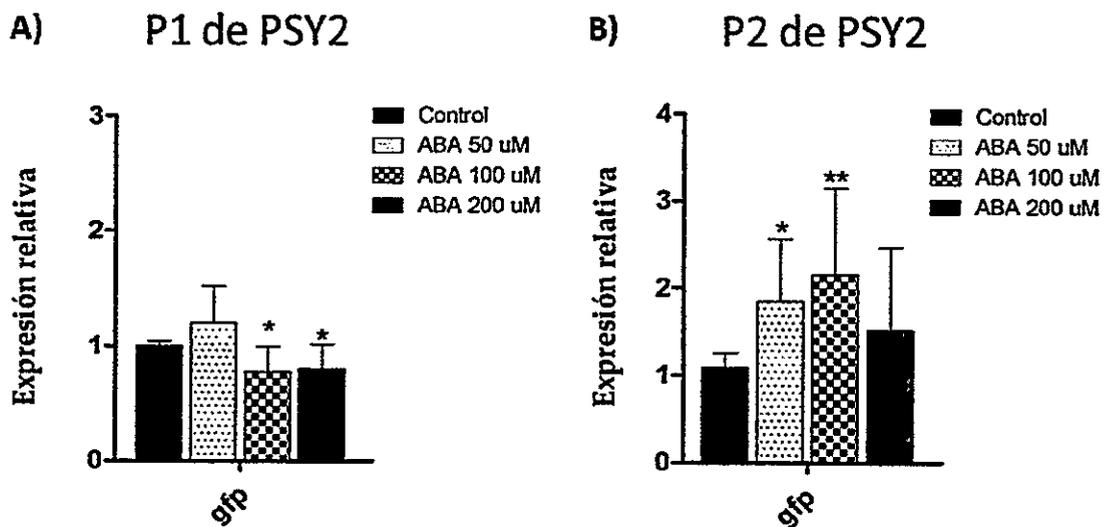


Figura 3. Niveles de transcrito de *GFP* en plantas de tabaco transgénicas con las construcciones del promotor de *PSY2* tratadas con ABA. A) Abundancia de transcrito de *GFP* en 3 líneas transgénicas que expresan P1:*GFP*, B) Abundancia de transcrito de *GFP* de 4 líneas transgénicas que expresan P2:*GFP*. 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 modificada de (Fuentes, 2011).

1.8 Factores de transcripción tipo Alfin

La familia de proteínas tipo Alfin es una importante familia de factores de transcripción encontrados solo en plantas y participan en procesos de desarrollo, incluyendo el crecimiento y desarrollo de raíces, elongación de pelos radiculares y desarrollo de meristemas (Winicov, 2000; Chandrika y col., 2013). Esta familia de factores de transcripción se caracterizan por poseer el dominio DUF3594 en el extremo N-terminal y homeodominio de planta de la familia de los dedos de zinc (PHD finger) en el extremo C-terminal, los cuales comprenden alrededor de 140 y 50 aminoácidos conservados, respectivamente (Kayum y col., 2015). El motivo PHD finger, el cual ha sido encontrado en animales y plantas, media la capacidad de unirse específicamente a otras proteínas nucleares, además de unirse de forma secuencia específica a elementos *cis* presentes en los promotores de sus genes blanco (Bastola y col., 1998; Bienz, 2006), y a pesar de que el dominio DUF3594 no se encuentra funcionalmente caracterizado, el alto grado de conservación de ambos dominios en diferentes especies indica que las proteínas tipo Alfin probablemente tengan un papel fundamental en funciones biológicas en plantas (Song y col., 2013).

El ADNc del primer factor de transcripción de tipo Alfin, *Alfin1*, fue aislado a partir de células de alfalfa (*Medicago sativa*) tolerantes a sal (Winicov, 1993), y se encontró predominantemente expresado en raíces. *Alfin1* es capaz de unirse al ADN de forma secuencia específica *in vitro*, y se determinó que el sitio de unión consenso a ADN para este factor de transcripción poseía la secuencia conservada GTG(G/N)NG (Bastola y col., 1998). También se determinó que *Alfin1* es capaz de unirse al promotor del gen predominantemente raíz específico e inducible por sal *MsPRP2* de forma secuencia específica. Subsecuentemente se demostró que la sobre-expresión de *Alfin1* en callos y plantas de alfalfa producía un incremento en los niveles del ARNm del gen

MsPRP2 endógeno, sugiriendo que *Alfin1* actúa como un regulador transcripcional en plantas y que es capaz de regular la expresión del gen *MsPRP2* en alfalfa (Winicov y Bastola, 1999). Además, tanto los callos como las plantas transgénicas de alfalfa sobre-expresoras de *Alfin1* fueron capaces de crecer en presencia de niveles elevados de sal, mientras que callos que expresan *Alfin1* en antisentido demostraron ser más sensibles a sal, indicando que en alfalfa *Alfin1* participa en la tolerancia a sal (Winicov y Bastola, 1999). Por otro lado, las líneas de alfalfa sobre-expresoras de *Alfin1* presentaban un aumento en el crecimiento de raíces bajo condiciones normales y de salinidad, mientras que plantas transgénicas portadoras de la construcción en antisentido crecían pobremente (Winicov, 2000)

A pesar de que genes que codifican para proteínas de tipo Alfin han sido encontrados en varias otras plantas, como *Arabidopsis*, arroz y *Glycine max*, la función de esos factores de transcripción en la mediación de procesos biológicos en plantas aún no es clara, a excepción de *Alfin1* de alfalfa (Song y col., 2013). Recientemente se identificaron 15 factores de transcripción de tipo Alfin en *Brassica rapa*, de los cuales 10 mostraron expresarse en respuesta a estrés biótico, mientras que todos respondieron bajo estrés por frío, sequía y sal (Kayum y col., 2015).

1.9 Estrategia a utilizar

Debido a la importancia que poseen los factores de transcripción bZIP del grupo A en la ruta de señalización de ABA, específicamente los pertenecientes a la sub-familia AREB/ABF, y al papel que cumplen los factores de transcripción Alfin en el desarrollo de la raíz y la respuesta a salinidad, en este trabajo se propone identificar secuencias con homología a factores de transcripción del tipo AREB/ABF y Alfin que sean capaces de unirse al promotor del gen *PSY2* de *D. carota* y de activar su expresión. Para ello, mediante análisis bioinformático se seleccionarán secuencias

presentes en el transcriptoma de *D. carota*, el cual se encuentra disponible a partir del 2011 (Iorizzo y col., 2011), que presenten alta homología a factores de transcripción de tipo AREB/ABF y Alfin. Estas secuencias serán aisladas a partir de ADNc de *D. carota* utilizando partidores diseñados en base a las secuencias encontradas en el transcriptoma y posteriormente serán clonadas en vectores de expresión. Mediante la utilización de técnicas como la transfección transitoria de protoplastos de *D. carota* y el ensayo de mono-híbrido en levadura se determinará la capacidad de las secuencias seleccionadas de unirse y activar al promotor de *PSY2*.

1.9.1 Transfección transitoria de protoplastos

La célula vegetal usualmente posee una pared celular rígida compuesta de celulosa que provee soporte estructural a la planta, y una matriz rica en pectina que permite la unión con células adyacentes. El citoplasma vivo de cada célula, delimitado por la membrana plasmática, constituye el protoplasto. En soluciones hipertónicas la membrana plasmática puede ser separada de la pared celular, y la posterior remoción de esta pared permite la liberación de protoplastos esféricos, en donde la membrana plasmática es la única barrera entre el citoplasma y el medio externo (Davey y col., 2005). La transfección transitoria de protoplastos ha sido utilizada comúnmente para el análisis de la expresión de genes en respuesta a hormonas y otros estímulos, para el estudio de elementos de promotores involucrados en la regulación de la expresión de genes, la determinación de la función de factores de transcripción o proteínas de transducción de señales en la regulación de genes y determinación de la localización sub-celular de proteínas (Tiwarí y col., 2006). Específicamente, mediante la transformación transitoria de protoplastos de *A. thaliana* se logró determinar que AREB1 y AREB2, proteínas de unión a motivos ABRE pertenecientes a la familia de factores de transcripción bZIP, son capaces de activar la transcripción del gen

reportero *GUS* al ser dirigido por el promotor del gen inducible por deshidratación *rd29B*, el cual contiene dos motivos ABRE (Uno y col., 2000). La expresión de las proteínas de la familia bZIP CAREB1 y CAREB2 en protoplastos de *D. carota* permitió determinar que ambas son capaces de activar la expresión del gen reportero *GUS* dirigido por un fragmento de 255 pb del promotor del gen *Dc3*, el cual contiene dentro de su secuencia motivos ABRE (Guan y col., 2009). La co-transfección de protoplastos de *D. carota* con una construcción reportera JAZ2::GUS, la cual posee el promotor del gen sensible a jasmonato *JAZ2* dirigiendo la expresión de GUS, y los factores de transcripción MYC2, MYC3 o MYC4, produjo un aumento en la actividad de GUS 3 a 4 veces mayor que la transfección con la construcción reportera sola, demostrando la habilidad que poseen esos factores de transcripción de activar al promotor de *JAZ2* (Niu y col., 2011).

1.9.2 Ensayo mono-híbrido en levadura

El ensayo de mono-híbrido en levadura es una poderosa herramienta utilizada para identificar rápidamente proteínas capaces de interactuar con una secuencia específica de ADN (Ouwkerk y Meijer, 2001). Este sistema se basa principalmente en dos componentes, por un lado una construcción reportera en donde una secuencia de ADN de interés es clonada río arriba de un gen reportero, y por el otro una construcción que permite generar la fusión (o híbrido) entre un factor de transcripción de interés y un dominio de activación de la transcripción de levadura (Reece-Hoyes y Marian Walhout, 2012). La secuencia de ADN cebo puede ser tanto un elemento bien definido que actúa en *cis*, como elementos de respuesta a estímulos, o una gran secuencia regulatoria, como un promotor completo (Ouwkerk y Meijer, 2001). Ambos componentes del sistema mono-híbrido son introducidos en una cepa de levadura

adecuada, y si el factor de transcripción es capaz de unirse a la secuencia de ADN, el dominio de activación inducirá la expresión del gen reportero.

Una de las ventajas de utilizar el ensayo de mono-híbrido en levadura comparado con otras técnicas bioquímicas utilizadas también para detectar interacciones ADN-proteína, como un ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) o un análisis de DNA footprint, es que este ensayo permite sortear las dificultades técnicas de la purificación de suficiente proteína de interés, además de no requerir de la optimización específica de las condiciones *in vitro*, ya que las levaduras son utilizadas como un “tubo de ensayo viviente” en donde ocurre la interacción, evitando así posibles dificultades como el incorrecto plegamiento de las proteínas o la carencia de modificaciones post-traduccionales (Ouwkerk y Meijer, 2001; Reece-Hoyes y Marian Walhout, 2012).

Por otro lado, mediante un ensayo de mono-híbrido en levadura también es posible detectar la capacidad de activar la transcripción de una proteína de interés. Esta aproximación se basa en los mismos dos componentes señalados anteriormente, es decir una secuencia de ADN río arriba de un gen reportero y un factor de transcripción híbrido. Sin embargo, esta vez la proteína híbrida se genera fusionando el factor de transcripción de interés a un dominio de unión a ADN conocido, mientras que la secuencia de ADN que dirige la expresión del gen reportero corresponde al sitio de unión de este dominio. Luego de la introducción de ambos componentes en una cepa de levadura adecuada, la proteína de interés siempre será capaz de unirse a la secuencia de ADN, sin embargo solo se activará la transcripción del gen reportero si la proteína de interés posee un dominio de activación de la transcripción.

1.10 Hipótesis

D. carota posee factores de transcripción pertenecientes a la familia de proteínas AREB/ABF y Alfin que son capaces de transactivar al promotor del gen *PSY2* de *D. carota*.

1.11 Objetivo general

Identificar en el transcriptoma de *D. carota* secuencias que codifiquen para factores de transcripción de tipo AREB/ABF y Alfin y determinar su capacidad de transactivar al promotor del gen *PSY2* de *D. carota*.

1.12 Objetivos específicos

- Identificar secuencias que codifiquen para factores de transcripción de tipo AREB/ABF y Alfin en *D. carota*.
- Determinar la localización subcelular de los factores de transcripción AREB/ABF y Alfin de *D. carota* seleccionados.
- Evaluar la unión de los factores de transcripción AREB/ABF y Alfin de *D. carota* a la región promotora del gen *PSY2* de *D. carota*.
- Evaluar la capacidad de transactivación de los factores de transcripción AREB/ABF y Alfin de *D. carota*.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cultivo de cepas bacterianas

Para la obtención de células de *Escherichia coli* y de *Agrobacterium tumefaciens* quimiocompetentes se utilizaron alícuotas que contenían células de *E. coli* DH5 α , de genotipo F- Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44* λ -*thi-1 gyrA96 relA1* y células de *A. tumefaciens* de genotipo GV3101: C58, plásmido Ti curado, Gen^R, Rif^R, respectivamente.

Los cultivos de *E. coli* en medio líquido se realizaron mediante la inoculación de células de *E. coli* de una alícuota stock en LB líquido (Tryptona 2% p/v, NaCl 0.8% p/v, Extracto de levadura 0.5% p/v) suplementado con el antibiótico de selección correspondiente, de acuerdo a la resistencia que portaban los vectores usados para transformar las células. El cultivo se mantuvo durante 16 horas a 37 °C en agitación. Los cultivos en medio sólido de *E. coli* se realizaron en placas Petri con medio LB sólido (medio LB líquido con Agar-agar 1,6%) suplementando con el antibiótico de selección adecuado, y las placas fueron incubadas durante 16 horas a 37 °C.

Los cultivos líquidos de *A. tumefaciens* se realizaron mediante la inoculación de células de *A. tumefaciens* provenientes de la alícuota stock en medio LB líquido suplementado con rifampicina 20 mg/L, gentamicina 50 mg/L y el antibiótico de selección correspondiente al plásmido de interés. El cultivo líquido se mantuvo a 28 °C por 16 horas en agitación. Del mismo modo, los cultivos en medio sólido de *A. tumefaciens* se realizaron en placas Petri con medio LB sólido suplementado con los antibióticos mencionados, y las placas fueron incubadas durante 48 horas a 28 °C.

Tanto para los cultivos de *E. coli* como para las de *A. tumefaciens*, el almacenamiento de alícuotas de célula a partir de los cultivos líquidos se realizó en una

mezcla de 500 μ L del cultivo con 300 μ L de glicerol 80% estéril, y las alícuotas fueron guardadas a -80 °C.

2.2 Preparación de células quimiocompetentes

2.2.1 Preparación de *E. coli* quimiocompetente

Para la obtención de células de *E. coli* quimiocompetentes se inocularon 200 μ L de una alícuota de *E. coli* DH5 α en 5 ml de LB líquido y se incubó en agitación a 37°C durante 16 horas. Posteriormente se inoculó 250 mL de LB líquido con 1 mL del cultivo anterior y se incubó en agitación a 37 °C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0.3. Se repartió en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugó a 3000 g por 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el precipitado de células de cada Falcon se resuspendió suavemente en 16 mL de Buffer CCMB80 (10 mM KOAc pH 7.0, 80 mM CaCl₂.2H₂O, 20 mM MnCl₂.4H₂O, 10 mM MgCl₂.6H₂O, 10% glicerol (100 ml/L)). El cultivo se incubó en hielo durante 20 minutos y se centrifugó a 3000 g por 8 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado de células de cada Falcon se resuspendió suavemente en 2 mL de Buffer CCMB80 frío. Se unieron todas las células en un solo Falcon y se midió la D.O.₆₀₀ de una mezcla de 200 μ L de estas células y 800 μ L de medio LB líquido, agregando Buffer CCMB80 hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de entre 1 a 1.5. Finalmente las células competentes se almacenaron en alícuotas de 100 μ L a -80 °C.

2.2.2 Preparación de *A. tumefaciens* quimiocompetente

Para la obtención de células de *A. tumefaciens* quimiocompetentes se inocularon 200 μ L de una alícuota de *A. tumefaciens* GV3101 en 5 mL de LB líquido suplementado con rifampicina 10 mg/L y gentamicina 50 mg/L, y se incubó a 28 °C en agitación durante 16 horas. Posteriormente, se inocularon 4 mL del cultivo anterior en 100 mL de LB líquido suplementado con la misma concentración de antibióticos y se

incubó a 28 °C en agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0.5. El cultivo se incubó 10 minutos en hielo, y se centrifugó a 4 °C durante 20 minutos a 3000 g. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado de células se resuspendió suavemente en 1 mL de una solución estéril y fría de CaCl₂ 20 mM. Las células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* fueron almacenadas en alícuotas de 100 uL a -80°C.

2.3 Transformación de células bacterianas quimiocompetentes

2.3.1 Transformación de *E. coli* quimiocompetentes

Para la transformación de células de *E. coli*, se descongeló en hielo una alícuota de células de *E. coli* quimiocompetente y se mezcló con 50-100 ng de ADN. Se incubó la alícuota en hielo durante 15 minutos, luego durante 45 segundos a 42 °C e inmediatamente se depositó en hielo. Luego de 2 minutos se mezcló la alícuota con 1 mL de medio LB líquido y se incubó a 37 °C durante 1 hora en agitación. Las células fueron posteriormente sembradas en placas Petri con LB sólido suplementado con el antibiótico de selección adecuado al vector incorporado, y las placas se incubaron 16 horas a 37°C.

2.3.2 Transformación de *A. tumefaciens* quimiocompetentes

Para la transformación de células de *A. tumefaciens*, se descongeló en hielo una alícuota de *A. tumefaciens* quimiocompetente y se mezcló con 250-500 ng del vector de interés. La alícuota fue sumergida en nitrógeno líquido durante 5 minutos y luego se descongeló a temperatura ambiente por 15 minutos. Se adicionó 1 mL de LB líquido y las células se incubaron a 28 °C por 16 horas. Las células fueron sembradas en placas Petri con medio LB sólido suplementado con rifampicina 10 mg/L, gentamicina 100 mg/L y el antibiótico de selección del vector incorporado y las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas.

2.4 Cultivo de cepas de levadura

Durante este trabajo se utilizaron dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, la cepa MaV203, de genotipo MAT α , *leu2-3,112*, *trp1-901*, *his3 Δ 200*, *ade2-101*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *SPAL10::URA3*, *GAL1::lacZ*, *HIS3_{UAS} GAL1::HIS3@LYS2*, *can1^R*, *cyh2^R* (Invitrogen) y la cepa Y1HGold, de genotipo MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3,112*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *met⁻*, *MEL1* (Clontech).

El cultivo en medio líquido de ambas cepas de levadura se realizó mediante la inoculación de una colonia en medio YPD líquido (Extracto de levadura 1% p/v, Peptona 2% p/v, Glucosa 2% p/v), el cual se mantuvo en agitación a 28 °C durante 24 horas. El cultivo en medio sólido se realizó en placas Petri con medio basal SD (YNB 0.67% p/v, Glucosa 2% p/v, Agar-Agar 1.5% p/v, Sulfato de Amonio 1% p/v) suplementado con los siguientes aminoácidos: Adenina hemisulfato 20 mg/L, arginina HCl 20 mg/L, histidina HCl monohidrato 20 mg/L, isoleucina 30 mg/L, lisina HCl 30 mg/L, metionina 20 mg/L, fenilalanina 50 mg/L, treonina 200 mg/L, tirosina 30 mg/L, uracilo 20 mg/L, valina 150 mg/L, triptófano 100 mg/L, leucina 20 mg/L. Las placas fueron incubadas durante 2-4 días a 28° C. Para la selección de levaduras transformadas con vectores que poseen marcadores de auxotrofia o para detectar la inducción de un promotor se utilizó medio SD carente de uno o más aminoácidos. Por ejemplo, la notación SD/-Leu-Ura indica un medio SD carente de leucina y uracilo.

2.5 Transformación de levaduras

Para la transformación de levaduras se inoculó una colonia de entre 2 a 3 mm de diámetro en 15 mL de YPD líquido y se incubó durante 24 horas a 28 °C en agitación. Se traspasaron 1.5 mL de cultivo a tubos Eppendorf independientes y se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 segundos. Se eliminó el sobrenadante y el

precipitado fue resuspendido en 1 mL de LiAc 100 mM e incubado a 30 °C durante 5 minutos. Se tomaron 500 µL de células en LiAc y se traspasaron a tubos nuevos, los cuales fueron centrifugados a 13000 rpm durante 30 segundos. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron los siguientes componentes en el orden indicado: 240 µL de PEG 50% p/v, 36 µL de LiAc 1 M, 5 µL de SS carrier DNA (10 mg/mL) previamente denaturado a 95 °C por 7 minutos, 500 ng de ADN plasmidial y 65 µL de H₂O destilada. Las células fueron resuspendidas mediante vortex y se incubaron durante 40 minutos a 42 °C. Posteriormente, las células fueron centrifugadas durante 30 segundos a 13000 rpm. Finalmente, se removió el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en H₂O destilada y sembradas en placas Petri con el medio sólido correspondiente.

2.6 Extracción de ADN plasmidial a partir de células de *E. coli*

Dependiendo de la cantidad necesaria, la extracción de ADN plasmidial a partir de células de *E. coli* se realizó utilizando el kit de miniprep plasmidial AxyPrep (Axygen) o el kit de midiprep plasmidial E.Z.N.A. (Omega bio-tek), siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.7 Extracción de ARN a partir de tejido vegetal

La extracción del ARN total a partir de tejido vegetal se llevó a cabo utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen). Se utilizaron aproximadamente 100 mg de hojas de zanahoria para cada extracción, los cuales fueron molidos en presencia de nitrógeno líquido en morteros previamente esterilizados y enfriados. Se adicionó 1 mL del reactivo TRIzol, se homogenizó con el tejido vegetal y se traspasó a un tubo Eppendorf. El homogenizado se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se agregó 200 µL de cloroformo (*), agitándose vigorosamente. La mezcla fue incubada durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g durante 15

minutos a 4 °C. Se rescataron aproximadamente 500 µL del sobrenadante y se trasladaron a un tubo limpio, en donde el ARN se precipitó con 500 µL de isopropanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C y el precipitado se lavó con 1 mL de etanol 75% (en agua libre de nucleasas). Se centrifugó nuevamente a 8000 g durante 5 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 20 µL de agua libre de nucleasas. Debido a que el ARN extraído de esta forma aún queda con impurezas, se realizó un proceso adicional de limpieza repitiendo el protocolo a partir del paso en donde se adicionan 200 µL de cloroformo indicado con (*). Finalmente, se determinó la integridad del ARN mediante una electroforesis en un gel de agarosa, y la concentración y las razones 260/280 y 260/230 en un espectrofotómetro NanoDrop.

2.8 Digestiones enzimáticas

Las digestiones enzimáticas se realizaron siguiendo las instrucciones de cada enzima de restricción utilizada, y todas las digestiones se llevaron a cabo en un baño termostático a la temperatura óptima para cada enzima.

2.9 Diseño de partidores

Todos los partidores utilizados en este trabajo fueron diseñados manualmente o utilizando el programa Vector NTI®. El análisis de los partidores diseñados se realizó mediante la herramienta bioinformática OligoAnalyzer 3.1, la cual permitió calcular la temperatura de disociación y descartar la presencia de homodímeros y heterodímeros. Los partidores fueron sintetizados por IDTDNA® y se detallan en la Tabla I.

Tabla I. Partidores utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia (5' - 3')	T _m (°C)
CAREB1 F	ATGGGGGCTGGGGAAGAG	59.8
CAREB1 R	ACTGTCACCTCCGTCATCGAAAGA	59.7
CAREB2 F	ATGAGGGAGAGAAAATCCACTCTC	55.9
CAREB2 R	GAAATGAGCTGAGCTTGTCTACG	56.0
Alfin1 F	ATGGAAATGGCTTCCATTTCTTCA	55.3
Alfin1 R	CTGCCTTCCACGCTTCATG	56.6
Alfin2 F	GTGGGGGTTTGTGAAAGAAGGC	58.9
Alfin2 R	TGGCCTAAGTTTCTTGCTACTGCT	58.5
Alfin3 F	ATGGACGCAAGGCAAACGG	59.0
Alfin3 R	CATATGGACTCTGGCCCTCTTTGA	58.4
ABRE1 F	GGGCTAGTAATAGTTTGGTGTGGT	56.6
ABRE1 R	AAAAGATGCTGAGCTGGTCCTGC	59.9
ABRE2 F	GCTTGCAGCAGCAGATATTGTG	57.0
ABRE2 R	CCAAGGTCCTGTCAGGGTC	57.5
ABRE3 F	GGCTTGTCTGGATCAGGATCAGC	59.7
ABRE3 R	CCAAGGTCCGGTCAGGGTCC	62.5
ABRE4 F	GGGTTCTGGGTTTGTGTGATAGG	57.7
ABRE4 R	GAAATCTGCTGAACTTGTCGGCG	60.5
ABRE5 F	CGGGTTTGGTTGGTTTTGAGGG	59.1
ABRE5 R	CCATGGGCCAGTCTGTGTCC	60.6
pDEST22 F	TATAACGCGTTTGAATCACT	52.1
pDEST32 F	AAACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTG	62.1
pDEST22/32 R	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC	59.4
P1PSY2 F SacI	GAGCTCGCGTTGGTTGTTTGGATTTT	60.9
P2PSY2 F SacI	GAGCTCCAGAAAAAACCCAAAAAGA	56.1
PPSY2 R Sall	GTCGACGCTGGAGTTAGTGCTACCC	62.6

2.10 Electroforesis en geles de agarosa

La visualización de la integridad del ADN o ARN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1-1.5% preparados en TAE 1x (tris-acetato 40

mM y EDTA 1 mM a pH 8). Las muestras se cargaron en los bolsillos de los geles en 1 μ L de Buffer de carga (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilen cyanol, 15% glicerol). La electroforesis se realizó a 90 volts durante 1 hora para el ADN y a 70 volts durante 45 minutos para el ARN. Para determinar el tamaño y semi-cuantificar el ADN cargado, junto a las muestras se cargaron 5 μ L (250 ng) de Ladder GeneRuler (Fermentas). Los geles fueron incubados durante 20 minutos en una solución de bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta en un transiluminador (SYNGENE).

2.11 Purificación de bandas desde geles de agarosa

La extracción y purificación de bandas de ADN a partir de geles de agarosa se realizó mediante el kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.12 Reacción en cadena de la polimerasa PCR

2.12.1 PCR convencional

Para amplificar los fragmentos de ADN a partir de diferentes muestras se utilizó la enzima *Taq* ADN polimerasa (New England BioLabs). Todas las reacciones de PCR convencional se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ L de reacción, el cual contenía 1 μ L de la muestra de ADN, 0.625 U de enzima *Taq* ADN polimerasa (0.125 μ L), 2.5 μ L de *Taq* Buffer 10x, 0.5 μ L de dNTPs 10 mM, 0.5 μ L de partidor directo 10 mM, 0.5 μ L de partidor reverso 10 mM y 19.875 μ L de agua libre de nucleasas. Para cada reacción de PCR se realizó una reacción de control negativo, a la cual no se le agregó ADN y cuando fue posible una reacción de control positivo, a la cual se le agregó 1 μ L de una muestra de ADN previamente verificada. El programa general de las reacciones de PCR convencional se detalla en el Anexo (Tabla A1). La temperatura de hibridación depende de cada par de partidores y generalmente se utilizó una

temperatura de hibridación igual a la temperatura de disociación más baja de los partidores menos cinco grados. El tiempo de extensión depende del tamaño del fragmento de ADN amplificado y de la procesividad de la enzima utilizada, es decir el número de nucleótidos que adiciona por unidad de tiempo, y que para la enzima *Taq* ADN polimerasa es de 1kb/min. Finalmente, los productos de las reacciones de PCR fueron verificados mediante electroforesis en geles de agarosa.

2.12.2 PCR convencional con enzima *Pfu* ADN polimerasa

La amplificación de secuencias que posteriormente fueran a ser clonadas en el vector de entrada pCR8 se realizó mediante un PCR convencional utilizando la enzima *Pfu* ADN polimerasa (Promega). Esta enzima posee una tasa de error muy baja (2.6×10^{-6} errores por nucleótido por ciclo) (Lundberg y col., 1991), lo que permite clonar fragmentos de ADN sin introducir mutaciones. Todas las reacciones de PCR llevadas a cabo utilizando la enzima *Pfu* ADN polimerasa se realizaron en un volumen de reacción total de 50 μ L, el cual contenía 1 μ L de la muestra de ADN, 1.25 U de enzima *Pfu* ADN polimerasa (1 μ L), 5 μ L de *Pfu* Buffer 10x con $MgSO_4$, 1 μ L de dNTPs 10 mM, 1 μ L de partidador directo 10 mM, 1 μ L de partidador reverso 10 mM y 40 μ L de agua libre de nucleasas. Además se realizó una reacción control negativo y una reacción control positivo, cuando fue posible. El programa de las reacciones de PCR con la enzima *Pfu* ADN polimerasa se detalla en el Anexo (Tabla A2), considerando que la posesividad de la enzima es 2kb/min. Finalmente, los productos del PCR se visualizaron en un gel de agarosa.

2.12.3 PCR de colonias

Para determinar de forma preliminar si colonias de *E. coli*, *A. tumefaciens* o *S. cerevisiae* transformadas portaban la secuencia de interés, se realizaron reacciones de

PCR directamente a colonias crecidas en placas de Petri. Para esto, se picaron colonias y se resuspendieron en un Eppendorf de 0.2 mL que contenía 25 μ L de la misma reacción utilizada para un PCR convencional. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa mediante electroforesis

2.12.4 RT-PCR

Para la síntesis de ADNc utilizando como molde el ARN extraído a partir de tejido vegetal, se realizó una reacción de transcripción reversa (RT) utilizando la enzima RT-ImPromII (Promega). Para esto, se eliminó todo el posible ADN genómico que pudiese haber sido extraído junto al ARN utilizando la enzima DNasa I. Se utilizaron 7 μ g de ARN de alta pureza (índices 260/280 y 260/230 muy cercanos a 2.0), los cuales se incubaron con 50 U (1 μ L) de DNasa I (Fermentas), 40 U (1 μ L) del inhibidor de RNasa Ribolock™ (Fermentas) y 2 μ L de Buffer de DNasa I 10x (Fermentas), y se completó la reacción con agua libre de nucleasas hasta un volumen de 20 μ L. La reacción se incubó durante 35 minutos a 37 °C en un baño termorregulado. La reacción se puso inmediatamente en hielo y se detuvo agregando 1 μ L de EDTA 50 mM e incubando a 65 °C durante 10 minutos.

Para la síntesis del ADNc se utilizaron 9.5 μ L de la reacción anterior y se incubaron con 3 μ L de oligo AP 10 mM a 70 °C durante 5 minutos en el termociclador (Tabla A3). Una vez transcurridos los 5 minutos, el programa fue pausado y a cada reacción se le agregaron 37.5 μ L de una mezcla que contenía 10 μ L de Buffer 5x ImProm-II™ (Promega), 3 μ L de la enzima Transcriptasa Reversa ImProm-II™ (Promega), 1 μ L del inhibidor de RNasa Ribolock (Fermentas), 10 μ L de MgCl₂ 25 mM, 2.5 μ L de dNTPs 10 mM y 11 μ L de agua libre de nucleasas. Finalmente, se continuó con el programa de RT-PCR para obtener 50 μ L de ADNc.

2.13 Generación de las construcciones pK7RWG2-FT, pDEST22-FT y pDEST32-FT

2.13.1 Obtención de las secuencias de interés

Para aislar las secuencias de interés predichas como posibles factores de transcripción, se diseñaron partidores en base a las secuencias encontradas en el transcriptoma de *D. carota* (Iorizzo y col., 2011). Los partidores fueron diseñados de tal forma que permitiesen amplificar toda la región codificante de las secuencias de interés pero sin incluir el codón de término. Sin embargo para aislar las secuencias que codifican para los factores de transcripción CAREB1 y CAREB2 se utilizaron los partidores diseñados por Guan y col. (Guan y col., 2009). En la Tabla I se encuentra el nombre y la secuencia de cada uno de los partidores utilizados.

Utilizando estos partidores, las secuencias de interés fueron aisladas a partir de ADNc sintetizado a partir de ARN extraído de hojas adultas de *D. carota*. Para esto, las secuencias fueron amplificadas mediante PCR convencional utilizando la enzima *Pfu* ADN polimerasa y los partidores señalados. Debido a que la enzima *Pfu* ADN polimerasa no deja adeninas libres en los extremos 3' de los fragmentos amplificados, fue necesario agregarlas utilizando la enzima *Taq* ADN polimerasa. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 50 μ L, el cual contenía 250-300 ng de ADN, 5 μ L PCR Buffer 10x, 1U de enzima *Taq* ADN polimerasa (0.2 μ L), 1 μ L de dATP, y se incubó a 70 °C durante 15 minutos.

2.13.2 Clonación de las secuencias de interés en el vector pCR8

Todas las secuencias de interés fueron clonadas en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO. Este vector cuenta con la enzima Topoisomerasa I covalentemente unida a su secuencia, lo que favorece la clonación de los productos de PCR que posean una adenina libre en cada extremo 3'. Además, este vector posee las regiones

attL1 y *attL2*, que flanquean la zona de clonación de los fragmentos de interés. Estas regiones permiten el traspaso de los fragmentos clonados entre esas secuencias a vectores de destinación mediante recombinación homóloga, tecnología conocida como Gateway. De esta forma, para clonar los fragmentos de interés en el vector de entrada pCR8, se utilizaron 2 μ L del producto de PCR al que se le agregó las adeninas y se mezclaron con 0.5 μ L del vector de entrada pCR8 y 0.5 μ L de solución salina (NaCl 1.2M, MgCl₂ 0.06M). La reacción de ligación se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se transformaron células de *E. coli* quimiocompetentes. De esta forma, en este trabajo se generaron las construcciones pCR8-FT, vectores de entrada que contenían las secuencias de interés predichas como factores de transcripción, y las construcciones pCR8-P1 y pCR8-P2, que contenían los promotores P1 y P2 de *D. carota*.

2.13.3 Recombinación mediante tecnología Gateway

La recombinación entre los sitios *attL1* y *attL2* presentes en el vector de entrada pCR8 y los sitios *attR1* y *attR2* presentes en los vectores de destinación permite reemplazar el gen letal de selección *ccdB* por los fragmentos previamente clonados en pCR8. Para cada construcción, la reacción de recombinación se realizó en un volumen final de 10 μ L, el cual contenía 100 ng de uno de los vectores de entrada, 250 ng del vector de destinación, 2 μ L de Buffer LR Clonasa 5x y 2 μ L del Mix de la enzima LR Clonasa (Invitrogen). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche y luego se detuvo agregando 1 μ L de Proteinasa K e incubando la reacción durante 10 minutos a 37°C. Finalmente se transformaron células de *E. coli* quimiocompetentes con estas construcciones. Mediante recombinación Gateway se obtuvieron los vectores pK7RWG2-FT al recombinar los vectores pCR8-FT con el vector pK7RWG2 (Figura 4). Estas construcciones contienen las secuencias de interés

predichas como factores de transcripción fusionadas a *RFP*. Además, la recombinación entre los vectores pCR8-FT con los vectores pDEST22 y pDEST32 (Figura 7) permitió generar los vectores pDEST22-FT y pDEST32-FT, en donde las secuencias de interés se encontraban fusionadas al dominio de activación de GAL4 y al dominio de unión a ADN de GAL4, respectivamente.

2.14 Análisis bioinformático

La predicción de sitios de unión de factores de transcripción al promotor de *PSY2* de *D. carota* se realizó mediante la herramienta bioinformática TOUCAN 3.1.1 (<http://homes.esat.kuleuven.be/~saerts/software/toucan.php>). Para esto se utilizó la herramienta MotifScanner, la cual permite identificar sitios de unión de factores de transcripción previamente descritos. Para la obtención de las matrices de los dominios conservados se utilizó la base de datos PWM (Position Weight Matrices) de PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), y como Background Model, es decir la matriz que permite calcular las frecuencias genómicas para diversas combinaciones de nucleótidos, se utilizó *A. thaliana*. Además, para fortalecer la búsqueda de sitios de unión al promotor de *PSY2* de factores de transcripción se utilizaron otras herramientas bioinformáticas, como PlantPAN (<http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/index.php>), AGRIS (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/>), PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html>) y PROMO (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3).

Para encontrar secuencias de *D. carota* con homología a factores de transcripción del tipo AREB/ABF y Alfin se utilizó la herramienta bioinformática Standalone BLAST, la cual permite ejecutar el programa BLAST en una computadora local utilizando una base de datos específica. En este trabajo se utilizó la base de datos de factores de transcripción de plantas PlantTFDB



(<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/index.php>) (Jin y col., 2014) y las secuencias presentes en el transcriptoma de *D. carota* (Iorizzo y col., 2011).

Para identificar posibles dominios conservados presentes en las secuencias predichas como factores de transcripción se utilizó la herramienta CD-Search de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>). Esta herramienta arroja como resultado los dominios conservados encontrados en la secuencia mediante alineamientos de secuencia múltiple de proteínas relacionadas que abarcan una variedad de organismos para revelar regiones de secuencias que contienen el mismo o similar patrón de aminoácidos alojados en la base de datos de dominios conservados (CDD) (Marchler-Bauer y col., 2014).

2.15 Cultivo *in vitro* de *Daucus carota*

Para el cultivo *in vitro* de zanahorias se utilizaron semillas comerciales de *Daucus carota* variedad Nantes, las cuales fueron esterilizadas superficialmente en una solución de etanol 95% durante 5 minutos y lavadas una vez con agua estéril por tres minutos. Luego, las semillas fueron incubadas en agitación en una solución de hipoclorito de sodio 2.5% por 45 minutos, lavadas tres veces con agua estéril y finalmente secadas en papel absorbente estéril. Las semillas fueron depositadas en frascos con medio MS sólido (medio MS con vitaminas 0,44% p/v, sacarosa 2% p/v, myo-inositol 0,01% p/v, Agar-agar 0,7% p/v, pH 5.8) y se incubaron a 22 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz durante 3 semanas.

2.16 Inducción de callos a partir de explantes de *Daucus carota*

Para la obtención de callos de *D. carota* se utilizaron explantes provenientes de plántulas de tres semanas de edad crecidas *in vitro*. Los explantes fueron transferidos a placas de Petri con medio MS sólido suplementado con 1 mg/L de ácido 2,4-

diclorofenoxiacético (2,4-D) e incubados a 22 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz hasta la aparición de callos (aproximadamente 4-5 semanas). Posteriormente los callos fueron transferidos a placas de Petri con medio MS sólido suplementado con 0.5 mg/L de 2,4-D, en donde se mantuvieron hasta su utilización, renovando el medio cada 4-5 semanas.

2.17 Obtención de cultivos de suspensiones celulares de *Daucus carota*

Para la obtención de suspensiones celulares de *D. carota* se utilizó un protocolo modificado de Roberto Moscatiello (Moscatiello y col., 2013). El cultivo se inició transfiriendo una porción de un callo de *D. carota* a un matraz Erlenmeyer de 50 mL estéril que contenía 10 mL de medio MS líquido (medio MS sólido sin Agar-agar) suplementado con 0.5 mg/L de 2,4-D y se disgregó suavemente. El matraz fue incubado en un agitador orbital a 120 rpm en una cámara de cultivo con fotoperiodo de 16 horas luz y a 22 °C durante aproximadamente una semana. Posteriormente, se tomaron 5 mL del cultivo anterior y se inocularon en un matraz Erlenmeyer de 100 mL estéril que contenía 15 mL de medio MS líquido suplementado con 0.5 mg/L de 2,4-D y se incubó en las mismas condiciones durante 1-2 semanas. Finalmente, se tomaron 10 mL de este cultivo y se inocularon en un matraz Erlenmeyer de 250 mL estéril que contenía 40 mL de medio MS líquido suplementado con 0.5 mg/L de 2,4-D y se incubó durante 1-2 semanas. Los cultivos fueron diluidos cada 1-2 semanas en medio fresco para mantener las células en fase exponencial de crecimiento.

2.18 Obtención de protoplastos de *Daucus carota* a partir de de suspensiones celulares

Para la obtención de protoplastos a partir de suspensiones celulares de *D. carota* se utilizó un protocolo modificado de Roberto Moscatiello (Moscatiello y col.,

2013). Se centrifugaron 50 mL de un cultivo de 4-5 días de suspensiones celulares de *D. carota* a 200 g durante 2 minutos. Se removió el sobrenadante y se agregaron 10 mL de solución enzimática (Celulasa Onozuka R-10 0.75% p/v, Macerozima R-10 0.25%, Manitol 400 mM, CaCl₂ 10 mM, MES 5 mM, pH 5.7). Las células fueron transferidas a una placa de Petri e incubadas en oscuridad en un agitador orbital (40-50 rpm) durante 4-6 horas, monitoreando la liberación de los protoplastos en el tiempo. La suspensión celular se filtró a través de una membrana de nylon de 40 µm para remover restos celulares, y los protoplastos se centrifugaron a 60 g durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó por aspiración y los protoplastos fueron lavados en 45 mL de solución W5 (NaCl 154 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 125 mM, Glucosa 5 mM, pH 5.7) dos veces e incubados en hielo durante 30 minutos en la solución W5. Los protoplastos se centrifugaron a 60 g durante 5 minutos y se resuspendieron en solución MC (MES 5 mM, CaCl₂ 20 mM, Manitol 0.5 mM, pH 5,7). Finalmente, los protoplastos se contaron bajo un microscopio óptico utilizando una cámara de Neubauer y se resuspendieron a una concentración de 2×10^6 protoplastos/mL.

2.19 Transfección de protoplastos de *D. carota*

La transfección de protoplastos de *D. carota* se realizó según el protocolo de Liu y col. (Liu y col., 1994). Se mezclaron 300 µL de protoplastos en solución MC (2×10^6 protoplastos/mL) con 10-20 µg de ADN plasmidial y se agregaron 300 µL de solución 40% PEG (Polietilenglicol 40% p/v, Ca(NO₃)₂ 100 mM, Manitol 400 mM, pH10). La solución se incubó durante 5 minutos y se agregó 4 mL de solución PSM (medio MS con vitaminas 0,44% p/v, sacarosa 2% p/v, pH 5.7). Finalmente, los protoplastos se incubaron durante 18-24 horas en oscuridad a temperatura ambiente antes de ser visualizados bajo el microscopio. Los vectores utilizados para la transformación de protoplastos de *D. carota* fueron los generados mediante la recombinación entre los

vectores pCR8-FT y el vector de destinación pK7RWG2 quedando cada gen de interés fusionada a *RFP* (Figura 4).

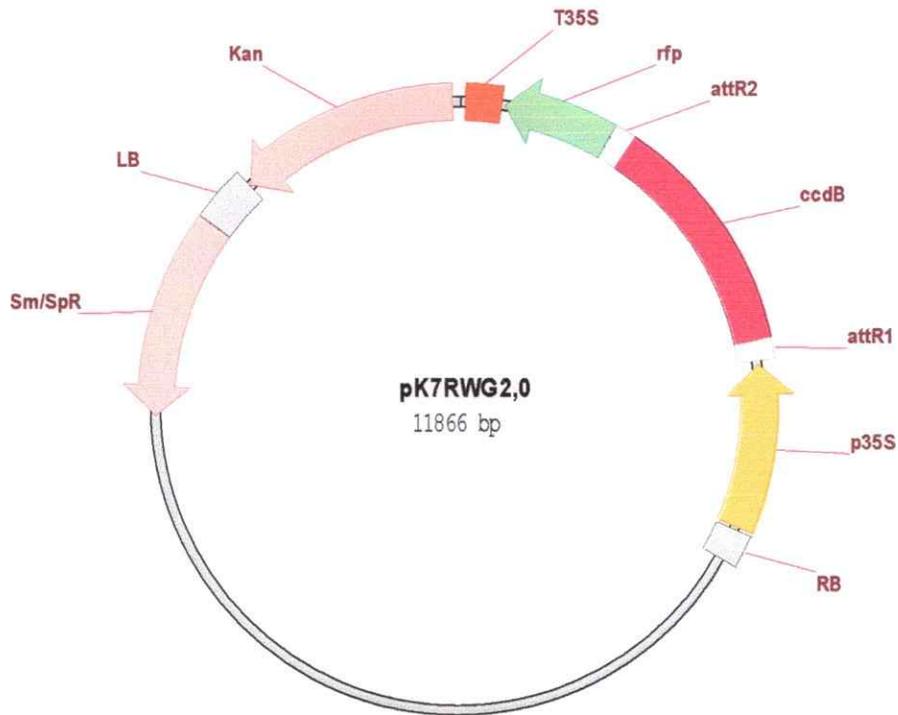


Figura 4. Vector de destinación pK7RWG2. Vector utilizado para generar proteínas de fusión entre las secuencias predichas como factores de transcripción y RFP.

2.20 Transformación transitoria de hojas de *Nicotiana tabacum*

Para determinar la localización sub-celular de las secuencias de interés se realizó la co-transformación transitoria de hojas de *Nicotiana tabacum* con las secuencias de interés fusionadas a *RFP* (vectores pK7RWG2-FT) y y el vector pCAMBIA1302, el cual posee el gen de la proteína fluorescente verde (*GFP*) río abajo del promotor constitutivo 35SCaMV. Para esto, se prepararon cultivos de células de *A. tumefaciens* transformadas con los vectores pK7RWG2-FT y pCAMBIA1302 en medio MS líquido suplementado con acetosiringona y con una D.O.₆₀₀ de 0.3. Posteriormente se

mezclaron 15 mL de los cultivos de *A. tumefaciens* transformados con las construcciones pK7RWG2-FT con 15 mL del cultivo transformado con el vector pCAMBIA1302 y se procedió a infiltrar hojas de *N. tabacum* con esta mezcla. La infiltración se realizó utilizando una jeringa de 5 mL sin aguja cargada la mezcla de cultivos de *A. tumefaciens* y presionándola suave pero firmemente contra la cara abaxial de las hojas hasta observar la infiltración de una amplia. Las plantas infiltradas de esta forma se mantuvieron 3 a 4 días a 22 °C en fotoperiodo de 16 horas luz hasta la recolección del tejido.

2.21 Microscopía

Para observar la fluorescencia de GFP y RFP se recolectó tejido a partir de hojas de tabaco transformadas transitoriamente y se les realizó el proceso de "peeling", removiendo solamente la epidermis de hojas infiltradas. Las muestras fueron montadas en un porta objetos y visualizadas en un microscopio de epifluorescencia invertido Olympus IX70 y utilizando los filtros de fluorescencia FITC para GFP, que excita en el azul (478-495 nm) y emite en el verde (510-555 nm) y Cy3 para RFP, que excita en verde (530-560 nm) y emite en rojo (573-648 nm).

2.22 Generación de las construcciones pP1-AbAi y pP2-AbAi

Para generar las construcciones en donde los promotores de *PSY2* de *D. carota* P1 y P2 dirigen la expresión de un gen reportero se utilizó el vector de levadura pAbAi (Figura 5), el cual puede ser utilizado en ensayos de mono-híbrido para identificar interacciones del tipo ADN-Proteína. Este vector fue donado por el Dr. Raúl Herrera de la Universidad de Talca. El vector pAbAi contiene un sitio de múltiple clonamiento río arriba del gen *AUR1-C*, gen de resistencia a antibiótico que confiere resistencia a Aureobasidin A (AbA), además del gen *URA3* para la selección de levaduras

transformadas con este vector en medio carente de uracilo. Un promotor (secuencia blanco o cebo) puede ser clonado en el sitio de múltiple clonamiento y utilizado como cebo para detectar proteínas que interactúen con la secuencia blanco. Las interacciones ADN-proteína permiten la expresión del gen *AUR1-C*, y como resultado las interacciones pueden ser detectadas seleccionando levaduras que sean resistentes a AbA. Por lo tanto, para clonar los promotores P1 y P2 en la región de múltiple clonamiento del vector pAbAi, primero se sintetizaron partidores que permitieron agregar a estos promotores los sitios de restricción *SacI* y *Sall*, presentes en el sitio de múltiple clonamiento de pAbAi. Los promotores se amplificaron a partir de los vectores pCR8/ppPSY2 y pCR8/pmPSY2 (Fuentes, 2011) utilizando estos partidores y con la enzima *Pfu* ADN polimerasa. Posteriormente, los promotores fueron clonados en el vector de entrada pCR8, para generar las construcciones pCR8-P1 y pCR8-P2. Estas construcciones fueron digeridas con las enzimas de restricción *SacI* y *Sall* para liberar los promotores P1 y P2 durante 3 horas a 37°C en una reacción que contenía 0.5-1 ug de ADN plasmidial, 4 µL de Buffer Tango 10x, 2 µL de enzima *SacI*, 1 µL y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 20 µL de reacción. En paralelo se linealizó el vector pAbAi con las mismas enzimas de restricción y utilizando el mismo protocolo descrito. Luego de la digestión, la totalidad de la reacción se cargó en geles de agarosa y se realizó una electroforesis en geles de agarosa, para posteriormente purificar las bandas de interés a partir de los geles, es decir las bandas que corresponden a promotores P1 y P2 que fueron liberadas de sus vectores, y al vector linealizado pAbAi. Una vez se purificaron las bandas de interés, se procedió a ligar los promotores P1 y P2 en el vector pAbAi linealizado en una reacción que contenía 2 µL de Buffer T4 ADN Ligasa (Fermentas) 10x, 1U T4 ADN Ligasa (1 µL), 100 ng del vector pAbAi linealizado, una relación molar inserto:vector (3:1) y agua libre de nucleasas hasta completar 20 µL de reacción, y la reacción se incubó a temperatura ambiente

durante 5 minutos. La relación molar inserto:vector se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{Xng\ Vector * kilobase\ Inserto}{kilobase\ Vector} * \frac{6}{1} = Xng\ Inserto$$

Posteriormente, se transformaron células de *E. coli* quimiocompetentes con el producto de la ligación, y las colonias obtenidas de esta forma fueron analizadas mediante PCR y digestiones enzimática.

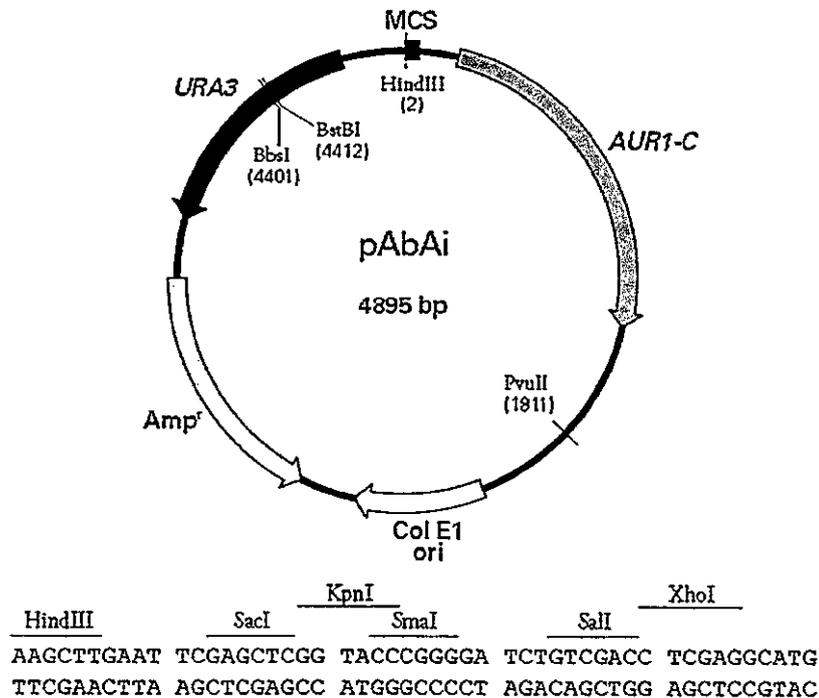


Figura 5. Vector pAbAi. Vector reportero de levadura utilizado para la realización de los ensayo de mono-híbrido.

2.23 Generación de la cepa de levadura reportera

La obtención de las cepas de levadura reporteras Y1HGold-pP1-AbAi y Y1HGold-pP2-AbAi, las cuales portan las construcciones pP1-AbAi y pP2-AbAi, respectivamente, y la determinación de la concentración inhibitoria mínima de AbA

para cada una de estas cepas se realizó de acuerdo a lo descrito en el protocolo de Matchmaker® Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System.

2.24 Ensayo mono-híbrido en levadura

Para determinar si los factores de transcripción seleccionados eran capaces de unirse y además activar a las regiones promotoras P1 y P2 del gen *PSY2* de *D. carota* se realizaron dos ensayos independientes de mono-híbrido en levadura. En la figura 6 se muestra una visión esquemática del concepto de este ensayo, la cual corresponde en este caso al kit comercial Matchmaker Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System (Clontech), que fue utilizado durante este trabajo. En esta imagen se puede apreciar que una proteína presa se encuentra fusionada a GAL4 AD, y que tras su unión a la secuencia cebo se produce la transcripción del gen reportero. Específicamente, para determinar la interacción ADN-proteína, este sistema utiliza como reportero el gen *AbA^r* (*AUR1-C*), el cual confiere resistencia a AbA, un antibiótico tóxico para levaduras. De esta forma, la unión de una proteína presa a la secuencia cebo se activa la transcripción del gen *AbA^r*, permitiendo el crecimiento de células en medio suplementado con AbA.

Las cepas utilizadas en este tipo de ensayo usualmente presentan mutaciones en múltiples genes auxotróficos, impidiendo que las células sean capaces de crecer en ausencia de varios componentes. Dentro de los genes auxotróficos más comúnmente utilizados de esta forma, y los compuestos asociados a ellos, se encuentran: *TRP1* (triptófano), *LEU2* (leucina), *HIS3* (histidina) y *URA3* (uracilo). Además, otro de los genes reporteros utilizado comúnmente es el gen de bacteria *LacZ*. El rescate de los fenotipos auxotróficos se utiliza para indicar la presencia de las construcciones, las cuales portan la forma silvestre de estos genes, y/o para indicar la interacción ADN-

proteína al utilizar la forma silvestre del gen como reportero del ensayo (Reece-Hoyes y Marian Walhout, 2012).

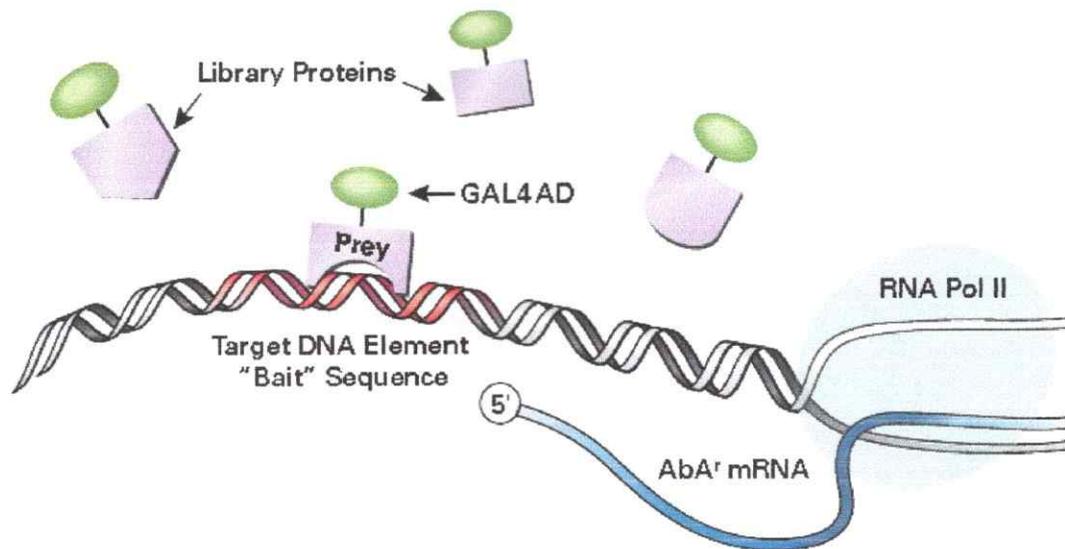


Figura 6. Ensayo para la detección de interacciones ADN-proteína utilizando el kit comercial Matchmaker Gold One-Hybrid System. La unión de un factor de transcripción fusionado a GAL4 AD (presa) a la secuencia de ADN de interés (cebo) permite la transcripción del gen de resistencia AbA^r por parte de GAL4 AD, permitiendo el crecimiento de la cepa de levadura transformada con este sistema en el antibiótico Aureobasidin A.

Por lo tanto, para detectar si los factores de transcripción de interés eran capaces de activar por si solas la transcripción se utilizó el vector de destinación Gateway pDEST32 (Figura 7) (Invitrogen). Este vector permite clonar las secuencias de interés en marco de lectura con el dominio de unión a ADN de GAL4 (GAL4 DBD) y bajo la dirección del promotor constitutivo del gen de levadura Alcohol deshidrogenasa (*ADH1*). Además posee el gen *LEU2* para la selección de levaduras transformadas con este vector en medio carente de leucina. De esta forma se realizó la recombinación entre los vectores de entrada pCR8-FT y el vector de destinación pDEST32 para generar los vectores pDEST32-FT. Estos vectores fueron utilizados para transformar la

cepa de levadura MaV203 (Vidal y col., 1996), las cuales fueron crecidas en medio SD/-Leu. La cepa de levadura MaV203 posee las mutaciones *his3* y *leu2*, y además posee 3 genes reporteros inducibles por GAL4 establemente integrados: *HIS3*, *URA3* y *lacZ*. De esta forma, si los factores de transcripción son capaces de activar la transcripción por si solas, podrán transcribir a los genes reporteros. La inducción de los genes reporteros *HIS3* y *URA3* permitirá a las células crecer en medio carente de histidina y uracilo, respectivamente. La inducción del gen *lacZ* resultará en un color azul de las colonias cuando son ensayadas con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido).

Por otro lado, para determinar si los factores de transcripción son capaces de unirse a los promotores P1 y P2 del gen *PSY2* de *D. carota*, se utilizó el vector de destinación Gateway pDEST22 (Figura 7) (Invitrogen). Este vector permite clonar las secuencias de interés en marco de lectura con el dominio de activación de GAL4 (GAL4 AD) y bajo la dirección del promotor constitutivo del gen de *ADH1*. Además posee el gen *TRP1* para la selección de levaduras transformadas con este vector en medio carente de triptófano. De esta forma se realizó la recombinación entre los vectores de entrada pCR8-FT y el vector de destinación pDEST22 para generar los vectores pDEST22-FT. Estos vectores fueron utilizados para transformar la cepa de levadura Y1HGold-pP1-AbAi y Y1HGold-pP2-AbAi, las cuales se crecieron en medio SD/-Trp-Ura. Si los factores de transcripción de interés son capaces de unirse a las secuencias blanco (P1 y P2) se activará la transcripción del gen reportero *AUR1-C* y las células serán capaces de crecer en el antibiótico AbA.

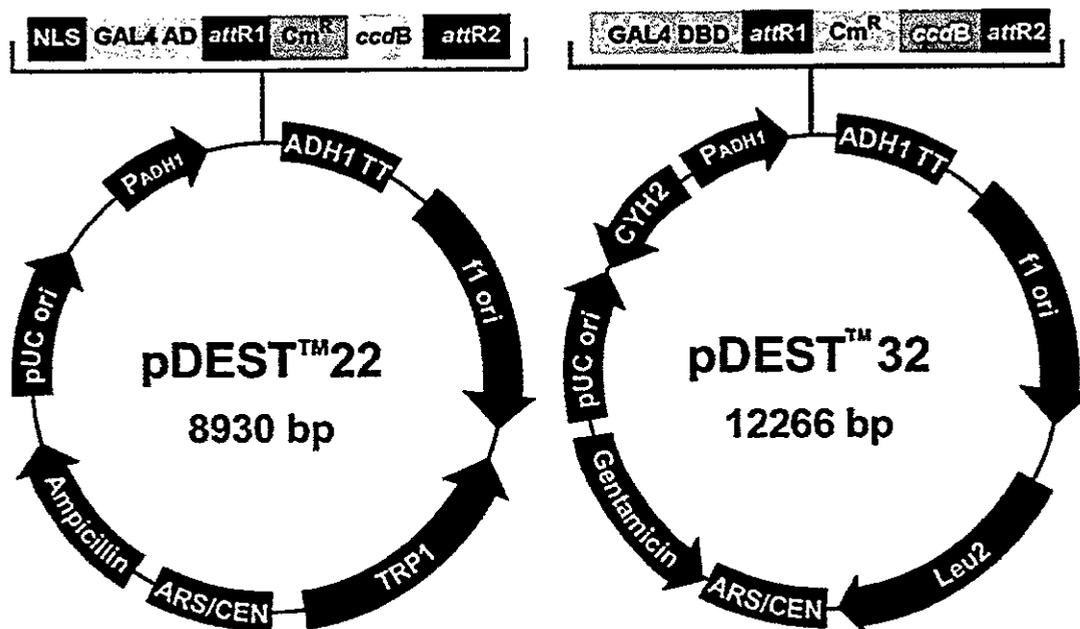


Figura 7. Vectores de destinación pDEST22 y pDEST32. Vectores utilizados para generar proteínas de fusión entre las secuencias predichas como factores de transcripción y GAL4 AD (pDEST22) y GAL4 DBD (pDEST32).

2.25 Caracterización de las transformantes MaV203

Para determinar si las células de levaduras MaV203 transformadas con las construcciones pDEST32-FT son capaces de activar la transcripción de cada uno de los genes reporteros, es decir *HIS3*, *URA3* y *lacZ*, se picaron 3 colonias por cada construcción, se resuspendieron en 20 μ L de H₂O destilada estéril y se depositaron 4 μ L en cada una de las placas que indica la Tabla II. Sin embargo, la cepa MaV203 es capaz de expresar niveles basales de *HIS3*, lo que podría hacer crecer a las células en medio SDI-Leu-His sin la necesidad de que las secuencias estén activando la transcripción de *HIS3*. Por lo tanto, primero fue necesario inhibir la expresión basal de *HIS3* en la cepa MaV203. *HIS3* codifica para una enzima involucrada en la biosíntesis de histidina, y esta enzima puede ser inhibida específicamente de forma dosis

dependiente por 3-Amino-1,2,4-Triazole (3AT). Por lo tanto, la determinación de la concentración de 3AT en la cual las células MaV203 no son capaces de crecer en medio carente de histidina permite que incluso leves cambios en la expresión del gen reportero *HIS3* puedan ser detectados, debido a que de los tres genes presentes en la cepa MaV203 *HIS3* es el más sensible. De esta forma, para determinar la concentración de 3AT que inhibe el crecimiento de células de MaV203, se picaron 3 colonias transformadas con la construcción pDEST32, se resuspendieron en 20 μ L de H₂O destilada estéril y se depositaron 4 μ L en placas Petri con en medio SD/-Leu-His sólido suplementado con 10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM de 3AT.

Tabla II. Placas utilizadas para la caracterización de las células de levadura transformadas con los vectores pDEST32-FT

Prueba	Ensayo	Placas usadas
Inducción de <i>HIS3</i>	Auxotrofia para His	SD/-Leu-His+3AT
Inducción de <i>URA3</i>	Auxotrofia para Ura	SD/-Leu-Ura
Inducción de <i>lacZ</i>	Ensayo de X-gal	SD/-Leu

RESULTADOS

3.1 Identificación de secuencias que codifiquen para factores de transcripción de tipo AREB/ABF y Alfin en *D. carota*.

3.1.1 Predicción de sitios de unión de factores de transcripción al promotor del gen *PSY2* de *D. carota*.

Para encontrar elementos de respuesta a ABA (ABRE) en el promotor de *PSY2* de *D. carota* se utilizó el programa TOUCAN 3.1.1 (sección 2.14). La figura 8 muestra la gráfica obtenida luego de ocupar la herramienta MotifScanner, en donde se observan en rojo los elementos de respuesta a ABA predichos por el programa. Además, debido a que al utilizar otras herramientas bioinformáticas de búsqueda de motivos de unión a ADN, como PlantPAN, PROMO y PLACE, se encontró en reiteradas ocasiones sitios de unión para factores de transcripción del tipo Alfin en el promotor de *PSY2*, y considerando que se ha descrito que los factores de transcripción Alfin están involucrados en los mecanismos de resistencia a salinidad (Bastola y col., 1998; Winicov y Bastola, 1999; Winicov, 2000), se decidió incluirlos en este estudio, y en la figura 8 se muestran en verde.

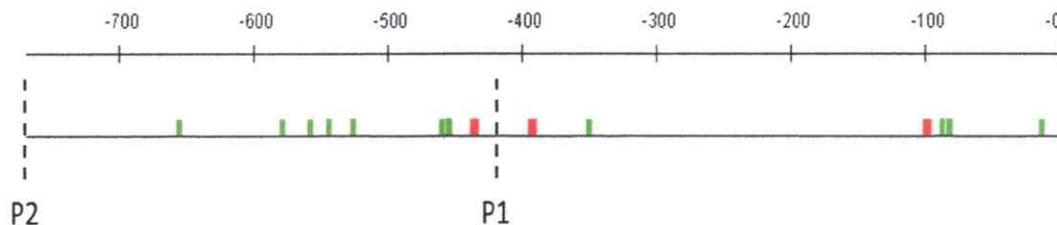


Figura 8. Distribución de los elementos de respuesta a ABA y sitios de unión para factores de transcripción de tipo Alfin en el promotor *PSY2* de *D. carota*. En rojo se muestran los elementos de respuesta a ABA y en verde los sitios de unión para factores de transcripción de tipo Alfin. Las líneas punteadas indica la posición de los promotores de *PSY2* P1 y P2 usados en este trabajo.

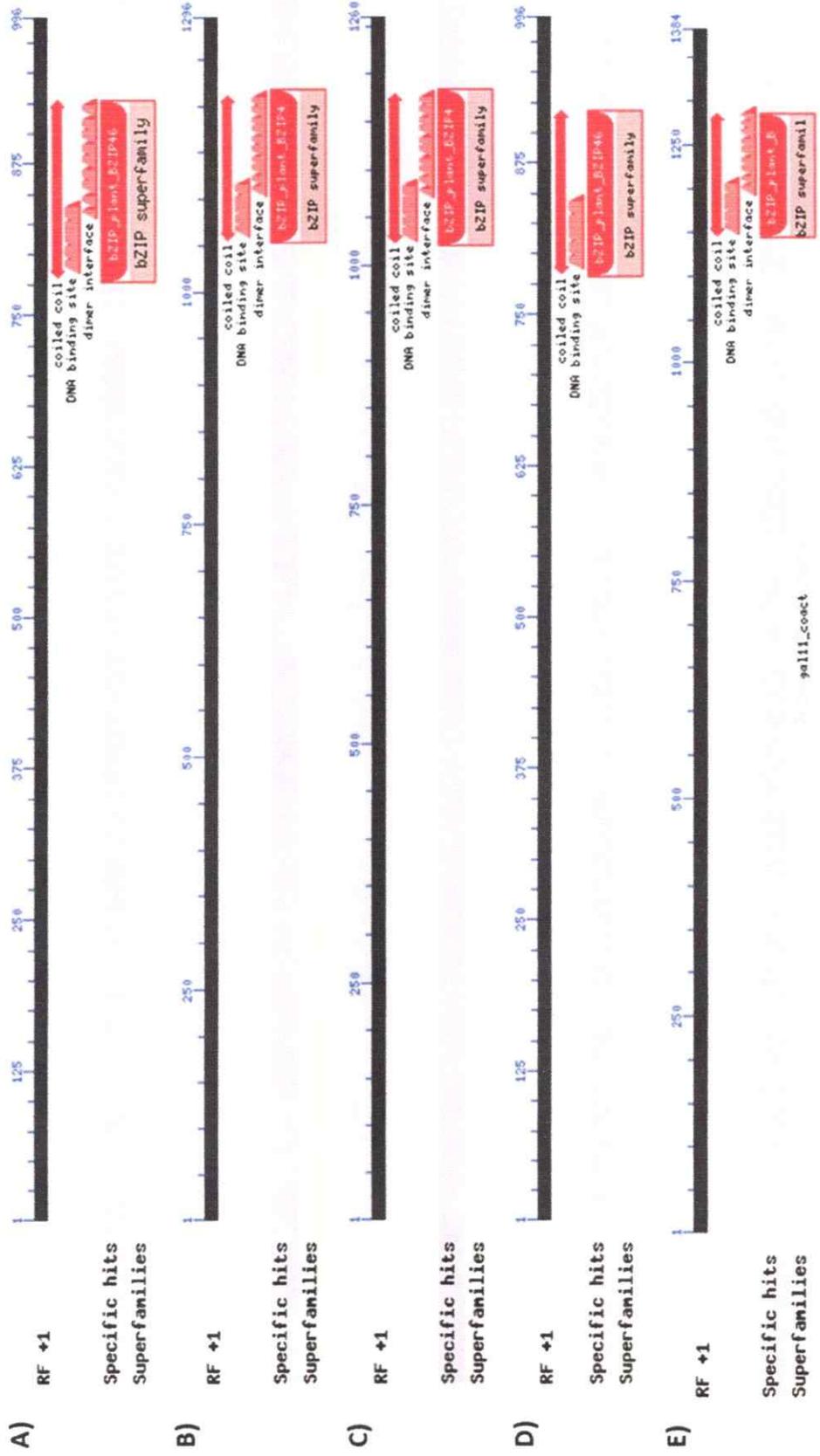
En la figura anterior se aprecian los 3 elementos de respuesta a ABA predichos por el programa TOUCAN 3.1.1, de los cuales 2 se encuentran dentro del promotor P1, mientras que el promotor P2 contiene a los 3 elementos. Por otro lado, se encontraron 11 sitios de unión para factores de transcripción del tipo Alfin, de los cuales 4 se encuentran en P1.

3.1.2 Predicción de secuencias con homología a factores de transcripción del tipo ABRE y Alfin

La búsqueda de secuencias de *D. carota* con homología a factores de transcripción capaces de unirse a motivos ABRE y a factores de transcripción Alfin se realizó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos (sección 2.14). Debido a la gran cantidad de secuencias que podrían estarse uniendo a los motivos ABRE presentes en el promotor de *PSY2*, en este trabajo nos centramos en la búsqueda de secuencias con homología a factores de transcripción bZIP del grupo A, específicamente a la sub-familia de factores de transcripción de *A. thaliana* denominada AREB/ABF, los cuales han mostrados unirse a motivos ABRE *in vitro* y activar la expresión de genes en respuesta a ABA (Fujita y col., 2005; Furihata y col., 2006; Kim, 2006). La base de datos de PlantTFDB contiene 129.288 factores de transcripción pertenecientes a 83 especies y clasificados en 58 familias, de los cuales 6258 pertenecen a la familia de factores de transcripción bZIP y 160 a la familia de factores de transcripción PHD. En este sentido, dentro del transcriptoma de *D. carota* se encontraron 24 secuencias con homología a factores de transcripción del tipo AREB/ABF presentes en la base de datos de PlantTFDB, de las cuales fueron seleccionadas las 5 con el mayor porcentaje de identidad a factores de transcripción AREB/ABF que han mostrado unirse a motivos ABRE y activar la transcripción en respuesta a ABA (Choi y col., 2000; Uno y col., 2000). Del mismo modo, se

encontraron 11 secuencias con homología a factores de transcripción del tipo Alfin, de las cuales fueron seleccionadas las 3 con el mayor porcentaje de identidad al factor de transcripción Alfin1 de *M. sativa*, el cual ha sido involucrado en el desarrollo de raíces, participar en la tolerancia a sal y unirse a secuencias específicas de ADN (Bastola y col., 1998; Winicov, 2000). De esta forma, las 5 secuencias con homología a factores de transcripción AREB/ABF analizadas en este trabajo fueron denominadas arbitrariamente como ABRE1 (A1), ABRE2 (A2), ABRE3 (A3), ABRE4 (A4) y ABRE5 (A5), mientras que las secuencias predichas como factores de transcripción del tipo Alfin fueron denominadas como Alfin1 (Al1), Alfin2 (Al2) y Alfin3 (Al3). Además, en este trabajo también se incluyeron las secuencias de *CAREB1* (C1) y *CAREB2* (C2), que codifican para factores de transcripción bZIP previamente descritos como proteínas capaces de unirse de forma secuencia-específica a un motivo ABRE presentes en el promotor de *Dc3*, además de participar en la señalización de ABA en *D. carota* (Guan y col., 2009).

Para comprobar que las secuencias seleccionadas poseían los dominios característicos de los factores de transcripción del tipo AREB/ABF y Alfin, se utilizó la herramienta CD-Search de acuerdo a lo señalado en materiales y métodos (sección 2.14). En la figura 9 se observan los dominios conservados encontrados para cada una de las secuencia utilizando esta herramienta. Todas las secuencias ABRE demostraron poseer el dominio perteneciente a la superfamilia de factores de transcripción bZIP, al igual que los factores de transcripción C1 y C2. Del mismo modo, las 3 secuencias predichas como factores de transcripción de tipo Alfin poseen los dominios característicos de esta familia de proteínas, es decir el dominio DUF3594 en el extremo N-terminal y el dominio PHD en el extremo C-terminal (Kayum y col., 2015).



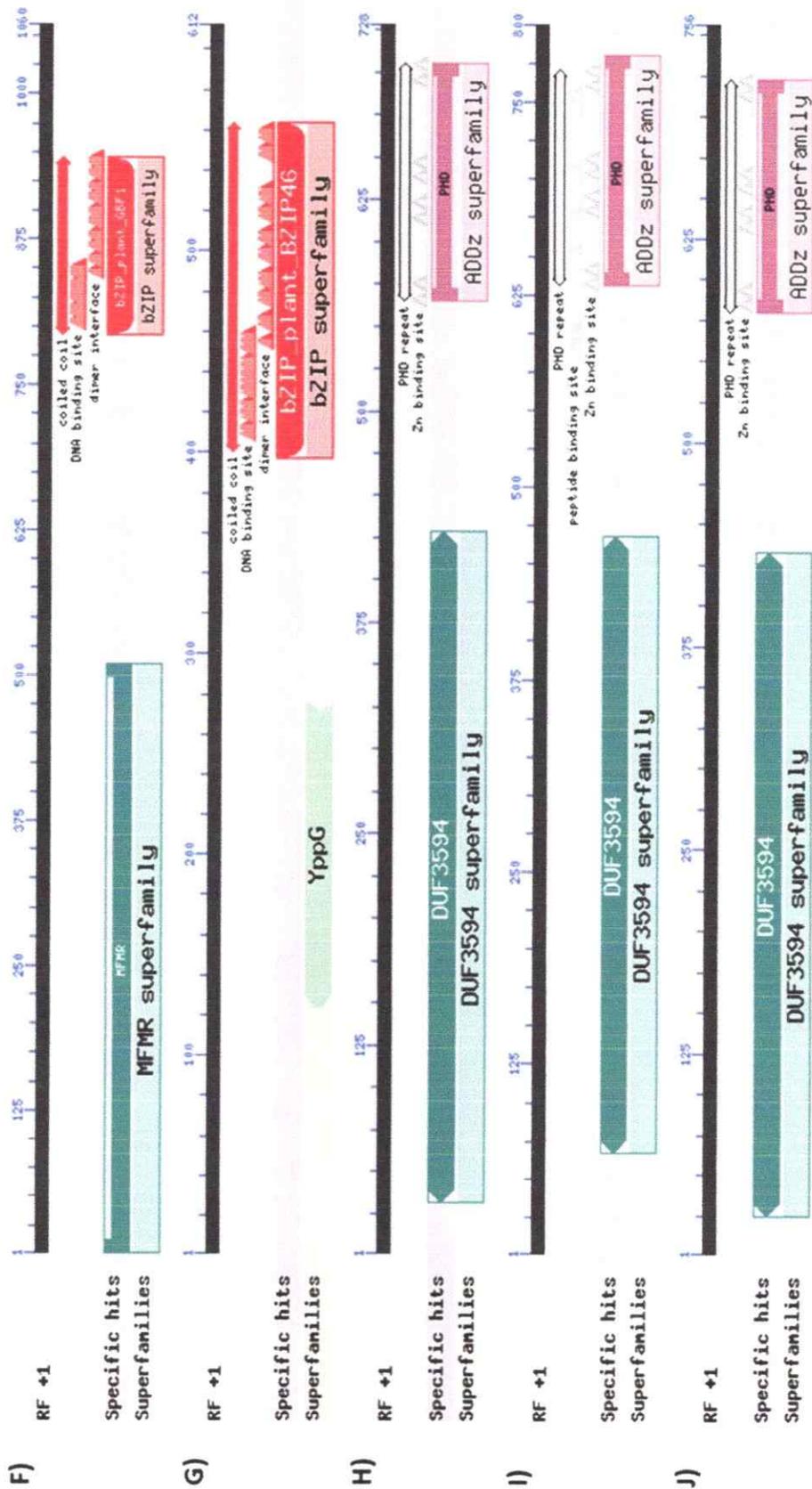


Figura 9. Identificación de dominios conservados en las secuencias de *D. carota*. Dominios conservados identificados en las secuencias predichas como factores de transcripción de *D. carota* utilizando la herramienta CD-Search. Cada dominio se muestra con un color y una forma distintiva, mientras que la superfamilia a la cual pertenece dicho dominio se muestra del mismo color, pero menos saturado. Las flechas con dos puntas indican la presencia de un motivo estructural, mientras que los triángulos indican la presencia de residuos que comprenden propiedades/sitios conservados. A) ABRE1, B) ABRE2, C) ABRE3, D) ABRE4, E) ABRE5, F) CAREB1, G) CAREB2, H) Alfin1, I) Alfin2, J) Alfin3.

Al analizar la homología que presentan las secuencias ABRE con los factores de transcripción bZIP de *A. thaliana* se determinó que A1 y A4 poseen una mayor identidad con el factor de transcripción AREB3 (AT3G56850.1), A2 con ABF3 (AT4G34000.2), A3 con ABF1 (AT1G49720.1) y A5 con AREB1/ABF2 (AT1G45249.1). Por otro lado, C2 presenta mayor similitud con el factor de transcripción AREB3 de *A. thaliana*, el cual pertenece a la familia de factores de transcripción del grupo A, mientras que C1 se encuentra más relacionado con factores de transcripción bZIP del grupo G, como lo es el factor de unión a G-box 1 (GBF1) (AT4G36730.1). Esta diferencia también se ve reflejada en la función que estarían cumpliendo estos factores de transcripción durante el desarrollo de la planta. Por un lado C1 estaría involucrado en la embriogénesis somática de *D. carota* al expresarse en etapas tardías del desarrollo de embriones somáticos, mientras que C2 estaría involucrado en la respuesta a estrés abiótico al expresarse en respuesta a sequía y ABA (Guan y col., 2009). Finalmente, se determinó que Al1, Al2 y Al3 poseen un porcentaje de identidad del 61, 69 y 73%, respectivamente, con Alfin1 de *Medicago sativa* (número de acceso L07291).

3.2 Determinación de la localización subcelular de los factores de transcripción seleccionados

3.2.1 Amplificación de las secuencias de interés

Las secuencias predichas como posibles factores de transcripción fueron amplificadas a partir de ADNc de *D. carota* de acuerdo a lo señalado en materiales y métodos (sección 2.13.1). De las 10 secuencias encontradas mediante el análisis bioinformático fue posible aislar 9 a partir de ADNc: A1 (1034 pb), A2 (1329 pb), A3 (1311 pb), A4 (1044 pb), A5 (1407 pb), C1 (1056 pb), C2 (609 pb), AI2 (789 pb) y AI3 (750 pb). En la figura 10 se muestra un PCR a partir de ADNc de *D. carota* en donde se aprecian las bandas correspondientes a las secuencias que fueron posibles de amplificar.

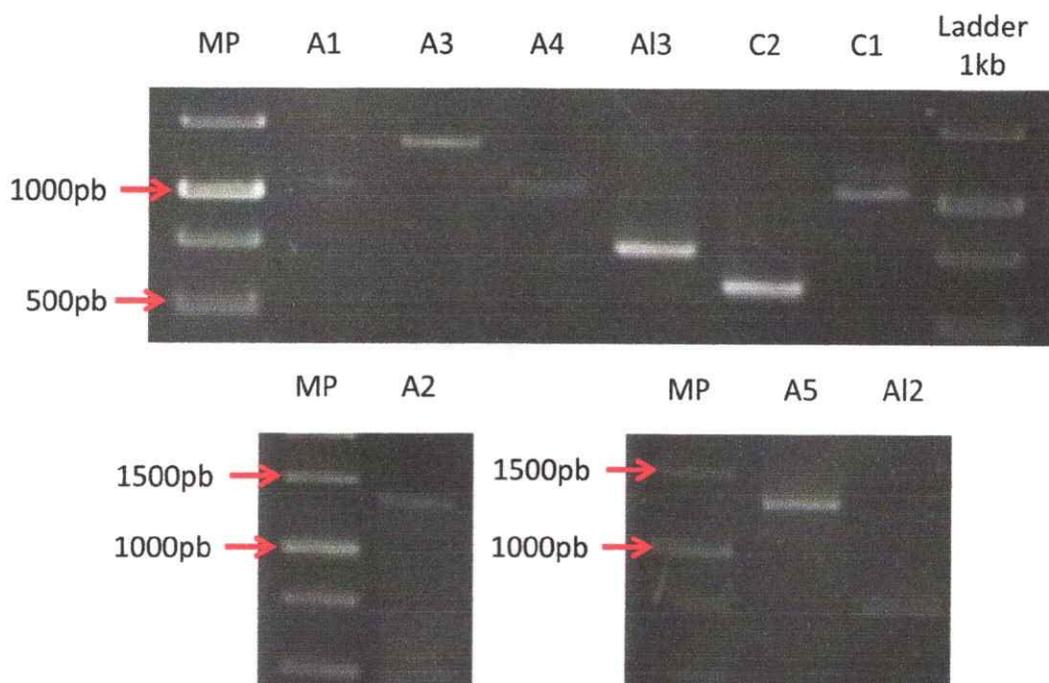


Figura 10. Amplificación de las secuencias de interés a partir de ADNc de *D. carota*. PCR realizado utilizando la enzima *Pfu* ADN polimerasa a partir de ADNc de *D. carota* y partidores específicos para amplificar las secuencias predichas como factores de transcripción. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb

3.2.2 Clonación de las secuencias de interés en el vector de entrada pCR8

Luego de su amplificación a partir de ADNc, se realizó la clonación de las secuencias que codifican factores de transcripción en el vector de entrada pCR8 (sección 2.13.2), para generar de esta forma los vectores pCR8-FT. Con el producto de ligación, se transformaron células de *E. coli* quimiocompetentes (sección 2.3.1), las cuales se sembraron en placas Petri suplementadas con espectinomicina 100 mg/L. Las colonias obtenidas fueron analizadas mediante PCR de colonias (sección 2.12.3) para encontrar clones que portasen los vectores pCR8-FT generados y a las colonias positivas se les realizó extracción de ADN plasmidial (sección 2.6). Se seleccionaron enzimas de restricción que permitieran determinar la orientación en la cual habían sido clonadas las secuencias de interés (Tabla III) y se realizaron las digestiones enzimáticas pertinentes. En la figura 11 se observa el patrón de bandas obtenido luego de las digestiones. De las 9 secuencias aisladas a partir de ADNc, 7 pudieron ser clonadas en sentido en el vector de entrada pCR8 (A1, A3, A4, AI2, AI3, C1 y C2). Para cada construcción, 2 clones fueron secuenciados (Macrogen Corp. USA), los cuales se indican con un asterisco en la figura 11. No fue posible obtener clones positivos para las construcciones pCR8-A2 y pCR8-A5.

Tabla III. Enzimas de restricción utilizadas para digerir los vectores pCR8-FT y definir la orientación de clonación.

Vectores	Enzimas	Bandas esperadas (pb)
pCR8-A1	<i>HpaI</i> + <i>NdeI</i>	2693, 799, 359
pCR8-A3	<i>HpaI</i> + <i>NcoI</i>	2686, 1442
pCR8-A4	<i>AvaI</i>	1300, 1179, 904, 478
pCR8-C1	<i>MseI</i>	880, 663, 516, 433, 329, 313, 275, 255
pCR8-C2	<i>AvaI</i>	1300, 1078, 904, 144
pCR8-AI2	<i>AvaI</i>	1300, 1033, 904, 375
pCR8-AI3	<i>HpaI</i> + <i>NcoI</i>	2732, 835

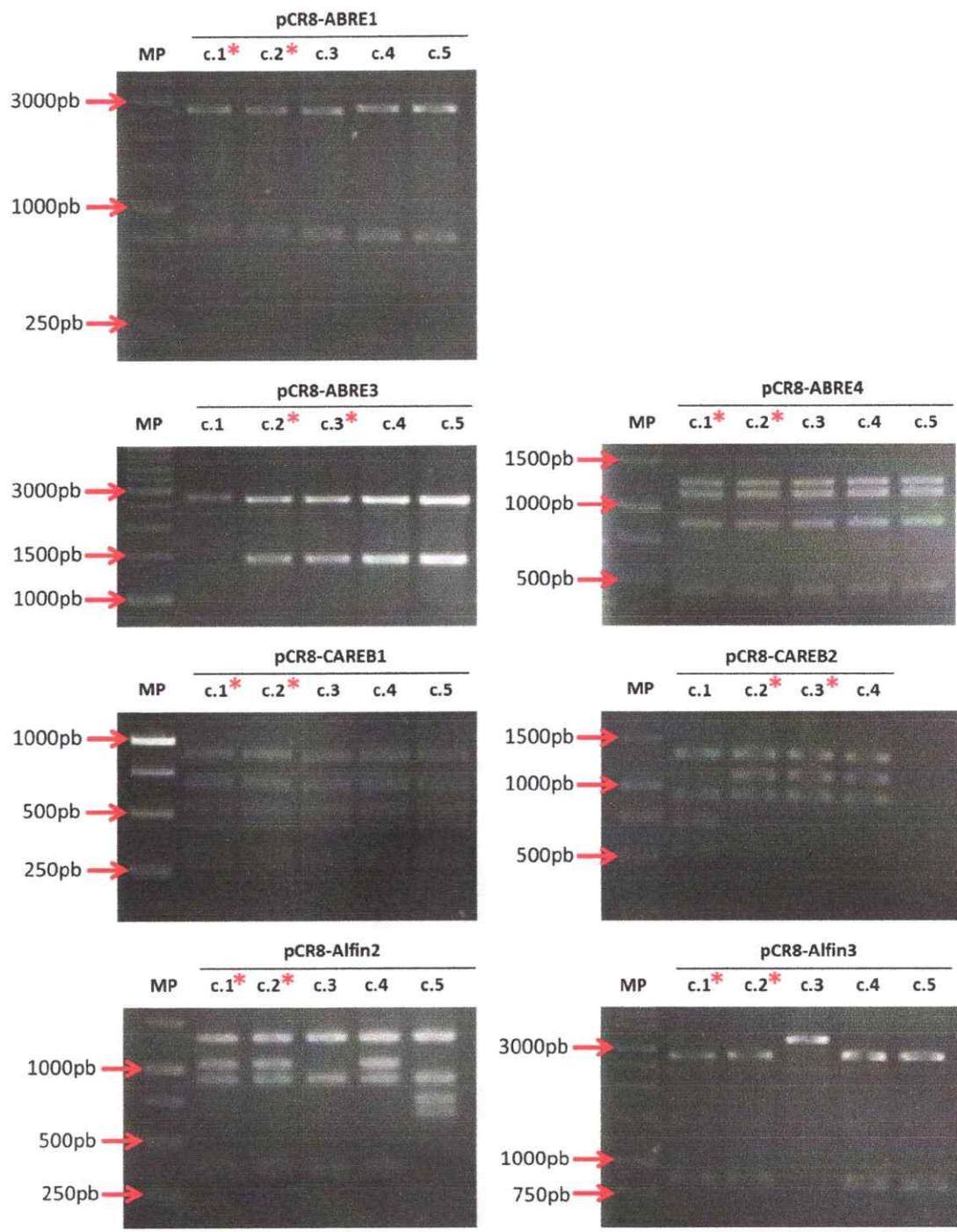


Figura 11. Digestión de los vectores pCR8-FT. Patrón de bandas obtenido luego de digerir los vectores pCR8-FT con las enzimas de restricción listadas en la Tabla III. c.1 a c.5 corresponden a 5 colonias independientes digeridas para cada construcción. Las colonias marcadas con asterisco indican colonias que presentaron el patrón de bandas esperado y que fueron enviadas a secuenciar. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb

3.2.3 Recombinación de los vectores pCR8-FT con el vector de destinación pK7RWG2

Una vez obtenidos los vectores de entrada pCR8-FT, se realizó la recombinación con el vector de destinación pK7RWG2 para generar los vectores pK7RWG2-FT, tal como se indica en materiales y métodos (sección 2.13.3). Con el producto de recombinación, se transformaron células de *E. coli* quimiocompetentes, las cuales se sembraron en placas Petri suplementadas con espectinomicina 100 mg/L. Se realizó un análisis preliminar para encontrar colonias que portasen los vectores generados mediante un PCR de colonia y se procedió a realizar la extracción de ADN plasmidial a las colonias positivas. Para digerir los vectores pK7RWG2-FT se utilizó la enzima *Ava*I ya que esta enzima posee sitios de restricción en todas las secuencias de interés y además en el vector de destinación pK7RWG2, permitiendo así determinar la orientación en la cual se encontraban clonadas las secuencias de interés. En la Tabla IV se muestra el tamaño de las bandas obtenidas luego de digerir cada vector con la enzima de restricción *Ava*I, y en la figura 12 es posible observar que para todas las construcciones se logró obtener clones con el patrón de bandas esperado.

Tabla IV. Tamaño de bandas esperado al digerir los vectores pK7RWG2-FT con la enzima de restricción *Ava*I.

Vectores	Bandas en esperadas
pK7RWG2-A1	3744, 1933, 1238, 1131, 986, 630, 515, 480, 423, 192
pK7RWG2-A3	3744, 2500, 1933, 1131, 630, 515, 480, 423, 192
pK7RWG2-A4	3744, 1933, 1239, 1131, 995, 630, 515, 480, 423, 192
pK7RWG2-C1	3744, 2246, 1933, 1131, 630, 515, 480, 423, 192
pK7RWG2-C2	3744, 1933, 1131, 905, 894, 630, 515, 480, 423, 192
pK7RWG2-AI2	3744, 1933, 1136, 1131, 849, 630, 515, 480, 423, 192
pK7RWG2-AI3	3744, 1933, 1131, 1007, 846, 630, 515, 480, 423, 192, 87
pK7RWG2	3744, 2160, 1933, 1131, 658, 630, 515, 480, 423, 192

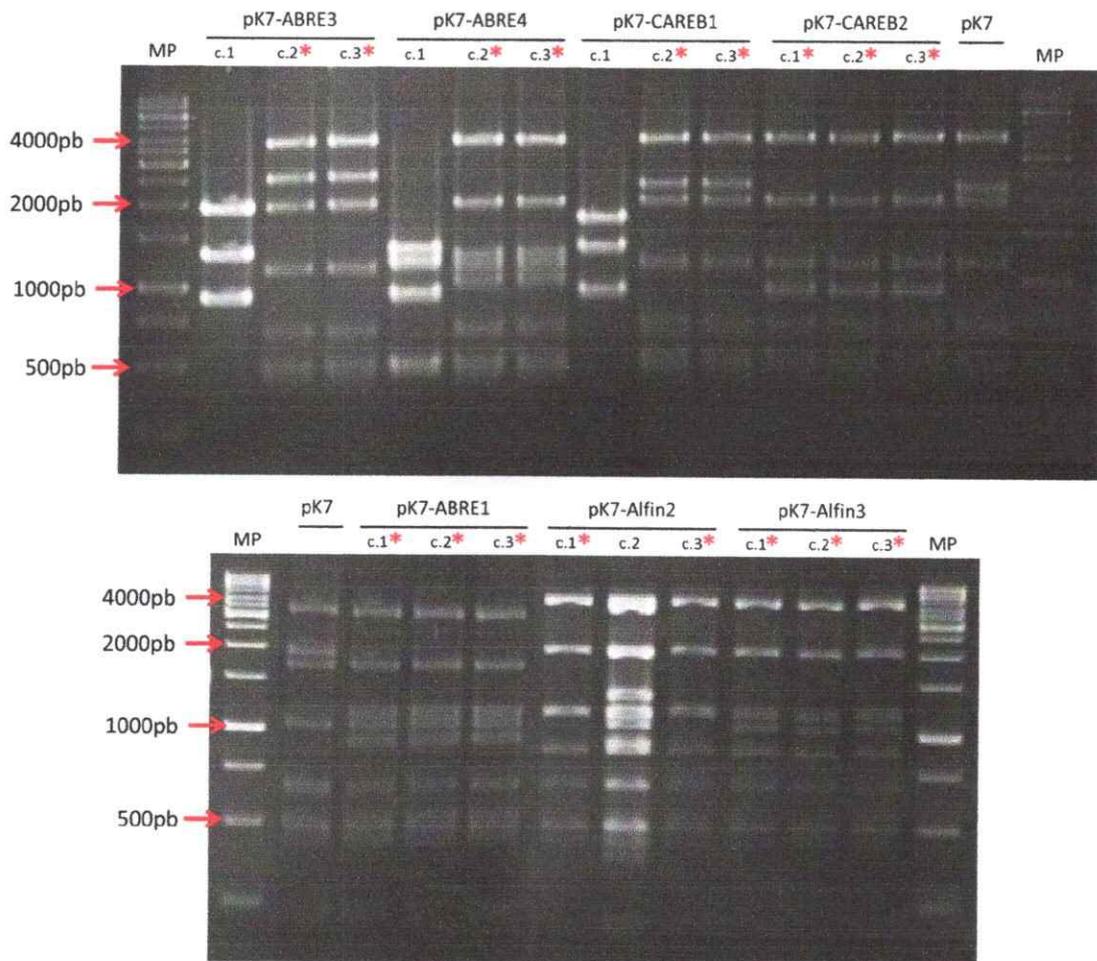


Figura 12. Digestión de los vectores pK7RWG2-FT. Patrón de bandas obtenido luego de digerir los vectores pK7RWG2-FT con la enzima de restricción *Ava*I. c.1 a c.3 corresponde a tres clones independientes digeridos para cada construcción. Con asterisco se indican aquellas colonias que presentaron el patrón de bandas esperado. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb

Finalmente, se transformaron células de *A. tumefaciens* (sección 2.3.2) con las construcciones pK7RWG2-FT y se realizó la transformación transitoria de tabaco.

3.2.4 Transformación transitoria de *N. tabacum*.

Para determinar la localización sub-celular de los factores de transcripción, se realizó la transformación transitoria doble de hojas de *N. tabacum* (sección 2.20) con las construcciones pK7RWG2-FT, las cuales contienen las secuencias predichas como

factores de transcripción fusionadas a *RFP*, y el vector pCAMBIA1302, el cual posee el gen de *GFP* dirigido por el promotor constitutivo 35SCaMV, y las muestras recolectadas fueron observadas bajo el microscopio de epifluorescencia (sección 2.21). En la Figura 13 se aprecian imágenes tomadas a partir de las hojas infiltradas. En las imágenes tomadas bajo el filtro Cy3 (canal rojo) se aprecia una fuerte señal circular de color rojo en todas las hojas infiltradas excepto en aquellas transformadas con el vector vacío pK7RWG2 (13A). Sin embargo, en las hojas infiltradas con la construcción pF7RWG2-AI2 (13G), además es posible observar fluorescencia roja en el contorno de las células de tabaco. Al observar las imágenes tomadas bajo el filtro FITC (canal verde) se observa una fuerte señal circular de color verde en el centro y además fluorescencia en el contorno de las células. Debido a que se sabe que la proteína GFP se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma, la fuerte señal circular corresponde a la fluorescencia emitida por GFP localizada en el núcleo y la señal observada en el borde de las células corresponde a la fluorescencia emitida por GFP en el citoplasma. De esta forma, al realizar la sobreposición de las imágenes observadas en el canal rojo con las imágenes observadas en el canal verde se aprecia que las señales circulares se sobreponen, observándose de color amarillo, a excepción de las hojas infiltradas con el vector vacío, en donde solo se observa la señal de color verde en núcleo y citoplasma. En conjunto, estos resultados indican que: 1) las secuencias de interés se están expresando, 2) que todas las secuencias se encuentran en marco de lectura con *RFP* y 3) que A1, A3, A4, C1, C2 y AI3 están localizadas el núcleo, mientras que AI2 se encontraría localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma. La localización encontrada para C1 y C2 se corresponde con la literatura (Guan y col., 2009).

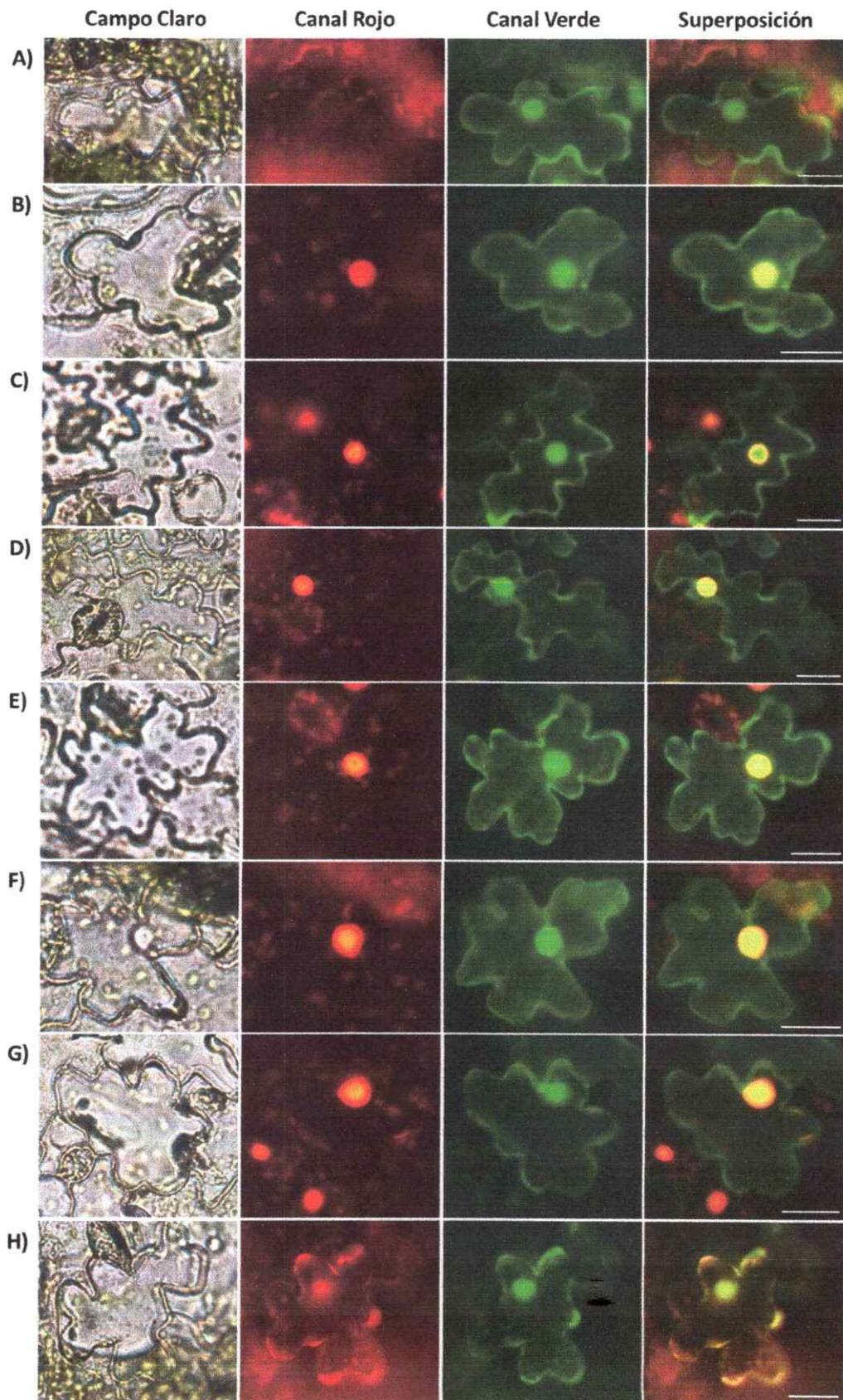


Figura 13. Transformación transitoria doble de hojas de *N. tabacum* con las construcciones pK7RWG2-FT y el vector pCAMBIA1302. Transformación doble de hojas de tabaco con los vectores que portan las secuencias de interés fusionadas a *RFP* y el vector que porta el gen reportero *GFP* bajo la dirección del promotor CaMV 35S. Se observan imágenes tomadas luego de 4 días de la infiltración de las hojas. Canal rojo: imágenes tomadas bajo el filtro Cy3 para observar la fluorescencia de *RFP*. Canal Verde: imágenes tomadas bajo el filtro FITC para observar la fluorescencia de *GFP* A) Vector vacío sin inserto, B) ABRE1, C) ABRE3, D) ABRE4, E) CAREB1, F) CAREB2, G) Alfin3, H) Alfin2. Canal rojo: Imágenes tomadas bajo el filtro Cy3. Canal verde: Imágenes tomadas bajo el filtro FITC. Barra: 25 μ M

3.3 Transfección de protoplastos de *D. carota*

3.3.1 Obtención de protoplastos a partir de cultivos celulares de *D. carota*

La obtención de cultivos de suspensiones celulares a partir de callos de *D. carota* se realizó de acuerdo a lo señalado en materiales y métodos (sección 2.17). Luego de obtener cultivos de suspensiones celulares creciendo en fase exponencial se realizó la obtención de protoplastos a partir de ellos (sección 2.18). La digestión de la pared de las células presentes en los cultivos celulares de *D. carota* produce la liberación de células redondas delimitadas solo por la membrana celular, denominadas protoplastos. En la figura 14 se observa la obtención de los protoplastos a partir de los cultivos de suspensiones celulares en el tiempo. Mediante este ensayo se determinó que a las 6 horas de incubación con la solución enzimática la totalidad de los protoplastos habían sido liberados (Figura 14D), por lo que a las 6 horas se detuvo la reacción y se procedió a realizar la transfección de los protoplastos.



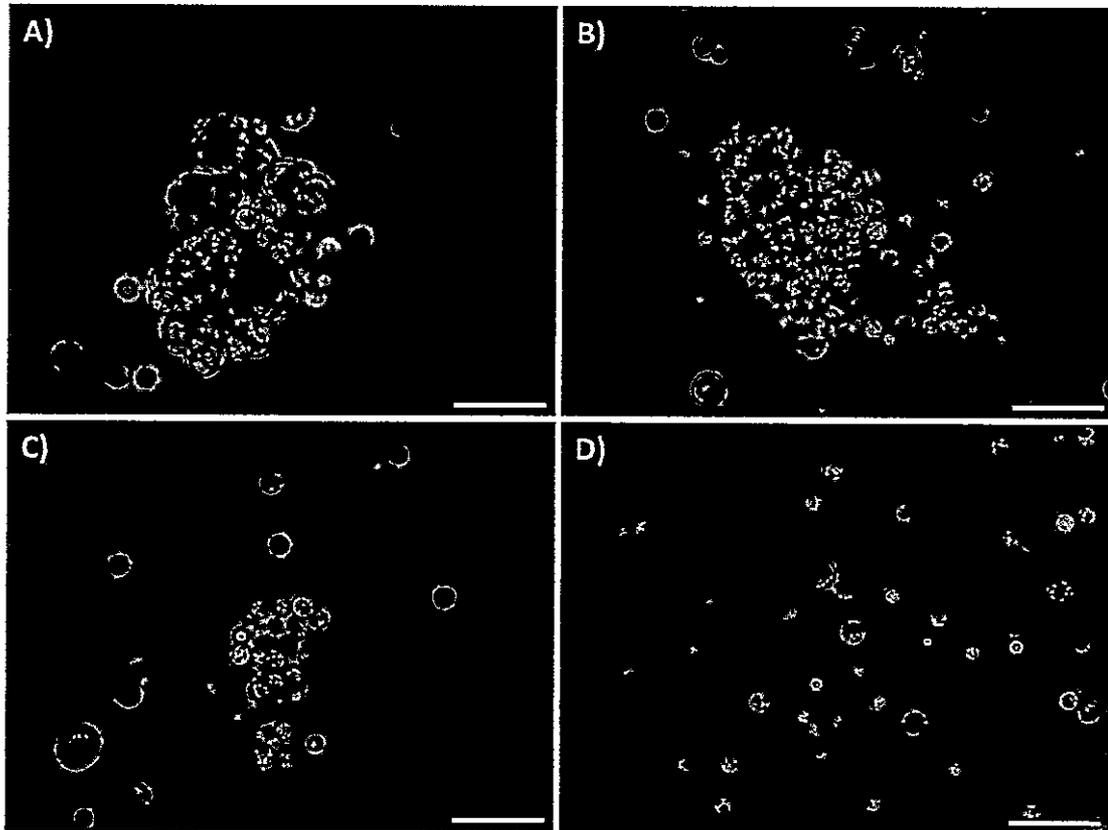


Figura 14. Transcurso temporal de la obtención de protoplastos. Incubación de cultivos de suspensiones celulares de *D. carota* con celulasa y macerozima para permitir la digestión de la pared celular y la obtención de protoplastos. Imágenes tomadas luego de A) 1 hora, B) 2 horas, C) 4 horas y D) 6 horas de incubación con la solución enzimática. Barra: 50 μ M

3.3.2 Transfección de protoplastos de *D. carota* con las construcciones pK7RWG2-FT

Para determinar si los factores de transcripción eran capaces de unirse al promotor de *PSY2* de *D. carota*, se realizó la transfección de protoplastos con las construcciones pK7RWG2-FT. Para esto, la obtención de protoplastos se realizó a partir de cultivos de suspensiones celulares provenientes de zanahorias transgénicas, las cuales portaban en su genoma el gen *GFP* dirigido por el promotor de *PSY2* de *D. carota* (Fuentes, 2011). De esta forma, si los factores de transcripción son capaces de

unirse al promotor de *PSY2* y activarlo, se producirá la transcripción de *GFP*, aumentará la fluorescencia de los protoplastos y ésta será cuantificada. La transfección de protoplastos con los vectores pK7RWG2-FT se realizó de acuerdo a lo señalado en materiales y métodos (sección 2.19). En la figura 15 se aprecian protoplastos transfectados con estas construcciones. Nuevamente, en las fotografías tomadas bajo el filtro Cy3 (canal rojo) se observa una fuerte señal puntual en el centro de la célula en todos los protoplastos transfectados con las construcciones pK7RWG2-FT, a excepción de los transfectados con el vector vacío pK7RWG2 (15A), en donde no se observa señal, y los transfectados con la construcción pK7RWG2-AI2, en donde además se observa fluorescencia en el borde de la célula (15G).

Si bien se logró la transfección de protoplastos con las construcciones pK7RWG2-FT, no fue posible obtener un alto porcentaje de transfección a pesar de numerosos intentos y luego de realizar varias modificaciones a los protocolos de obtención y transfección de protoplastos. Además, como se observa en la figura 16C, existe una alta fluorescencia basal de los protoplastos, que sumado a la gran variabilidad de esta fluorescencia hicieron muy difícil la cuantificación de la fluorescencia de *GFP*. Por lo tanto, se decidió cambiar de modelo y comenzar a trabajar con levaduras para realizar un ensayo de mono-híbrido.

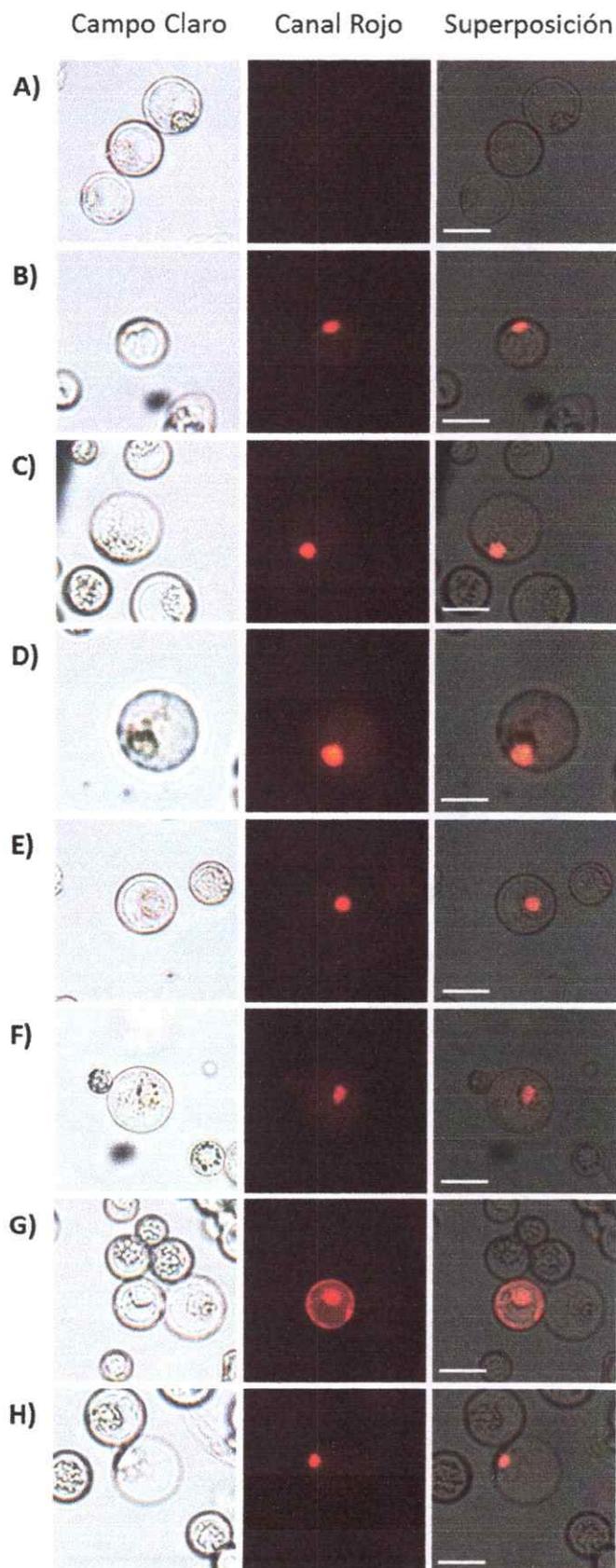


Figura 15. Transfección de protoplastos con los vectores pK7RWG2-FT. Transfección de protoplastos de *D. carota* con las construcciones que portan las secuencias de interés fusionadas a *RFP*. Se observan imágenes tomadas luego de 24 horas de la transfección. Canal rojo: imágenes tomadas bajo el filtro Cy3 para observar la fluorescencia de *RFP*. A) Vector vacío, B) ABRE1, C) ABRE3, D) ABRE4, E) CAREB1, F) CAREB2, G) Alfin2, H) Alfin3. Canal rojo: Imágenes tomadas bajo el filtro Cy3. Barra: 10 μ M.

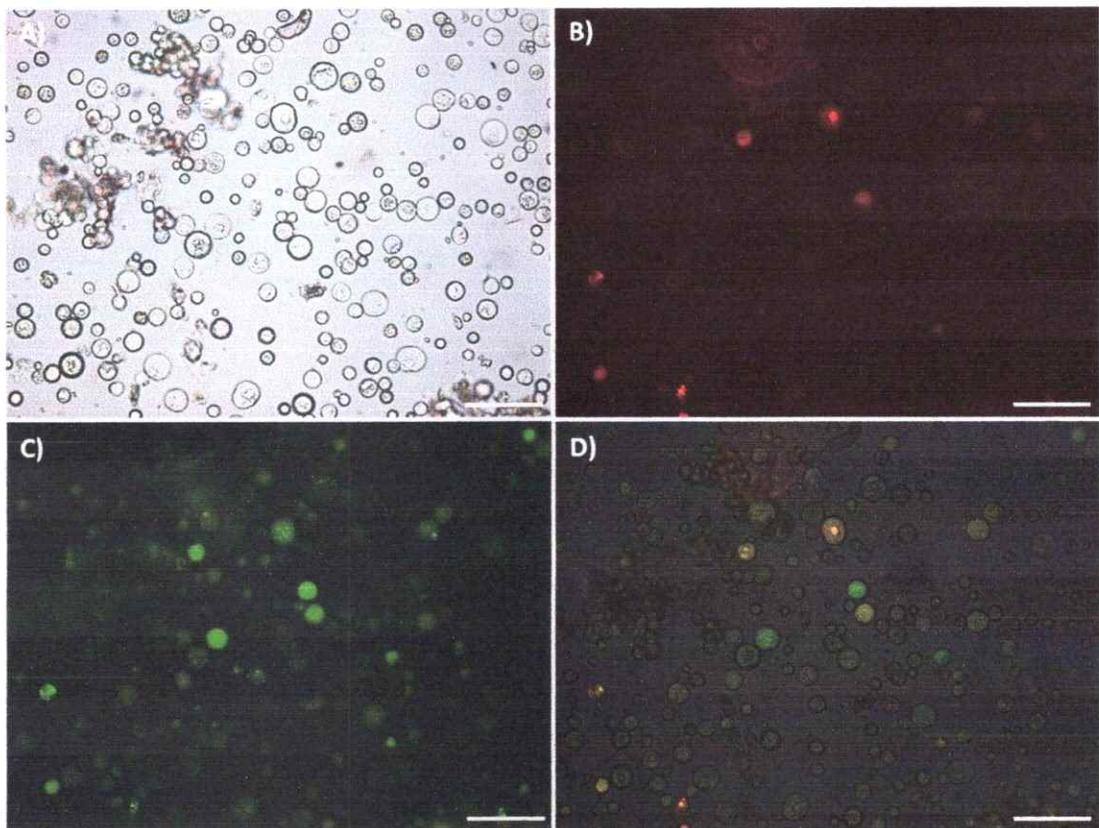


Figura 16. Fluorescencia basal de protoplastos luego de la transfección. Fotografías representativas tomadas luego de 24 horas de la transfección de protoplastos de *D. carota* con una de las construcciones pK7RWG2-FT. A) Campo claro, B) Canal rojo, C) Canal verde, D) Superposición canal rojo y canal verde. Se observa la baja tasa de transfección (fluorescencia roja, RFP) y la alta fluorescencia basal de los protoplastos (fluorescencia verde) luego de la transfección. Barra: 50 μ M.

3.4 Determinación de la capacidad de activar la transcripción de las secuencias

3.4.1 Generación de los vectores pDEST22-FT y pDEST32-FT

Para generar los vectores en donde las secuencias predichas como factores de transcripción se encuentran fusionadas al dominio de activación de GAL4 (GAL4 AD) y al dominio de unión a ADN de GAL4 (GAL4 DBD) se utilizaron los vectores pDEST22 y pDEST32, respectivamente. De esta forma, se realizó la recombinación entre estos

vectores y los vectores de entrada pCR8-FT (sección 2.13.3). Con el producto de recombinación, se transformaron células de *E. coli* quimiocompetentes, las cuales fueron sembradas en placas Petri suplementadas con ampicilina 100 mg/L (pDEST22) y gentamicina 10 mg/L (pDEST32). Para determinar de forma preliminar las colonias que portaban los vectores generados, se realizó un PCR de colonias utilizando como partidor directo los partidores pDEST22 F y pDEST32 F (Tabla I) y como partidores reverso los partidores de las secuencias de cada secuencia. Posteriormente, se extrajo ADN plasmidial a partir de las colonias positivas y se realizó una digestión con enzimas de restricción que permitiesen comprobar que las secuencias habían sido clonadas en la orientación correcta, las cuales se indican en la Tabla V. En la figura 17A se observan las bandas obtenida luego de la digestión de los vectores pDEST22-FT con las enzimas de restricción adecuadas, mientras que en la figura 17B se observan las bandas correspondientes a la digestión de los vectores pDEST32-FT. Para ambos casos, el patrón de bandas obtenidas luego de la digestión se corresponde con el patrón de bandas esperado. Finalmente, se procedió a transformar células de levadura con las construcciones generadas.

Tabla V. Enzimas de restricción utilizadas para digerir los vectores pDEST22-FT y pDEST32-FT.

Secuencias	Enzimas	pDEST22-FT	pDEST32-FT
ABRE1	Aval	6204, 1493, 516	5511, 1863, 1706, 1449, 388, 367, 264
ABRE3	HindIII	5253, 1624, 1613	10127, 1698
ABRE4	Aval	5961, 1493, 769	5268, 1863, 1706, 1449, 641, 367, 264
CAREB1	KpnI	6020, 2215	4887, 3743, 2940
CAREB2	Aval	5860, 1493, 435	5167, 1863, 1706, 1449, 367, 307, 264
Alfin2	Aval	5815, 1493, 666	5122, 1863, 1706, 1449, 538, 367, 264
Alfin3	Aval	5812, 1493, 537, 87	5119, 1863, 1706, 1449, 409, 367, 264

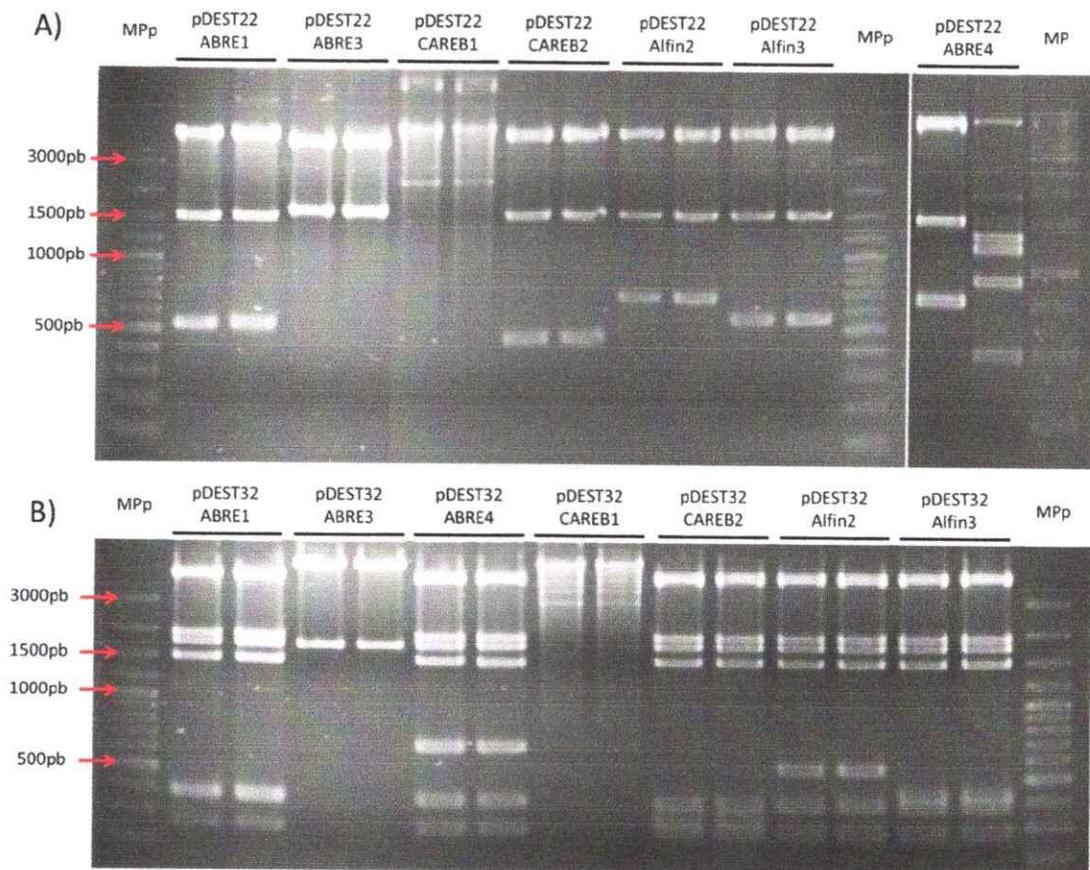


Figura 17. Digestión de colonias *E. coli* que portan los vectores pDEST22-FT y pDEST32-FT. Patrón de bandas obtenido luego de digerir los vectores pDEST22-FT (A) y pDEST32-FT (B) con las enzimas de restricción listadas en la Tabla V. Todas las colonias analizadas presentaron el patrón de bandas esperado. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb. MPp: Marcador de peso molecular 100 pb plus

3.4.2 Transformación de levaduras MaV203

Para determinar si los factores de transcripción eran capaces de activar la transcripción se realizó un ensayo de mono-híbrido en levadura utilizando los vectores pDEST32-FT y la cepa de levadura MaV203 (sección 2.24). Se transformaron células de levadura de la cepa MaV203 (sección 2.5) con los vectores pDEST32-FT y se sembraron en placas Petri con medio SD/-Leu sólido. Para determinar las colonias que portaban las construcciones se realizó un PCR de colonia a 3 colonias por cada

construcción utilizando como partidor directo pDEST32 F y como partidores reverso los partidores específicos de cada secuencia. De esta forma se esperaban las siguientes bandas: A1 (1457 pb), A3 (1734 pb), A4 (1467 pb), pDEST32 (2347 pb), C1 (1479 pb), C2 (1032 pb), A12 (1218 pb), A13 (1173 pb). En la figura 18 se observa que todas las colonias analizadas resultaron positivas para el PCR de colonia.

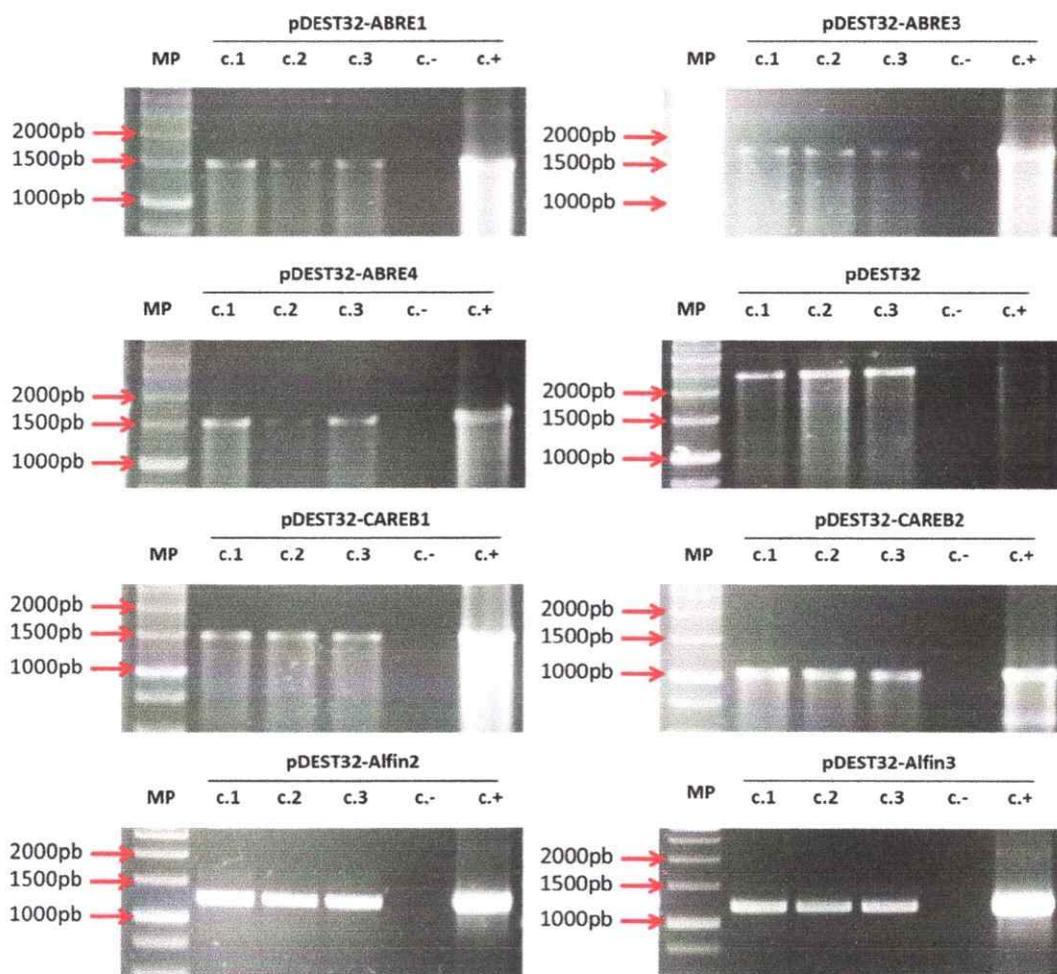


Figura 18. PCR realizado a levaduras MaV203 transformadas con los vectores pDEST32-FT. Análisis realizado mediante PCR de colonia a células de levadura de la cepa MaV203 transformadas con los vectores pDEST32-FT. c.1 a c.3 corresponde a tres colonias independientes analizadas por PCR; c.- control negativo (colonia sin transformar); c.+ control positivo (vector pDEST32-FT correspondiente). MP: Marcador de peso molecular 1 Kb.

3.4.3 Caracterización de levaduras MaV203 transformadas con las construcciones pDEST32-FT

La determinación de la activación de cada uno de los genes reporteros presentes en las células de levadura MaV203 (*URA3*, *HIS3* y *lacZ*) transformadas con las construcciones pDEST32-FT se realizó de acuerdo a lo señalado en materiales y métodos (sección 2.25). Debido a que la cepa MaV203 es capaz de expresar niveles basales de *HIS3*, primero fue necesario inhibir esta expresión basal mediante la adición de 3-Amino-1,2,4-Triazole (3AT). Se determinó que la mínima concentración de 3AT que es capaz de inhibir el crecimiento de células MaV203 en medio carente de histidina es 25 mM.

En la figuras 20 se observan las colonias crecidas en cada una de las placas diseñadas para observar la activación de los genes reporteros inducibles por GAL4: *URA3* (SD/-Leu-Ura), *HIS3* (SD/-Leu-His 25 mM 3AT) y *lacZ* (X-gal). Debido a que la cepa de levadura MaV203 posee la mutación *leu2-3* no puede crecer en medio SD/-Leu (medio basal SD sin leucina), por lo que solo colonias transformadas con las construcciones pDEST32-FT, las cuales posee el gen *LEU2*, serán capaces de crecer en un medio SD/-Leu. En la figura 19 se observa que todos los clones crecen en medio SD/-Leu, indicando que todos portan las construcciones pDEST32-FT, las cuales poseen las secuencias que codifican los factores de transcripción. Al crecer estos clones en medio SD/-Leu-Ura (medio basal SD sin leucina ni uracilo) se observa que todos los clones son capaces de crecer, a excepción de clones transformados con el vector pDEST32 vacío (19A). Sin embargo se observa que, en comparación a otros clones, los clones pDEST32-A4 (19D) no son capaces de crecer de la misma forma en medio SD/-Leu-Ura. Al observar los clones crecidos en placas SD/-Leu-His 25 mM 3AT (medio basal SD sin leucina ni histidina, suplementado con 25 mM de 3-Amino-1,2,4-

Triazole) nuevamente se observa que todos los clones son capaces de crecer, excepto los transformados con el vector pDEST32 vacío. Sin embargo, se observa mayor diferencia en el crecimiento de levaduras transformadas con vectores que portan las secuencias que codifican diferentes factores de transcripción, nuevamente observándose que los clones pDEST32-A4 poseen un crecimiento más limitado. Finalmente, al observar el ensayo X-gal se observa que los clones transformados con el vector pDEST32 vacío no presentan coloración, que los clones pDEST32-C1 (19E) y pDEST32-C2 (19F) presentan una coloración azul muy intensa, y que los clones pDEST32-A1 (19B), pDEST32-A3 (19C) y pDEST32-AI3 (19H) presentan un color azul muy tenue, mientras que en los clones pDEST32-A4 (19D) y pDEST32-AI2 (19G) la coloración azul es aún mucho más tenue. En conjunto, estos resultados sugieren que todos los factores de transcripción son capaces de activar la transcripción de los tres genes reporteros en levadura, aunque con diferente fuerza.

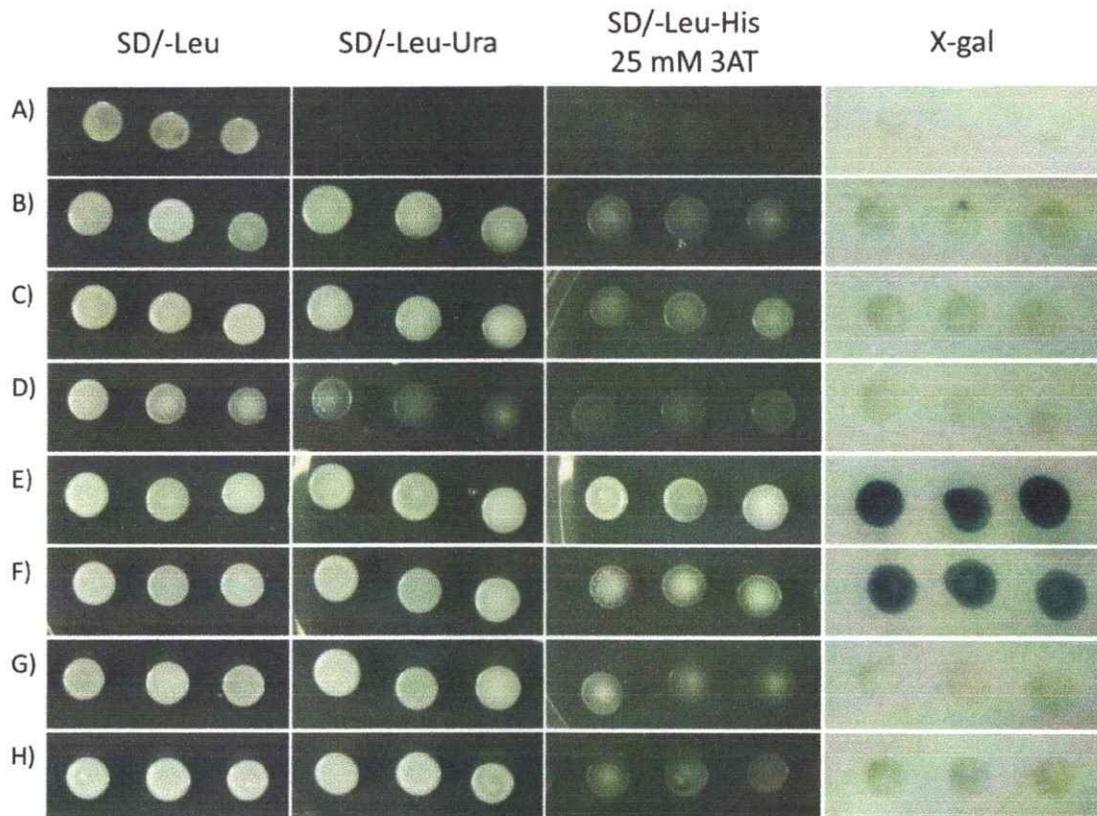


Figura 19. Ensayo de expresión de los genes reporteros *URA3*, *HIS3* y *lacZ* en levaduras MaV203 transformadas con las construcciones pDEST32-FT. Levaduras MaV203 transformadas con los vectores pDEST32-FT crecidas en medio SD/-Leu (medio basal SD sin leucina, control de crecimiento), SD/-Leu-Ura (auxotrofia para uracilo), SD/-Leu-His+ 25 mM 3AT (auxotrofia para histidina). La columna X-gal corresponde al ensayo de X-gal realizado para examinar la inducción de *lacZ* A) Vector vacío, B) ABRE1, C) ABRE3, D) ABRE4, E) CAREB1, F) CAREB2, G) Alfin2, H) Alfin3

3.5 Determinación la unión de las secuencias al promotor de *PSY2* de *D. carota*

3.5.1 Generación de las construcciones pP1-AbAi y pP2-AbAi

La generación de los vectores en donde los promotores de *PSY2* de *D. carota* P1 (421 pb) y P2 (770 pb) dirigen la expresión del gen *AUR1-C* se realizó de acuerdo a lo señalado en materiales y métodos (sección 2.22). Se agregaron sitios de restricción para las enzimas *SacI* y *SalI* a los promotores P1 y P2 y se clonaron en el vector

pCR8. En la figura 20 se observa un PCR de colonia realizado a colonias de *E. coli* transformadas con las construcciones pCR8-P1 y pCR8-P2.

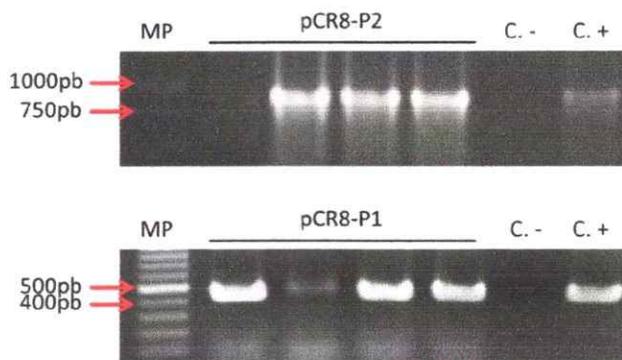


Figura 20. PCR realizado a colonias transformadas con las construcciones pCR8-P1 y pCR8-P2. Análisis realizado a 4 colonias de *E. coli* transformadas con los vectores pCR8-P1 y pCR8-P2 mediante PCR de colonia. c.- control negativo (colonia sin transformar); c.+ control positivo (ppPSY2 para pCR8-P2 y pmPSY2 para pCR8-P1). MP: Marcador de peso molecular.

Posteriormente, los vectores pCR8-P1, pCR8-P2 y el vector pAbAi fueron digeridos con las enzimas *SacI* y *SaII* para liberar los promotores y linearizar el vector pAbAi. En la figura 21 se observa que los promotores P1 y P2 pudieron ser liberados de sus respectivos vectores luego de realizar la digestión.

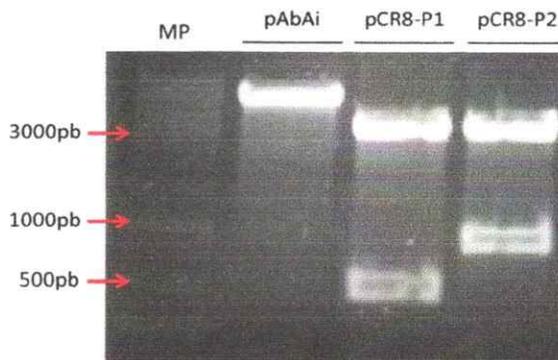


Figura 21. Digestión de los vectores pCR8-P1, pCR8-P2 y pAbAi. Liberación de los fragmentos P1 y P2 a partir de los vectores pCR8-P1 y pCR8-P2 y linearización del vector pAbAi mediante la digestión con las enzimas *SacI* y *SaII*. MP: Marcador de peso molecular 1 kb.

Finalmente, luego de liberar los promotores P1 y P2 se realizó su ligación con el vector pAbAi linearizado para generar las construcciones pP1-AbAi y pP2-AbAi. Con el producto de la ligación se transformaron células de *E. coli* quimiocompetentes, las cuales fueron sembradas en placas Petri suplementadas con ampicilina 100 mg/L. Se determinó de forma preliminar las colonias que portaban estas construcciones mediante un PCR de colonia y se realizó una digestión enzimática a los clones positivos con la enzima *EcoRI* (Figura 22).

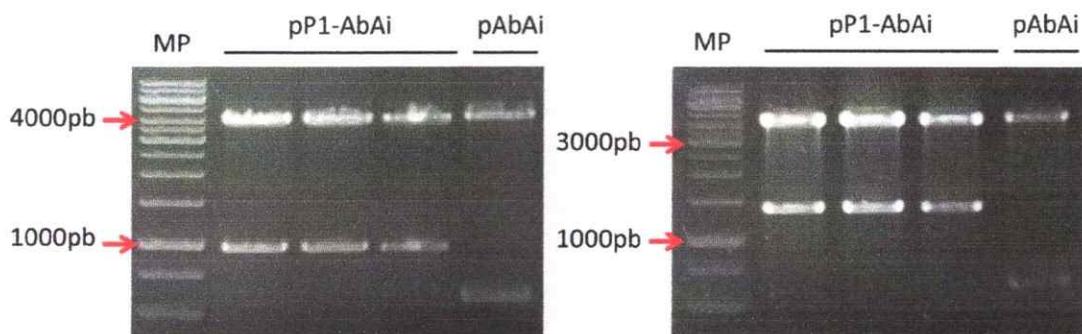


Figura 22. Digestión de los vectores pP1-AbAi y pP2-AbAi. Patrón de bandas obtenido luego de digerir DNA plasmidial de tres clones de pP1-AbAi y pP2-AbAi con la enzima de restricción *EcoRI*. MP: Marcador de peso molecular 1 kb.

3.5.2 Transformación de levaduras Y1HGold

Una vez obtenidos los vectores pP1-AbAi y pP2-AbAi se procedió a transformar células de levadura cepa Y1HGold con estas construcciones (sección 2.5) para generar las cepas reporteras Y1HGold-pP1-AbAi y Y1HGold-pP2-AbAi. La cepa de levadura Y1HGold posee la mutación *ura3-52*, por lo que no es capaz de crecer en medio SD carente de uracilo a menos que porte un vector que posea el gen *URA3*, como lo es pAbAi. Por lo tanto, las levaduras transformadas fueron sembradas en placas Petri con medio SD/-Ura sólido. En la Figura 23 se observa un PCR de colonia

realizado a colonias de levaduras Y1HGold transformadas con las construcciones pP1-AbAi y pP2-AbAi utilizando como partidores directos P1PSY2 F *SacI* y P2PSY2 F *SacI* y como partidore reverso PPSY2 R *SacI*. De esta forma, para la construcción pP1-AbAi se esperaba una banda de 421 pb, mientras que para la construcción pP2-AbAi se esperaba una banda de 770 pb, lo cual se obtuvo satisfactoriamente.



Figura 23. PCR realizado a colonias de levaduras Y1HGold transformadas con las construcciones pP1-AbAi y pP2-AbAi. Análisis realizado mediante PCR de colonia a 4 colonias de levadura de la cepa Y1HGold transformadas con los vectores pP1-AbAi y pP2-AbAi. c.-: control negativo (colonia no transformada); c.+ : control positivo (vectores pP1-AbAi y pP2-AbAi). MP: Marcador de peso molecular 1 kb.

Debido a que es probable que exista una expresión basal del gen reportero que confiere resistencia al antibiótico Aureobasidin A (AbA) presente en el vector pAbAi, una vez obtenidas las cepas de levadura reportera Y1HGold-pP1-AbAi y Y1HGold-pP2-AbAi se determinó la concentración mínima de AbA que es capaz de inhibir el crecimiento de estas cepas de levadura (sección 2.23). Se determinó que para las levaduras Y1HGold-pP1-AbAi la mínima concentración de AbA que inhibe su crecimiento es 500 ng/mL, mientras que para las levaduras Y1HGold-pP2-AbAi la

mínima concentración fue de 750 ng/mL. Por lo tanto, estas fueron las concentraciones utilizadas para crecer las cepas transformadas con las construcciones pDEST22-FT.

3.5.3 Determinación de la interacción entre las secuencias de interés y el promotor de *PSY2* de *D. carota*

Para determinar si los factores de transcripción son capaces de unirse al promotor de *PSY2* de *D. carota* se realizó un ensayo de mono-híbrido en levadura utilizando los vectores pDEST22-FT y las cepas de levadura Y1HGold-pP1-AbAi y Y1HGold-pP2-AbAi, tal como se indica en materiales y métodos (sección 2.24). La cepa Y1HGold también posee la mutación *trp1-901*, impidiendo que crezca en medio SD carente de triptófano, a menos que porte un vector que posea el gen *TRP1*, como lo es pDEST22. Por lo tanto, las células de levaduras Y1HGold-pP1-AbAi y Y1HGold-pP2-AbAi transformadas con los vectores pDEST22-FT fueron sembradas en placas Petri con medio SD/-Ura-Trp sólido. Para determinar las colonias que portaban las construcciones se realizó un PCR de colonia a 3 colonias por cada construcción. En la Figura 24 se muestra el PCR realizado a las colonias Y1HGold-pP2-AbAi transformadas con los vectores pDEST22-FT utilizando como partidor directo pDEST22 F y como partidores reverso los partidores específicos de las secuencias. De esta forma, luego de realizar el PCR de colonia se esperaban las siguientes bandas: A1 (1196 pb), A3 (1473 pb), A4 (1206 pb), pDEST22 (2088 pb), C1 (1218 pb), C2 (771 pb), AI2 (957 pb), AI3 (912 pb), y se observa en esta figura que todas las colonias analizadas resultaron positivas para el PCR de colonia. De la misma forma, todas las colonias Y1HGold-pP1-AbAi transformadas con los vectores pDEST22-FT analizadas resultaron ser positivas para el PCR de colonia (figura no mostrada).

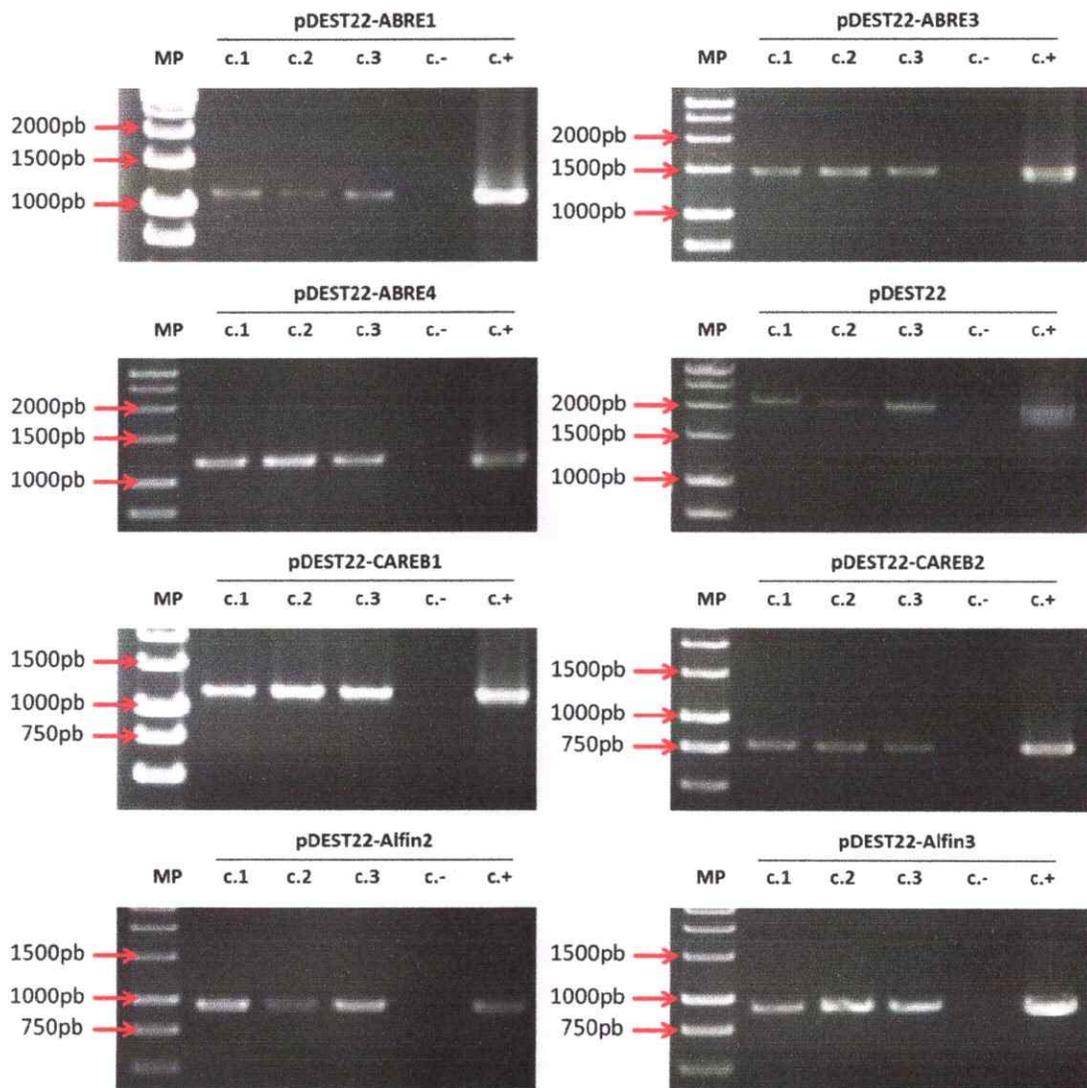


Figura 24. PCR realizado a colonias de levaduras Y1HGGold-pP2-AbAi transformadas con las construcciones pDEST22-FT. Análisis realizado mediante PCR de colonia a 4 colonias levadura de la cepa Y1HGGold-pP2-AbAi transformadas con los vectores pDEST22-FT y con el vector vacío pDEST22. c.-: control negativo (colonia no transformada); c.+ : control positivo (vectores pDEST22-FT). MP: Marcador de peso molecular 1 kb.

En la figura 25 se muestra un esquema que ilustra la activación de la expresión del gen reportero *AUR1-C* luego de producirse la unión de los factores de transcripción fusionados al dominio de activación de GAL4 a la región promotora del gen *PSY2* de *D. carota*. En esta figura se observa que solo levaduras reporteras transformadas con

vectores que portan secuencias que codifiquen factores de transcripción capaces de unirse a la región promotora de *PSY2* serán capaces de crecer en un medio suplementado con el antibiótico Aureobasidin A, ya que el dominio de activación de la transcripción de GAL4 reclutará la maquinaria de transcripción, activando la expresión del gen de resistencia a Aureobasidin A.

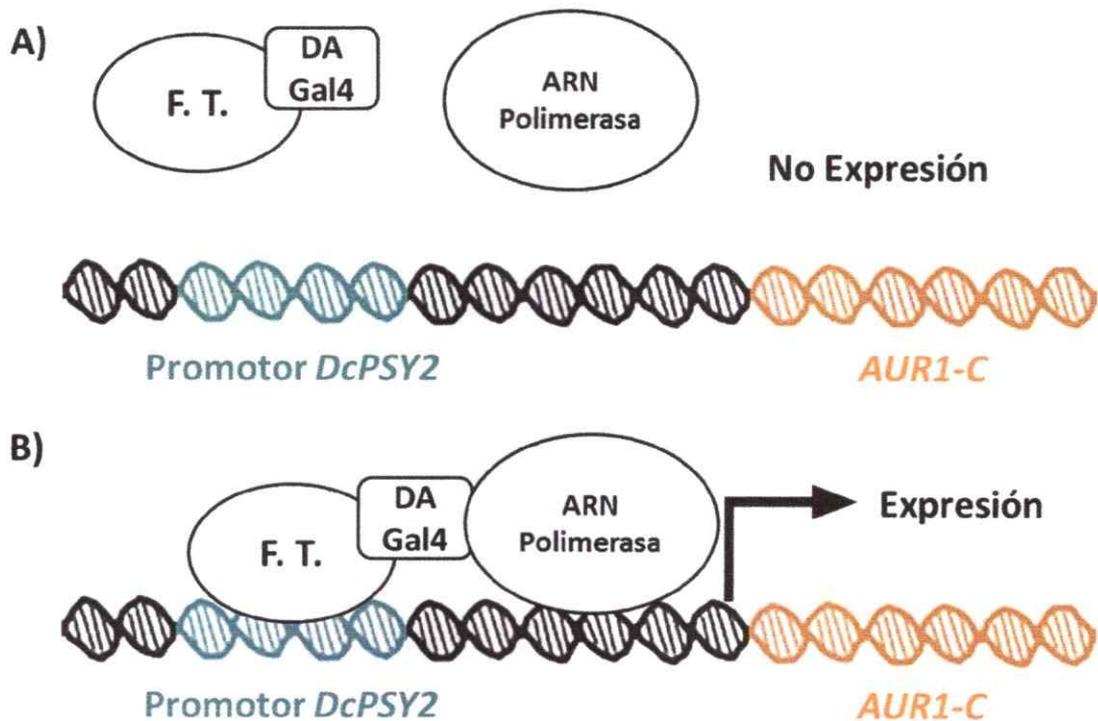


Figura 25. Esquema de la detección de la interacción entre los factores de transcripción y el promotor de *PSY2*. A) No existe expresión del gen de resistencia a Aureobasidin A *AUR1-C* debido a que los factores de transcripción fusionados al dominio de activación de GAL4 (DA GAL4) no son capaces de unirse a la región promotora del gen *PSY2* de *D. carota*, impidiendo que se reclute la maquinaria de transcripción, B) la unión de los factores de transcripción a la región promotora de *PSY2* permite que el dominio de activación de GAL4 (DA GAL4) reclute a la maquinaria de transcripción, la cual activa la expresión del gen *AUR1-C*.

De esta forma, las colonias que resultaron positivas para el PCR fueron depositadas en placas Petri con medio SD/-Ura-Trp sólido suplementadas con AbA (500 ng/mL para las levaduras Y1HGold-pP1-AbAi y 750 ng/mL para las Y1HGold-pP2-

AbAi), tal como se indica en materiales y métodos. En la figura 27 se observan los clones que fueron capaces de crecer en el medio de selección. Como se mencionó anteriormente, solo aquellas células que porten los vectores pAbAi y pDEST22, los cuales poseen los marcadores de selección nutricional *URA3* y *TRP1*, respectivamente, serán capaces de crecer en medio SD/-Ura-Trp debido a las mutaciones que posee la cepa Y1HGold (*ura3-52* y *trp1-901*). En la Figura 26 se aprecia que todas las colonias fueron capaces de crecer en medio SD/-Ura-Trp sin AbA, indicando que todas portan ambos vectores. Además, tanto la cepa reportera Y1HGold-pP1-AbAi como la Y1HGold-pP2-AbAi transformadas con el vector vacío pDEST22 no son capaces de crecer en medio SD/-Ura-Trp suplementado con 500 ng/mL y 750 ng/mL de AbA (27A), respectivamente, indicando que estas concentraciones de AbA son capaces suprimir la expresión basal del gen *AUR1-C*, responsable de la resistencia a AbA, de las cepas reporteras. Además, ninguno de los clones transformados con las construcciones pDEST22-C1 (27E) y pDEST22-C2 (27F) fueron capaces de crecer en medio SD/-Ura-Trp suplementado con AbA. Esto indicaría que tanto CAREB1 como CAREB2 no se unen al promotor de *PSY2* de *D. carota*. Sin embargo, se observa que colonias de levaduras Y1HGold-pP1-AbAi transformadas con las construcciones pDEST22-A1 (27B), pDEST22-A3 (27C), pDEST22-A4 (27D), pDEST22-AI2 (27G) y pDEST22-AI3 (27H) si son capaces de crecer en medio SD/-Ura-Trp suplementado con 500 ng/mL de AbA. Este resultado sugiere que tanto los factores de transcripción del tipo AREB/ABF como los del tipo Alfin estarían uniéndose al promotor P1 de *D. carota*. Sin embargo, el crecimiento de las levaduras se ve bastante reprimido, indicando una interacción débil entre las secuencias y el promotor P1. Del mismo modo, se observa que las colonias de levaduras Y1HGold-pP2-AbAi transformadas con las construcciones pDEST22-A1 (27B), pDEST22-A3 (27C), pDEST22-A4 (27D), pDEST22-AI2 (27G) y pDEST22-AI3 (27H) crecen en medio SD/-

Ura-Trp suplementado con 750 ng/mL de AbA. Si bien es posible apreciar que existe un mayor crecimiento de las levaduras Y1HGold-pP2-AbAi en comparación a las Y1HGold-pP1-AbAi al ser transformadas con la misma construcción pDEST22-FT, este comportamiento no es del todo claro.

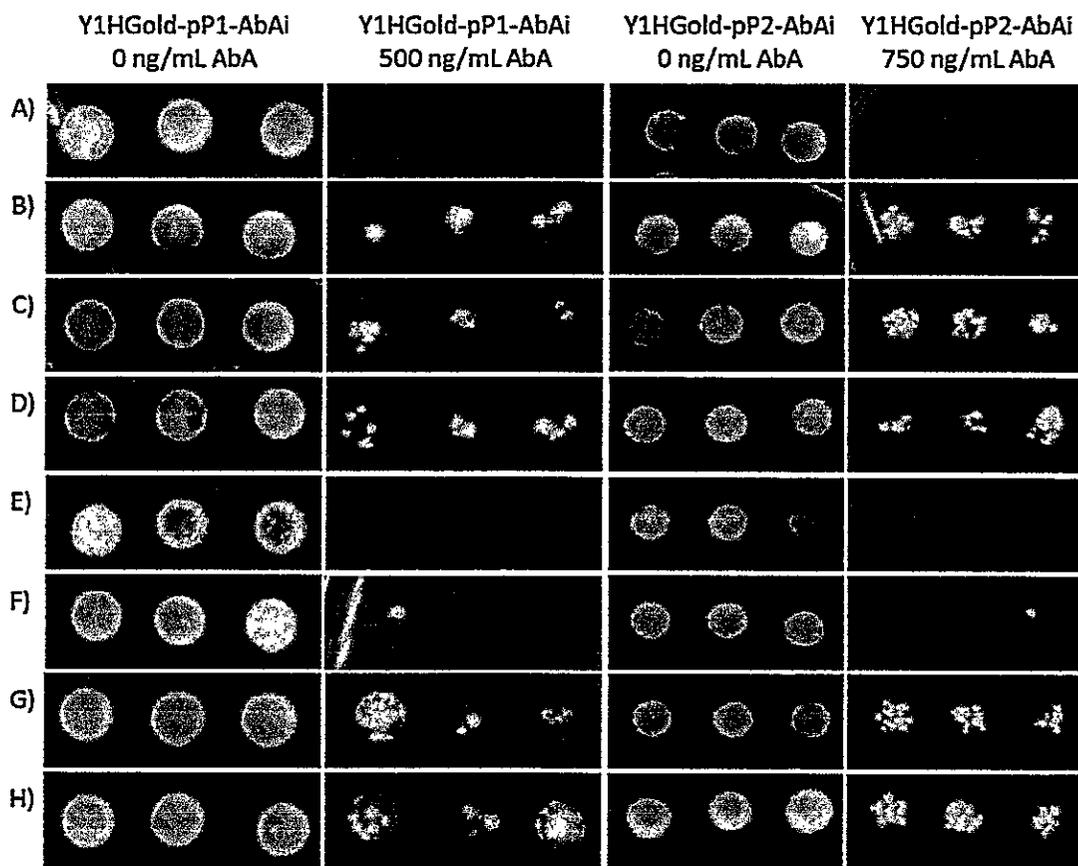


Figura 26. Interacción entre los factores de transcripción y el promotor de *PSY2*. Levaduras Y1HGold-pP1-AbAi y Y1HGold-pP2-AbAi transformadas con los vectores pDEST22-FT crecidas en medio SD/Ura-Trp suplementado con AbA. A) Vector vacío, B) ABRE1, C) ABRE3, D) ABRE4, E) CAREB1, F) CAREB2, G) Alfin2, H) Alfin3.

DISCUSIÓN

4.1 Elementos reguladores de la transcripción presentes en el promotor del gen *PSY2* de *D. carota*.

La gran cantidad de elementos de respuesta a luz presentes en el promotor del gen *PSY2* de *D. carota*, y en general en los promotores de los genes *PSY* de otras especies (Welsch y col., 2003; Welsch y col., 2008; Lao y col., 2011; Qin y col., 2011), puede estar relacionada con la importancia que poseen los carotenoides en procesos que involucran a la luz, como los es la captación de luz durante la fotosíntesis y la disipación del exceso de energía lumínica (Demmig-Adams y col., 1996; Niyogi, 1999; Demmig-Adams y Adams, 2006; Xiao y col., 2011). La capacidad de los genes carotenogénicos de responder rápidamente a los estímulos lumínicos, sobre todo en uno de los genes que constituye un punto clave de regulación en la ruta de síntesis de carotenoides como los es *PSY*, es de vital importancia para las plantas, ya que éstas necesitan sintetizar carotenoides en particular luteína para realizar la fotosíntesis y las xantófilas zeaxantina y violaxantina para disipar el exceso de luz que necesita ser disipado para evitar el daño foto-oxidativo.

En *D. carota* se ha descrito que la expresión de la mayoría de los genes carotenogénicos aumenta durante el desarrollo de la raíz modificada crecida en condiciones de oscuridad, especialmente la de los genes *LCYB1* y *PSY2*, lo que se ve acompañado por un aumento en los niveles de carotenoides (Fuentes y col., 2012). Este aumento de la expresión en oscuridad sugiere la existencia de otros estímulos, además de luz, capaces de regular la activación de los promotores de genes carotenogénicos en la raíz modificada, los cuales estarían relacionados principalmente con el desarrollo de la raíz y la expresión de genes en oscuridad. En este sentido, dos de los genes *PSY* de arroz, *OsPSY1* y *OsPSY2*, son regulados por luz y están

involucrados en la biosíntesis de carotenoides en tejidos fotosintéticamente activos. La expresión de estos genes es mayor en hojas en desarrollo que en hojas maduras, en donde solo se necesita mantener un equilibrio en el recambio de carotenoides. Por otro lado, la *OsPSY3* no se ve afectada por luz y sus niveles de transcrito permanecen bajos en todas las condiciones observadas. Sin embargo, la expresión de *OsPSY3* aumenta en respuesta al aumento de los niveles de ABA (Welsch y col., 2008). Del mismo modo, la expresión de *PSY3* de maíz juega un papel importante en el control del flujo de los carotenoides en la raíz en respuesta a ABA (Li y col., 2008). En *A. thaliana* se encontró que ABA es capaz de aumentar la expresión de *PSY* solo en raíces, lo que sugiere una retroalimentación órgano-específica de la ruta de carotenoides mediada por ABA (Ruiz-Sola y col., 2014). Estos reportes sugieren que la fitohormona ABA estaría relacionada con la activación de la ruta de biosíntesis de carotenoides en las raíces de las plantas, ya sea en respuesta al desarrollo o a diferentes estímulos por estrés.

En *D. carota*, se determinó que la aplicación exógena de ABA produce un aumento en la expresión del gen *PSY2*, indicando que este gen es capaz de responder a ABA (Fuentes, 2011). Como se ha visto en los promotores de genes *PSY* de otras especies, esta capacidad de responder a ABA del gen *PSY2* de *D. carota* estaría relacionada con elementos cis presentes en su promotor. Se ha descrito que dentro de los elementos de respuesta a hormonas presentes en este promotor existen 3 elementos de respuesta a ABA (ABRE). Si bien no se encontró ninguno de los elementos acopladores (CE) descritos en el promotor de *PSY2*, los cuales serían necesarios para establecer un complejo mínimo de respuesta a ABA (ABRC) y conferir la capacidad de responder a ABA (Shen y col., 1996), dos de los motivos ABRE encontrados en el promotor de *PSY2* se encuentran próximos entre sí, lo que permitiría

que uno de ellos pudiese actuar como un CE para el otro motivo ABRE (Hobo y col., 1999), y de esta forma explicar la capacidad que posee este promotor de responder a ABA.

Por otro lado, además de los elementos de respuesta a luz y hormonas ya descritos en el promotor de *PSY2* de *D. carota*, en este trabajo se identificaron varios sitios de unión para factores de transcripción de tipo Alfin. Si bien hasta la fecha no existen reportes que relacionen a los factores de transcripción Alfin con la biosíntesis de carotenoides, la gran cantidad de sitios de unión para este tipo de factores de transcripción (al menos 11) encontrados en el promotor de *PSY2* de *D. carota*, sumado a la importancia de estas proteínas en procesos biológicos como el crecimiento y desarrollo de la raíz y la elongación de pelos radiculares, además de su papel en la regulación de la tolerancia a estrés por sal (Bastola y col., 1998; Winicov, 2000; Chandrika y col., 2013), sugiere que estas proteínas podrían estar regulando la síntesis de carotenoides durante el desarrollo de la raíz y/o en respuesta a altas concentraciones de sal en *D. carota*, lo que hace que los factores de transcripción de tipo Alfin sean un blanco importante de estudio en este modelo vegetal. Además, si consideramos que los carotenoides poseen la capacidad de eliminar las especies reactivas de oxígeno, principales responsables del daño producido por estrés por sal, los factores de transcripción de tipo Alfin podrían estar mediando la defensa a este estrés a través de la síntesis de carotenoides que permitan eliminar las especies reactivas de oxígeno, lo que explicaría en parte a la presencia de sitios de unión para este tipo de factores de transcripción en el promotor de uno de los genes claves de la ruta de biosíntesis de carotenoides, como lo es *PSY*.

Si bien ambos genes *PSY* de *D. carota* se expresan durante el desarrollo, se ha descrito *PSY2* estaría relacionado con la síntesis de carotenoides principalmente en la

raíz modificada, mientras que *PSY1* estaría asociado a la síntesis de carotenoides en hojas maduras (Fuentes, 2009). Considerando que estos genes se expresan diferencialmente tanto durante el desarrollo como en diferentes órganos de *D. carota*, un paso importante para la caracterización de la ruta de biosíntesis de carotenoides en este modelo vegetal sería la identificación y el análisis de la región promotora del gen *PSY1*. Esto permitiría realizar la comparación entre las regiones promotoras de los dos genes *PSY* y determinar si la expresión diferencial observada se ve reflejada en los elementos *cis* encontrados en cada uno de los promotores. Además, considerando lo observado en arroz, en donde se determinó que las diferencias encontradas en la expresión de los genes *PSY* en respuesta a diferentes estímulos se encuentran también reflejadas en los elementos *cis* presentes en sus promotores (Welsch y col., 2008), sería interesante determinar la capacidad de ambos genes de responder a diferentes estímulos y asociarlo a los elementos presentes en sus promotores.

4.2 Identificación de factores de transcripción de tipo AREB/ABF y Alfin en el transcriptoma de *D. carota*.

En plantas, gran parte de la respuesta fisiológica frente a la horma ABA se lleva a cabo mediante la regulación de genes a nivel transcripcional (Busk y Pages, 1998), siendo los factores de transcripción de tipo bZIP quienes juegan un papel importante en el control de la expresión de genes regulados por ABA mediante la interacción con elementos *cis* presentes en sus promotores (Hobo y col., 1999; Choi y col., 2000; Uno y col., 2000). Como se mencionó anteriormente, se ha descrito que todos los factores de transcripción bZIP involucrados en la señalización de ABA pertenecen al grupo A. Específicamente, en *A. thaliana* se describió la sub-familia de factores de transcripción bZIP del grupo A que codifican para las proteínas denominadas AREB/ABF (Choi y col., 2000; Uno y col., 2000) son capaces de unirse a motivos ABRE *in vitro* y activar la

expresión de genes en respuesta a ABA (Fujita y col., 2005; Furihata y col., 2006; Kim, 2006). A pesar de la existencia de otras proteínas capaces de unirse a motivos ABRE que pertenecen otros grupos de factores de transcripción bZIP, en este trabajo solamente nos centramos en la búsqueda factores de transcripción capaces de unirse al promotor de *PSY2* de *D. carota* con homología a proteínas bZIP del grupo A.

De todas las secuencias con homología a factores de transcripción bZIP del grupo A que arrojó el alineamiento entre el transcriptoma de *D. carota* y la base de datos de factores de transcripción de PlantTFDB solo se seleccionaron las 5 secuencias con el mayor porcentaje de identidad a los factores de transcripción bZIP perteneciente a este grupo. En base a la homología que existe entre las secuencias encontradas y los factores de transcripción AREB/ABF de *A. thaliana*, se determinó que ABRE1 (A1) y ABRE4 (A4) podrían estar codificando para proteínas de unión a elementos de respuesta a ABA involucradas en la regulación de la transcripción de genes de respuesta a ABA durante maduración y el desarrollo de semillas (Lopez-Molina y Chua, 2000; Bensmihen y col., 2002; Kim y col., 2002; Bensmihen y col., 2005; Kim, 2006); mientras que, ABRE2 (A2), ABRE3 (A3) y ABRE5 (A5) también estaría codificando para factores de transcripción capaces de unirse a motivos ABRE presentes en los promotores de genes inducidos por ABA, sin embargo estas secuencias se expresarían principalmente en tejido vegetativo aumentando la tolerancia a estrés abiótico (Choi y col., 2000; Uno y col., 2000; Kang y col., 2002; Kim y col., 2002; Fujita y col., 2005). Por lo tanto, todas estas secuencias estarían involucradas en la unión a motivos ABRE y en activar la transcripción de genes inducidos por ABA, ya sea en respuesta al desarrollo o en la mediación de la tolerancia a estrés abiótico.

Del mismo modo, de las 11 secuencias encontradas en el transcriptoma de *D. carota* con homología a los factores de transcripción de tipo Alfin presentes en la base de datos de PlantTFDB se seleccionaron las secuencias 3 con el mayor porcentaje de identidad. Se encontró que la secuencia denominada como Alfin1 (Al1), Alfin2 (Al2) y Alfin3 (Al3) presentaban un porcentaje de identidad del 61, 69 y 73%, respectivamente, con la proteína Alfin1 de *Medicago sativa* (número de acceso L07291). Estos resultados indicarían que estas secuencias podrían estar involucradas en la mediación de señales y la regulación de genes que participen en el crecimiento y el desarrollo de la raíz en *D. carota*, así como mediar la respuesta de tolerancia estrés por sal (Bastola y col., 1998; Winicov, 2000; Chandrika y col., 2013).

4.3 Generación de las construcciones portadoras de las secuencias identificadas

Solo 9 de las 10 secuencias seleccionadas en un comienzo fueron posibles de aislar a partir de ADNc sintetizado de ARNm de hojas jóvenes de *D. carota* zanahoria. No fue posible obtener la secuencia de Al1, lo que entre otras cosas puede deberse a errores en el diseño de los partidores sintetizados a partir de las secuencias anotadas en el transcriptoma de *D. carota* o la ausencia o baja cantidad del transcrito de Al1 en el tejido utilizado para sintetizar el ADNc. Como se ha mencionado, la familia de factores de transcripción de tipo Alfin está involucrada en varios procesos del desarrollo, principalmente en raíz. En alfalfa, Alfin1 demostró regular la expresión de genes inducidos por sal, además de contribuir a la tolerancia a sal (Bastola y col., 1998; Winicov y Bastola, 1999; Winicov, 2000). En *Brassica rapa* la mayoría de los genes pertenecientes a esta familia de factores de transcripción son capaces de expresarse en respuesta a estrés biótico, mientras que todos son inducidos bajo estrés por frío, sequía y sal. Sin embargo, además de los ya mencionados, hasta la fecha no existen reportes del estudio funcional de los factores de transcripción de tipo Alfin en

planta en respuesta a estrés (Kayum y col., 2015). A pesar que A11 es la secuencia con el menor porcentaje identidad al factor de transcripción Alfin1 de *Medicago sativa* de las secuencias con homología a factores de transcripción de tipo Alfin analizadas en este trabajo, hubiese sido interesante analizar su capacidad de unirse al promotor de *PSY2* de *D. carota*, así como su capacidad de activar la transcripción de este gen.

Del mismo modo, no fue posible analizar las secuencias de A2 y A5 debido a que, a pesar de haber sido amplificadas a partir de ADNc de *D. carota*, no fue posible clonarlas en el vector de entrada. Las secuencias de A2 y A5 estarían codificando para proteínas bZIP con alta homología a los factores de transcripción ABF3 y AREB1/ABF2 de *A. thaliana*, respectivamente. Se ha demostrado que tanto ABF3 como AREB1/ABF2 son capaces de unirse a motivos ABRE, además de ser inducidas por deshidratación, alta salinidad y tratamientos de ABA en tejido vegetativo (Fujita y col., 2005), mientras que la sobreexpresión de estos factores de transcripción produce un aumento en la tolerancia a sequía (Kang y col., 2002; Kim y col., 2004a; Fujita y col., 2005). Además, mediante el análisis de mutantes para estos genes se ha determinado que ABF3 y AREB1/ABF2 son factores de transcripción maestros que cooperativamente regulan la expresión génica dependiente de motivos ABRE en la ruta de señalización de ABA bajo condiciones de estrés osmótico (Yoshida y col., 2010). De esta forma, A2 y A5 podrían estar cumpliendo funciones similares en *D. carota*, posicionándolos como candidatos ideales para su posterior estudio.

4.4 Localización sub-celular de las secuencias seleccionadas

La transformación transitoria de hojas de *N. tabacum* con vectores que portan las secuencias seleccionadas permitió determinar que A1, A3 y A4 son proteínas que se encuentran localizadas en el núcleo, al igual que C1 y C2, las cuales ya habían sido reportadas como factores de transcripción nucleares (Guan y col., 2009). Esto

concuerta con lo observado en otras proteínas bZIP, ya que para ser destinadas a núcleo, los factores de transcripción de la familia bZIP poseen una señal de localización nuclear dentro de la región básica implicada en la unión a ADN (Miller, 2009).

En cuanto a los factores de transcripción de tipo Alfin, se observó que Al3 sería una proteína nuclear, lo que se corresponde con *Alfin1* de alfalfa (Bastola y col., 1998). Sin embargo, al observar células de tabaco transformadas con el vector que porta la secuencia de Al2 fusionada a RFP, no solo se observó fluorescencia en el núcleo de las células, sino que también en el citoplasma. Este resultado indicaría que Al2 sería una proteína que se encontraría localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células. Sin embargo, todas las proteínas pertenecientes a la familia de factores de transcripción de tipo Alfin han sido reportadas como proteínas nucleares (Bastola y col., 1998; Lee y col., 2009; Song y col., 2013; Kayum y col., 2015), indicando que este resultado podría deberse a un artefacto de la clonación de Al2 en el vector de expresión. En este sentido, tanto en eucariontes como en procariontes la traducción se inicia generalmente en el codón AUG. Sin embargo, se ha reportado que ocasionalmente puede existir la iniciación alternativa de la traducción en codones que nos son AUG localizados río arriba del codón de inicio AUG, generalmente en el mismo marco de lectura (Depeiges y col., 2006), lo cual ha sido demostrado en varios organismos, incluyendo plantas (Gordon y col., 1992). Específicamente, la traducción del gen *AGAMOUS* de *A. thaliana* inicia exclusivamente en el codón ACG (Riechmann y col., 1999), mientras que dos genes *RpoT* de tabaco inician exclusivamente en el codón CUG (Hedtke y col., 2002; Kobayashi y col., 2002). Mediante el análisis de la expresión del gen reportero de la cloranfenicol acetiltransferasa (*CAT*) en protoplastos de *Nicotiana plumbaginifolia* y *Orychophragmus violaceus* se determinó la eficiencia de

la iniciación de la traducción en tripletes que no son AUG, observándose que de los codones analizados CUG permitiría la mayor actividad de CAT, con un 30% de la actividad de CAT con AUG, seguido de GUG y ACG, con un 15% de la actividad (Gordon y col., 1992). Estos resultados fueron comprobados más tarde en plantas transgénicas de *A. thaliana* (Depeiges y col., 2006). En este sentido, al revisar la secuencia de AI2 clonada en el vector de entrada se observa que 48 pb río arriba del primer ATG se encuentra el codón GTG. Esto podría indicar que, si bien AI2 se estaría traduciendo principalmente a partir del primer ATG presente en su secuencia, un porcentaje no menor de la traducción está ocurriendo a partir de GTG. Interesantemente, utilizando el programa bioinformático WoLF PSORT, que permite realizar la predicción de la localización sub-celular de proteínas, se determinó que al introducir la secuencia de AI2 desde el codón GTG el programa indica que AI2 tiene una alta probabilidad de localizarse en el citoplasmática; sin embargo, al introducir la secuencia a partir desde el primer codón ATG, el programa indica la proteína tiene una alta probabilidad de localizarse en el núcleo. Estos resultados sugieren que la fluorescencia de RFP observada en el núcleo de células de tabaco transformadas transitoriamente con AI2 fusionada a RFP se debe a la proteína que ha sido traducida a partir del primer ATG, mientras que la fluorescencia observada en el citoplasma se debe a la proteína que ha sido traducida a partir GTG, lo cual podría ser fácilmente demostrado al clonar AI2 sin el fragmento río arriba del primer ATG.

4.5 Transfección de protoplastos

La transfección de protoplastos ha sido utilizada en numerosas ocasiones para diseccionar la función de elementos *cis* presentes en promotores y de factores de transcripción en varios procesos esenciales y rutas de señalización (revisado en Sheen, 2001). Es por eso que la primera aproximación para determinar si los factores

cambio en la cuantificación de la fluorescencia de los protoplastos. El Dr. Pablo Figueroa de la Universidad Santo Tomás ha trabajado con este modelo de transfección de protoplastos de *D. carota*. Él realizó la co-transfección de protoplastos con una construcción reportera que poseía el promotor del gen sensible a jasmonato *JAZ2* dirigiendo la expresión de GUS, y los factores de transcripción MYC2, MYC3 o MYC4 (Niu y col., 2011). Gracias a su ayuda fue posible aumentar la tasa de sobrevivencia y de transfección de protoplastos. Sin embargo, aun así no fue posible obtener resultados favorables en la cuantificación de la fluorescencia de GFP. Si bien era posible que la tasa de transfección obtenida en este trabajo hubiese sido suficiente para observar un cambio en la fluorescencia, y que las secuencias simplemente no estuviesen siendo capaces de unirse y/o activar al promotor de *PSY2*, esto fue descartado mediante un ensayo en el cual se midió la fluorescencia de protoplastos transgénicos antes y después de la adición de ABA. Debido a que se ha demostrado que el promotor *PSY2* de *D. carota* es capaz de responder a ABA (Fuentes, 2011), la adición de esta hormona a la suspensión de protoplastos debería haber activado al promotor *PSY2* y aumentar la transcripción de *GFP*, lo que debería haberse traducido en un aumento de la fluorescencia. Sin embargo, luego de probar varios tratamientos con ABA, no se observó un cambio en la fluorescencia. Esto puede deberse entre otras cosas a que la resolución del sistema de cuantificación de la fluorescencia de GFP utilizado no haya sido suficiente para detectar estos cambios, que la alta fluorescencia basal de los protoplastos generada por el estrés de su obtención y posterior transfección y la gran variabilidad de ésta haya enmascarado la fluorescencia generada por la activación del promotor de *PSY2*, o que los protoplastos no hayan sido capaces de responder a la aplicación exógena de ABA, indicando problemas en la generación de las líneas transgénicas.

A pesar de la baja tasa de transfección obtenida en este trabajo, la observación al microscopio de los protoplastos transfectados con los vectores que portaban las secuencias fusionadas a *RFP* permitió corroborar lo observado en la transformación transitoria de *N. tabacum*. Esto quiere decir que las secuencias de *D. carota* A1, A3, A4, C1, C2 y A13 codifican para proteínas nucleares, mientras que protoplastos transfectados con A12 fusionada a *RFP* nuevamente mostraron fluorescencia en el núcleo y en el citoplasma.

4.6 Ensayos de mono-híbrido en levadura

Debido a que la transfección de protoplastos no nos permitió determinar si los factores de transcripción seleccionadas eran capaces de transactivar al promotor de *PSY2* de *D. carota*, se decidió utilizar el ensayo de mono-híbrido en levadura, otro de los sistemas comúnmente utilizados para detectar la interacción entre proteínas y ADN. Considerando que los factores de transcripción están compuestos principalmente de dos dominios, el dominio de unión a ADN y el dominio de activación de la transcripción, y que se ha descrito que estos dos dominios pueden ser separados, como se demostró con el factor de transcripción *GAL4* (Brent y Ptashne, 1985; Ma y Ptashne, 1988), en este trabajo se utilizó el sistema de mono-híbrido para determinar si las secuencias seleccionadas eran por un lado capaces de unirse a la región promotora del gen *PSY2* de *D. carota* y por otro evaluar la capacidad de transactivación estas secuencias.

4.6.1 Interacción de los factores de transcripción con el promotor de *PSY2*

Para determinar la interacción entre los factores de transcripción y el promotor de *PSY2* se decidió utilizar dos promotores: P1, el cual contiene solo uno de los dos motivos *ABRE* involucrados en la respuesta a *ABA* y demostró no ser capaz de responder a esta hormona, y P2, el cual posee ambos motivos *ABRE* seguidos y es



capaz de responder a ABA (Fuentes, 2011). De esta forma es que se generaron las dos cepas reporteras, en donde P1 y P2 dirigen la expresión del gen de resistencia a Aureobasidin A (AbA). Sin embargo, antes de probar la interacción entre las secuencias seleccionadas y las regiones promotoras de *PSY2* P1 y P2, se determinó la concentración mínima de AbA necesaria para inhibir por completo el crecimiento de las cepas de levadura reporteras generadas debido a que es probable que exista una expresión basal del gen reportero en las cepas que portan estos promotores. De esta forma, se asegura que el crecimiento de las células en placa suplementadas con esa concentración de AbA se deba a la activación de las regiones promotoras de *PSY2* por alguna de las secuencias seleccionadas, y no por el reconocimiento de estas regiones por factores de transcripción endógenos de las cepas reporteras. En este sentido, se determinó que para el caso de las cepas de levadura portadoras del promotor P1 de *PSY2*, la concentración inhibitoria mínima de AbA fue de 500 ng/mL. Esto quiere decir que probablemente existan factores de transcripción endógenos en la cepa Y1HGold que se estén uniendo a la región promotora P1 y que estén activando la transcripción del gen *AUR1-C*, confiriendo la capacidad de crecer a las células en presencia de AbA. Sin embargo, esta transcripción basal no es suficiente para permitir que las células crezcan en 500 ng/mL. Por otro lado, se determinó que la mínima concentración capaz de inhibir por completo el crecimiento de las levaduras portadoras del promotor P2 de *PSY2* fue de 750 ng/mL, indicando que a esta concentración la transcripción basal del gen reportero en esta cepa no es suficiente para permitir que las células crezcan. La diferencia que existe entre las concentraciones necesarias para inhibir el crecimiento de las dos cepas reporteras puede deberse a la diferencia de tamaño de las regiones promotoras clonadas río arriba del gen reportero, ya que el promotor P2 es aproximadamente 350 pb más grande que el promotor P1. Es posible que dentro estas 350 pb existan otras regiones, además de las ya presentes en P1, a las cuales se

puedan estar uniendo otros factores de transcripción endógenos, activando con más fuerza la transcripción del gen reportero, por lo que es necesaria una concentración mayor de AbA para inhibir por completo el crecimiento de las células de levadura.

Al realizar el ensayo de mono-híbrido se observó que la cepa de levadura que portaba la región promotora P2 fue capaz de crecer en medio suplementado con 750 ng/mL de AbA al ser transformada con cualquiera de los factores de transcripción ABRE (A1, A3 y A4) fusionados al dominio de activación de GAL4 (GAL4 AD). Este resultado sugiere que, al menos en levadura, los factores de transcripción A1, A3 y A4 son capaces de unirse al promotor de *PSY2* de *D. carota*, permitiendo que GAL4 AD active la transcripción de *AUR1-C*, confiriendo resistencia a AbA (Figura 25). Del mismo modo, al transformar células de levadura que portan la región promotora P1 con estos factores de transcripción también se observó crecimiento en placas suplementadas con AbA. Los resultados indicarían que la presencia de los tres motivos ABRE juntos permite la unión más fuerte de los factores de transcripción a la región promotora de *PSY2*. Sin embargo, es necesaria la realización de experimentos cuantitativos que permitan comprobar esta observación, ya que los experimentos realizados solo fueron cualitativos.

Por otro lado, nuestros resultados sugieren que los factores de transcripción C1 y C2 no serían capaces de unirse a la región promotora del gen *PSY2*, ya que ninguno de los clones de levadura transformados con vectores que portan estas secuencias fueron capaces de sobrevivir en medio con AbA. Es posible que la incapacidad de C1 y C2 de unirse a la región promotora de *PSY2* se deba a los dominios de unión a ADN presentes en estos factores de transcripción y a las secuencias que son capaces de reconocer. Se ha descrito que C1 y C2 son capaces de unirse de forma secuencia-específica al motivo ABRE presente en el promotor del gen *Dc3* de secuencia

CACGTG. Sin embargo, la mutación de esta secuencia en dos nucleótidos, cambiándola a CATTTG, impide que estas proteínas se unan al promotor de *Dc3* (Guan y col., 2009). De esta forma, los motivos ABRE predichos *in silico* en la región promotora de *PSY2* de *D. carota* que tienen las secuencias TATGTG, CACTTG, CGTGG, no son reconocidos por C1 y C2.

Finalmente, el ensayo de mono-híbrido realizado sugiere que a la región promotora de *PSY2* se estarían uniendo factores de transcripción de tipo Alfin, como lo son Al2 y Al3. Debido a la gran cantidad de sitios de unión para factores de transcripción de tipo Alfin encontrados en el promotor de *PSY2*, se esperaba que no hubiese mucha diferencia entre el crecimiento de las cepas portadoras de la región P1 y las portadoras de la región P2. Nuevamente, debido a que es solo un ensayo cualitativo, es necesaria la realización de más experimentos para determinar cuál de todos los sitios predichos *in silico* es importante para la unión de este tipo de factores de transcripción, o si es necesaria la presencia de una gran cantidad de ellos para generar la unión de estos factores. Sin embargo, se observó que el crecimiento de los clones de cepas reporteras que portan la región promotora P1 es similar al observado en los clones que portan la región promotora P2. Debido a la importancia de los factores de transcripción de tipo Alfin y de los carotenoides en la defensa contra especies reactivas de oxígeno, nuestros resultados sugieren que Al2 y Al3 podrían estar regulando la respuesta ante estrés salino a través de la activación de genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides. Además, los factores de transcripción de tipo Alfin han sido involucrados en el crecimiento y desarrollo de raíces, además de la elongación de pelos radiculares (Winicov, 2000; Chandrika y col., 2013), lo que sugiere que la presencia de sitios de unión para factores de transcripción de tipo Alfin en el

promotor de *PSY2* de *D. carota* permitiría la activación en conjunto de genes que regulen el desarrollo de la raíz y la acumulación de carotenoides.

Si bien estos resultados sugieren fuertemente que los factores de transcripción analizados en este trabajo son capaces de unirse a la región promotora del gen *PSY2* de *D. carota*, no nos indican si efectivamente se están uniendo de forma secuencia-específica a los motivos ABRE o sitios de unión para Alfin encontrados *in silico*. Una posible aproximación para determinar si estas secuencias se están uniendo a los elementos encontrados en el promotor es realizar mutaciones puntuales en estos elementos de respuesta y nuevamente determinar si las cepas de levadura son capaces de sobrevivir en medio suplementado con AbA. Además, aún queda por determinar si lo observado en levadura se repite en planta, y más importante aún si la unión de estas secuencias es biológicamente relevante.

4.6.2 Activación de la transcripción de genes reporteros en levadura por los factores de transcripción

Si bien los resultados sugieren que los factores de transcripción ABRE y Alfin estarían uniéndose a la región promotora del gen *PSY2* de *D. carota*, indicando que poseen el dominio de unión a ADN, y además presentaron alta homología con factores de transcripción que han sido descritos como activadores de la transcripción, fue necesario determinar si estas secuencias poseen el dominio de activación de la transcripción, el cual es importante en la interacción proteína-proteína que conduce a la iniciación directa o indirecta de la transcripción de genes. En este trabajo se utilizó nuevamente un ensayo de mono-híbrido en levadura; sin embargo, esta vez la proteína híbrida se generó fusionando los factores de transcripción al dominio de unión a ADN de GAL4, de tal forma que las proteínas siempre se unirían al promotor que dirige la expresión del gen reportero, pero solo activarán la transcripción si la proteína de

interés posee un dominio de activación de la transcripción. Además, para eliminar posibles falsos positivos, se utilizó la cepa de levadura MaV203, la cual posee los genes reporteros *HIS3*, *URA3* y *lacZ*, los cuales poseen dentro de su región promotora sitios de unión para GAL4.

Si bien este sistema ha sido diseñado originalmente para detectar la unión de proteínas a ADN y que el dominio de activación de GAL4 sea el responsable de la activación de la transcripción de los genes reporteros, en este trabajo se utilizó para determinar si las secuencias seleccionadas poseían dominios de activación capaces de reclutar a la maquinaria de transcripción. En este sentido, C1 y C2 activaron la transcripción de los 3 genes reporteros, lo que se ve reflejado en el crecimiento de las colonias transformadas con estos factores de transcripción en medio SD/-Leu-Ura y SD/-Leu-His, además de la intensa coloración azul que indica la inducción de *lacZ*. Estos resultados avalan el uso de esta aproximación para determinar la capacidad de activar la transcripción de los factores de transcripción seleccionados, ya que C1 y C2 habían sido reportadas como activadoras de la transcripción (Guan y col., 2009).

De todos los factores de transcripción analizados en este trabajo, A1, A3, A12 y A13 demostraron ser capaces de crecer en medio SD/-Leu-Ura y además en medio SD/-Leu-His suplementado con 25 mM de 3AT, indicando que estos factores de transcripción son capaces de activar la transcripción de los genes reporteros *URA3* y *HIS3*, respectivamente, lo que sugiere poseen un dominio de activación de la transcripción funcional. Sin embargo, en comparación con C1 y C2, los factores de transcripción A1, A3, A12 y A13 estarían activando débilmente la transcripción de *lacZ*, lo que se ve reflejado en la débil coloración azul, sobre todo de A12, al ensayar la actividad enzimática de β -galactosidasa. Si bien el ensayo de la activación del gen reportero *lacZ* sugiere que A1, A3, A12 y A13 serían proteínas capaces de activar por sí

solas débilmente la transcripción en comparación con C1 y C2, es necesario realizar ensayos más sensibles para determinar la fuerza con la que son capaces de activar la transcripción, como un ensayo cuantitativo para la actividad de β -galactosidasa en cultivo líquido.

Sin embargo, si bien A4 también es capaz de crecer en medio SD/-Leu-Ura y SD/-Leu-His suplementado con 25 mM de 3AT, su crecimiento se ve mucho más limitado que otros clones. Además, para el ensayo de X-gal las colonias transformadas con vectores que portan la secuencia de A4 son prácticamente de color blanco, indicando que A4 por sí solo no sería capaz de activar la transcripción de *lacZ*. Interesantemente, el análisis de los dominios conservados para estas secuencias indica que si bien A4 posee dentro del dominio bZIP el motivo estructural de unión a ADN al igual que las demás secuencias ABRE, lo que explicaría su capacidad de unirse a ADN, A4 es la única secuencia que no posee el motivo responsable de la dimerización. Como se mencionó anteriormente, el dominio bZIP comprende una α -hélice bipartita, en donde la región N-terminal está compuesta de aminoácidos básico capaces de interactuar con el surco mayor del ADN de forma secuencias-específica, mientras que la mitad C-terminal una α -hélice anfipática que permite la dimerización con otro dominio bZIP, denominada cremallera de leucina (Vinson y col., 2006; Llorca y col., 2014). Además de su papel en el reconocimiento del ADN, cada monómero es capaz de contribuir individualmente en la capacidad de la transactivación de los factores de transcripción bZIP (Miotto y Struhl, 2006). Mientras algunos bZIP poseen dominios especiales que actúan como transactivadores, como el dominio rico en prolina encontrado en los factores de transcripción bZIP del grupo G (Shen y col., 2008), como lo es C1, otros necesitan de la presencia de elementos adicionales, como co-activadores (Rochon y col., 2006) o histona deacetilasas (Kuo y col., 2000).

Además, la capacidad de transactivar de un factor de transcripción bZIP puede ser modificada mediante la interacción con otras proteínas (Andronis y col., 2008; Gangappa y col., 2013). Esta característica de los factores de transcripción bZIP indica que la formación y la composición de dímeros determina el resultado de la expresión del gen blanco (Llorca y col., 2014). En este sentido, la ausencia del motivo responsable de la dimerización en A4 impediría la formación de dímeros de esta proteína, o al menos la formación de dímeros lo suficientemente estables como para activar eficientemente la transcripción de los genes reporteros.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo son:

- Se identificaron *in silico* 5 secuencias en *D. carota* con homología a factores de transcripción de la familia AREB/ABF y 3 con homología a factores de transcripción de tipo Alfin.
- Los ensayos de localización subcelular sugieren que en *D. carota* las secuencias ABRE1, ABRE3, ABRE4 y Alfin3 codifican para proteínas que se encuentran localizadas en el núcleo, mientras que el producto de la transcripción de la secuencia Alfin2 se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma.
- Mediante el sistema de mono-híbrido en levadura se determinó los factores de transcripción ABRE1, ABRE3, ABRE4, Alfin2 y Alfin3 interactúan con el promotor del gen *PSY2* de *D. carota*, mientras que CAREB1 y CAREB2 no lo hacen.
- Todos los factores de transcripción analizados en este trabajo son capaces de activar la transcripción de genes reporteros en levadura, indicando que son funcionales como factores de transcripción.
- Se identificaron en *D. carota* factores de transcripción pertenecientes a la familia de proteínas AREB/ABF y Alfin capaces de transactivar al promotor del gen *PSY2* de *D. carota*, validando la hipótesis planteada inicialmente.

REFERENCIAS

- Andronis C, Barak S, Knowles SM, Sugano S, Tobin EM (2008)** The clock protein CCA1 and the bZIP transcription factor HY5 physically interact to regulate gene expression in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **1**: 58-67
- Audran C, Borel C, Frey A, Sotta B, Meyer C, Simonneau T, Marion-Poll A (1998)** Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol* **118**: 1021-1028
- Auldridge ME, McCarty DR, Klee HJ (2006)** Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 315-321
- Bastola DR, Pethe VV, Winicov I (1998)** Alfin1, a novel zinc-finger protein in alfalfa roots that binds to promoter elements in the salt-inducible MsPRP2 gene. *Plant Mol Biol* **38**: 1123-1135
- Bensmihen S, Giraudat J, Parcy F (2005)** Characterization of three homologous basic leucine zipper transcription factors (bZIP) of the ABI5 family during *Arabidopsis thaliana* embryo maturation. *J Exp Bot* **56**: 597-603
- Bensmihen S, Rippa S, Lambert G, Jublot D, Pautot V, Granier F, Giraudat J, Parcy F (2002)** The homologous ABI5 and EEL transcription factors function antagonistically to fine-tune gene expression during late embryogenesis. *Plant Cell* **14**: 1391-1403
- Bienz M (2006)** The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem Sci* **31**: 35-40
- Bollag W (1996)** The retinoid revolution. Overview. *FASEB J* **10**: 938-939
- Botella-Pavia P, Besumbes O, Phillips MA, Carretero-Paulet L, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M (2004)** Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J* **40**: 188-199
- Brent R, Ptashne M (1985)** A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* **43**: 729-736
- Busk PK, Pages M (1998)** Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* **37**: 425-435
- Cazzonelli CI, Cuttriss AJ, Cossetto SB, Pye W, Crisp P, Whelan J, Finnegan EJ, Turnbull C, Pogson BJ (2009)** Regulation of carotenoid composition and shoot branching in *Arabidopsis* by a chromatin modifying histone methyltransferase, SDG8. *Plant Cell* **21**: 39-53
- Cazzonelli CI, Pogson BJ (2010)** Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* **15**: 266-274
- Cunningham FX, Gantt E (1998)** Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 557-583
- Chandrika NN, Sundaravelpandian K, Yu SM, Schmidt W (2013)** ALFIN-LIKE 6 is involved in root hair elongation during phosphate deficiency in *Arabidopsis*. *New Phytol* **198**: 709-720
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY (2000)** ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* **275**: 1723-1730
- Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC (2005)** Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnol Adv* **23**: 131-171
- Davison PA, Hunter CN, Horton P (2002)** Overexpression of beta-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature* **418**: 203-206
- Demmig-Adams B, Adams WW, 3rd (2006)** Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol* **172**: 11-21
- Demmig-Adams B, Gilmore AM, Adams WW, 3rd (1996)** Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *FASEB J* **10**: 403-412
- Depeiges A, Degroote F, Espagnol MC, Picard G (2006)** Translation initiation by non-AUG codons in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants. *Plant Cell Rep* **25**: 55-61

- Deruere J, Romer S, d'Harlingue A, Backhaus RA, Kuntz M, Camara B (1994)** Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *Plant Cell* **6**: 119-133
- Fedoroff NV (2002)** Cross-talk in abscisic acid signaling. *Sci STKE* **2002**: re10
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD (2002)** Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14 Suppl**: S15-45
- Fraser PD, Bramley PM (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 (2011)** Identificación y análisis estructural y funcional de los promotores de los genes carotenogénicos *psy2* y *lcyb1* de *Daucus carota*. Tesis de Magister. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Fuentes P, Pizarro L, Moreno JC, Handford M, Rodriguez-Concepcion M, Stange C (2012)** Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Mol Biol* **79**: 47-59
- Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2005)** AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 3470-3488
- Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011)** ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J Plant Res* **124**: 509-525
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006)** Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1988-1993
- Gangappa SN, Crocco CD, Johansson H, Datta S, Hettiarachchi C, Holm M, Botto JF (2013)** The *Arabidopsis* B-BOX protein BBX25 interacts with HY5, negatively regulating BBX22 expression to suppress seedling photomorphogenesis. *Plant Cell* **25**: 1243-1257
- Giorio G, Stigliani AL, 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
- Giorio G, Stigliani AL, D'Ambrosio C (2008)** Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) - new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *FEBS J* **275**: 527-535
- Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, Beyer P, Taylor MA (2008)** Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol* **26**: 139-145
- Gomez-Porras JL, Riano-Pachon DM, Dreyer I, Mayer JE, 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
- Gordon K, Futterer J, Hohn T (1992)** Efficient initiation of translation at non-AUG triplets in plant cells. *The Plant Journal* **2**: 809-813
- Grotewold E (2006)** The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 761-780
- Guan Y, Ren H, Xie H, Ma Z, Chen F (2009)** Identification and characterization of bZIP-type transcription factors involved in carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis. *Plant J* **60**: 207-217
- Guilinan M, Marcotte W, Quatrano R (1990)** A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* **250**: 267-271
- Hattori T, Totsuka M, Hobo T, Kagaya Y, Yamamoto-Toyoda A (2002)** Experimentally Determined Sequence Requirement of ACGT-Containing Abscisic Acid Response Element. *Plant and Cell Physiology* **43**: 136-140
- Hedtke B, Legen J, Weihe A, Herrmann RG, Borner T (2002)** Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*. *Plant J* **30**: 625-637
- Himmelbach A, Yang Y, Grill E (2003)** Relay and control of abscisic acid signaling. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 470-479

- Hobo T, Asada M, Kowyama Y, Hattori T (1999) ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *Plant J* **19**: 679-689
- Iorizzo M, Senalik DA, Grzebelus D, Bowman M, Cavagnaro PF, Matvienko M, Ashrafi H, Van Deynze A, Simon PW (2011) De novo assembly and characterization of the carrot transcriptome reveals novel genes, new markers, and genetic diversity. *BMC Genomics* **12**: 389
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* **27**: 325-333
- Iuchi S, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000) A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiol* **123**: 553-562
- Jin J, Zhang H, Kong L, Gao G, Luo J (2014) PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucleic Acids Research* **42**: D1182-D1187
- Kang JY, Choi HI, Im MY, Kim SY (2002) *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* **14**: 343-357
- Kayum MA, Park JI, Ahmed NU, Jung HJ, Saha G, Kang JG, Nou IS (2015) Characterization and stress-induced expression analysis of Alfin-like transcription factors in *Brassica rapa*. *Mol Genet Genomics*
- Kim JB, Kang JY, Kim SY (2004a) Over-expression of a transcription factor regulating ABA-responsive gene expression confers multiple stress tolerance. *Plant Biotechnol J* **2**: 459-466
- Kim S, Kang JY, Cho DI, Park JH, Kim SY (2004c) ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant J* **40**: 75-87
- Kim SY (2006) The role of ABF family bZIP class transcription factors in stress response. *Physiologia Plantarum* **126**: 519-527
- Kim SY, Ma J, Perret P, Li Z, Thomas TL (2002) *Arabidopsis* ABI5 subfamily members have distinct DNA-binding and transcriptional activities. *Plant Physiol* **130**: 688-697
- Kobayashi Y, Dokiya Y, Kumazawa Y, Sugita M (2002) Non-AUG translation initiation of mRNA encoding plastid-targeted phage-type RNA polymerase in *Nicotiana glauca*. *Biochem Biophys Res Commun* **299**: 57-61
- Krinsky NI, Johnson EJ (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* **26**: 459-516
- Kuo MH, vom Baur E, Struhl K, Allis CD (2000) Gcn4 activator targets Gcn5 histone acetyltransferase to specific promoters independently of transcription. *Mol Cell* **6**: 1309-1320
- Lao YM, Xiao L, Ye ZW, Jiang JG, Zhou SS (2011) In silico analysis of phytoene synthase and its promoter reveals hints for regulation mechanisms of carotenogenesis in *Dunaliella bardawil*. *Bioinformatics* **27**: 2201-2208
- Lee WY, Lee D, Chung WI, Kwon CS (2009) *Arabidopsis* ING and Alfin1-like protein families localize to the nucleus and bind to H3K4me3/2 via plant homeodomain fingers. *Plant J* **58**: 511-524
- Leung J, Giraudat J (1998) Abscisic Acid Signal Transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 199-222
- Li F, Tsfadia O, Wurtzel ET (2009) The phytoene synthase gene family in the Grasses: subfunctionalization provides tissue-specific control of carotenogenesis. *Plant Signal Behav* **4**: 208-211
- Li F, Vallabhaneni R, Wurtzel ET (2008) PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiol* **146**: 1333-1345
- Liu ZB, Ulmasov T, Shi X, Hagen G, Guilfoyle TJ (1994) Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements. *Plant Cell* **6**: 645-657

- Lopez-Molina L, Chua NH (2000)** A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **41**: 541-547
- Lu S, Li L (2008)** Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *J Integr Plant Biol* **50**: 778-785
- Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ (1991)** High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**: 1-6
- Llorca CM, Potschin M, Zentgraf U (2014)** bZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. *Front Plant Sci* **5**: 169
- Ma J, Ptashne M (1988)** Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* **55**: 443-446
- Maass D, Arango J, Wust F, Beyer P, Welsch R (2009)** Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS One* **4**: e6373
- Marcotte WR, Jr., Russell SH, Quatrano RS (1989)** Abscisic acid-responsive sequences from the *em* gene of wheat. *Plant Cell* **1**: 969-976
- Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Bryant SH (2014)** CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*
- Menkens AE, Schindler U, Cashmore AR (1995)** The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem Sci* **20**: 506-510
- Milborrow BV (2001)** The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J Exp Bot* **52**: 1145-1164
- Miller M (2009)** The importance of being flexible: the case of basic region leucine zipper transcriptional regulators. *Curr Protein Pept Sci* **10**: 244-269
- Miller M, Shuman JD, Sebastian T, Dauter Z, Johnson PF (2003)** Structural basis for DNA recognition by the basic region leucine zipper transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* **278**: 15178-15184
- Miotto B, Struhl K (2006)** Differential gene regulation by selective association of transcriptional coactivators and bZIP DNA-binding domains. *Mol Cell Biol* **26**: 5969-5982
- Moscatiello R, Baldan B, Navazio L (2013)** Plant cell suspension cultures. *Methods Mol Biol* **953**: 77-93
- Mundy J, Yamaguchi-Shinozaki K, Chua NH (1990)** Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice *rab* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 1406-1410
- Nambara E, Marion-Poll A (2005)** Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 165-185
- Niu Y, Figueroa P, Browse J (2011)** Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **62**: 2143-2154
- Niyogi KK (1999)** PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 333-359
- Ouwerkerk PBF, Meijer AH (2001)** Yeast One-Hybrid Screening for DNA-Protein Interactions. *In* *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Pizarro L, Stange C (2009)** Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia e investigación agraria* **36**: 143-162
- Qin X, Coku A, Inoue K, Tian L (2011)** Expression, subcellular localization, and cis-regulatory structure of duplicated phytoene synthase genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Planta* **234**: 737-748
- Reece-Hoyes JS, Marian Walhout AJ (2012)** Yeast one-hybrid assays: a historical and technical perspective. *Methods* **57**: 441-447
- Riechmann JL, Ito T, Meyerowitz EM (1999)** Non-AUG initiation of AGAMOUS mRNA translation in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Biol* **19**: 8505-8512

- Rochon A, Boyle P, Wignes T, Fobert PR, Despres C (2006)** The coactivator function of Arabidopsis NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell* **18**: 3670-3685
- Rodriguez-Concepcion M (2010)** Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Arch Biochem Biophys* **504**: 118-122
- Rodriguez-Villalon A, Gas E, Rodriguez-Concepcion M (2009)** Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown Arabidopsis seedlings. *Plant J* **60**: 424-435
- Ruiz-Sola MA, Arbona V, Gomez-Cadenas A, Rodriguez-Concepcion M, Rodriguez-Villalon A (2014)** A root specific induction of carotenoid biosynthesis contributes to ABA production upon salt stress in arabidopsis. *PLoS One* **9**: e90765
- Ruiz-Sola MA, Rodriguez-Concepcion M (2012)** Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. *Arabidopsis Book* **10**: e0158
- Ruyter-Spira C, Al-Babili S, van der Krol S, Bouwmeester H (2013)** The biology of strigolactones. *Trends Plant Sci* **18**: 72-83
- Schumacher MA, Goodman RH, Brennan RG (2000)** The structure of a CREB bZIP.somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding. *J Biol Chem* **275**: 35242-35247
- Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JA, McCarty DR (1997)** Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* **276**: 1872-1874
- Seo M, Koshida T (2002)** Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* **7**: 41-48
- Shen H, Cao K, Wang X (2008)** AtbZIP16 and AtbZIP68, two new members of GBFs, can interact with other G group bZIPs in Arabidopsis thaliana. *BMB Rep* **41**: 132-138
- Shen Q, Zhang P, Ho TH (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**: 1107-1119
- Shiota H, Satoh R, Watabe K, Harada H, Kamada H (1998)** C-ABI3, the carrot homologue of the Arabidopsis ABI3, is expressed during both zygotic and somatic embryogenesis and functions in the regulation of embryo-specific ABA-inducible genes. *Plant Cell Physiol* **39**: 1184-1193
- Song Y, Gao J, Yang F, Kua CS, Liu J, Cannon CH (2013)** Molecular evolutionary analysis of the Alfin-like protein family in Arabidopsis lyrata, Arabidopsis thaliana, and Thellungiella halophila. *PLoS One* **8**: e66838
- Thompson AJ, Jackson AC, Parker RA, Morpeth DR, Burbidge A, Taylor IB (2000)** 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 AJ, Mulholland BJ, Jackson AC, McKee JM, Hilton HW, Symonds RC, Sonneveld T, Burbidge A, Stevenson P, Taylor IB (2007)** Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots. *Plant Cell Environ* **30**: 67-78
- Tiwari S, Wang S, Hagen G, Guilfoyle TJ (2006)** Transfection assays with protoplasts containing integrated reporter genes. *Methods Mol Biol* **323**: 237-244
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Rodriguez-Concepcion M (2010)** Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 11626-11631
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, 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 U S A* **97**: 11632-11637
- Vidal M, Brachmann RK, Fattaey A, Harlow E, Boeke JD (1996)** Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 10315-10320
- Vinson C, Acharya A, Taparowsky EJ (2006)** Deciphering B-ZIP transcription factor interactions in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* **1759**: 4-12

- Vishnevetsky M, Ovadis M, Vainstein A (1999)** Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci* **4**: 232-235
- Vivekananda J, Drew MC, Thomas TL (1992)** Hormonal and Environmental Regulation of the Carrot *lea*-Class Gene *Dc3*. *Plant Physiol* **100**: 576-581
- Welsch R, Maass D, Voegel T, Dellapenna D, Beyer P (2007)** Transcription factor *RAP2.2* and its interacting partner *SINAT2*: stable elements in the carotenogenesis of *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* **145**: 1073-1085
- Welsch R, Medina J, Giuliano G, Beyer P, Von Lintig J (2003)** Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**: 523-534
- Welsch R, Wust F, Bar C, Al-Babili S, Beyer P (2008)** A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiol* **147**: 367-380
- Winicov I (1993)** cDNA encoding putative zinc finger motifs from salt-tolerant alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells. *Plant Physiol* **102**: 681-682
- Winicov I (2000)** *Alfin1* transcription factor overexpression enhances plant root growth under normal and saline conditions and improves salt tolerance in alfalfa. *Planta* **210**: 416-422
- Winicov I, Bastola DR (1999)** Transgenic overexpression of the transcription factor *alfin1* enhances expression of the endogenous *MsPRP2* gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants. *Plant Physiol* **120**: 473-480
- Xiao FG, Shen L, Ji HF (2011)** On photoprotective mechanisms of carotenoids in light harvesting complex. *Biochem Biophys Res Commun* **414**: 1-4
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2005)** Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci* **10**: 88-94
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010)** *AREB1*, *AREB2*, and *ABF3* are master transcription factors that cooperatively regulate *ABRE*-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J* **61**: 672-685
- Zeevaart JAD, Creelman RA (1988)** Metabolism and Physiology of Abscisic Acid. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **39**: 439-473

ANEXO

Tabla A. Programas PCR

1. PCR convencional

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
Denaturación Inicial	94	4min.	1
Denaturación	94	45seg.	32
Hibridación	Tm-5	30seg.	
Extensión	68	1min/kb	
Extensión Final	68	10min.	1

2. PCR convencional utilizando la enzima *Pfu* ADN polimerasa

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
Denaturación Inicial	95	4min.	1
Denaturación	95	30seg.	32
Hibridación	Tm-5	30seg.	
Extensión	72	2min/kb	
Extensión Final	72	10min.	1

3. RT-PCR

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