

UCH-FC
MAG-B
C 413
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

“Caracterización fisiológica y molecular de plantas de *Nicotiana tabacum* que expresan el gen *Lcyb1* de *Daucus carota*.”

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

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

Por

Ariel Patricio Cerda Rojas

Directora de Tesis: Dra. Claudia Stange K.

Co-Director de Tesis: Dr. Michael Handford

Agosto 2015

Santiago, Chile

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER**

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

Ariel Patricio Cerda Rojas

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 de Tesis rendido el 19 de Agosto del 2015.

Director de Tesis

Dra. Claudia Renate Stange Klein



Codirector de Tesis

Dr. Michael Handford

Comisión de evaluación de la Tesis

Dra. Jennifer Alcaíno

Dra. Lee Meisel



Nací un día 7 de Enero de 1988. En esta sección se supone que tengo que dar una reseña de lo que ha sido mi vida hasta el día de hoy, dar un resumen que de cuenta de quién soy y como llegue aquí.

¿Quién soy? Soy una persona que aún no ha perdido el asombro. Soy un curioso empedernido que vorazmente intenta saciar su ignorancia (y ojala nunca lo haga). Un testigo privilegiado de pequeñas cosas que nadie antes ha observado. Pero por sobre todo una de las pocas personas afortunadas que puede decir: Amo lo que hago!.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer en primera instancia a todas las personas que han sido parte del Team CSK durante mi estadía en el lab. A la Profe Claudia por su paciencia, guía y su apoyo incondicional (sobre todo en mi dispersa e intranquila curiosidad).

A los gigantisisisimos amigos que ahí encontré, principalmente a Talo, Kevin, Tito, Hita, Dani, Luisfe, Romi, Chilo, Mati, Koke y Pauli.

A los 3 grandes profes que también integran ese genial lab CBMV, los profes Mike, Lili y Lore. Por sus consejos y su crítica constructiva, que siempre ayudaron a sacar lo mejor de mí.

A la Ange y Seba, por ser componentes importantes de ese grupo humano. Y por ayudarme mucho más de lo que laboralmente les correspondía.

A los infaltables componentes del mítico Club de Tobi, que misteriosamente aparecen al más mínimo susurro de invocación maquiavélica (~~por no decir alcohólica~~). Los quiero a todos: Matijandro, Talojandro, Rolojandro, Juanjojandro, Joelojandro, Alioskajandro y si, tu también Jocyjandra (eres una más).

A mis hermanos de la vida con los cuales no comparto ni una pizca de material genético (eso espero, sería terrible!). A Nicolo (y a su Cristiano Ronaldo también), Javier, Moira, Felipe, Boris, Katy, Marlene, Marcelo, Pablo, Marcos y Carla. A mi gata Amice!

A Paula, porque haber sido una persona de fundamental apoyo durante los momentos más difíciles (y también los más lindos). Por aun brindarme su cariño y confianza. Y por haberme dado de la oportunidad de ser padre.

A toda mi familia, por ser los principales gestores de lo que hoy soy y por compartir su experiencia para poder dar pasos más firmes. Abuelos, tíos y primos, los amo.

A mis viejos, Pato y Rossana. Por su apoyo incondicional y por confiar en mí, mucho más que yo mismo. Por soportar mis mañas y por promover mis pasiones.

A mis hermanas, Kamilonga y Nandi. Por todo su cariño y su complicidad. Probablemente sean de las pocas personas que me conocen tal cual soy. Las adoro!

A mi guatón Rena, por ser lo más bello de mi vida. Mi inspiración y motivación. Y por ser indudablemente lo que en sueños siempre deseé.

A todos aquellos que se dedicaron a mantener vivo el fuego de mi sonrisa y gileza.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Carotenoides: Estructura y función.	11
1.2 Biosíntesis de carotenoides en plantas.....	14
1.3 Regulación de la biosíntesis de carotenoides en plantas.	17
1.4 El gen <i>Lcyb</i> en la ruta de biosíntesis de los carotenoides.	20
1.5 Estudio de la funcionalidad de <i>Lcyb1</i> de <i>D.carota</i>	22
1.6 Relación entre la ruta de biosíntesis de carotenoides, clorofilas y giberelinas en plantas	24
1.7 Hipótesis.....	28
1.8 Objetivo general.....	28
1.9 Objetivos específicos.....	28
MATERIALES Y METODOS	29
2.1 Materiales biológicos.	29
2.2 Reactivos.	30
2.3 Partidores.....	30
2.4 Metodología.....	32
2.4.1 Análisis de parámetros fisiológicos.....	33
2.4.2 Extracción de ARN total de tejidos de tabaco.....	35
2.4.3 Cuantificación y análisis de la calidad del ARN total.....	35
2.4.4 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	36
2.4.5 Síntesis y análisis del ADNc de <i>N. tabacum</i>	37
2.4.6 PCR cuantitativo en tiempo real.	39
2.4.7 Determinación de la concentración de clorofila y carotenoides.	41
2.4.8 Determinación del efecto de giberelinas en las plantas transgénicas.....	44
RESULTADOS.....	46
3.1 Expresión de <i>DcLcyb1</i> y composición de carotenoides en las líneas T ₁ de <i>N. tabacum</i> transgénicas.	46
3.1.1 Evaluación de la expresión del gen <i>DcLcyb1</i> en las líneas transgénicas de <i>N. tabacum</i>	46

3.1.2 Determinación del contenido de clorofila y carotenoides en las líneas transgénicas de <i>N. tabacum</i>	47
3.2 Evaluación de parámetros fisiológicos de <i>N. tabacum</i> transformados con la construcción pGWB2/ <i>DcLcyb1</i>	50
3.2.1 Medición del crecimiento de las líneas transgénicas.	50
3.2.2 Medición de la biomasa de las plantas transgénicas.....	53
3.2.3 Medición de eficiencia fotosintética.....	54
3.3 Evaluación de la expresión de genes carotenogénicos y otros genes endógenos relacionados a la ruta.....	55
3.4 Evaluación del efecto de giberelinas en las plantas transgénicas.	61
3.4.1 Ensayo de inhibición de la síntesis de giberelinas.	61
3.4.2 Cuantificación del contenido de giberelinas bioactivas.....	65
DISCUSIÓN.....	67
4.1 Las líneas transgénicas de <i>N. tabacum</i> que expresan el gen <i>DcLcyb1</i> poseen un incremento en el contenido de carotenoides que correlaciona con una inducción en genes carotenogénicos endógenos.....	67
4.2 Las líneas transgénicas de <i>N. tabacum</i> que expresan el gen <i>DcLcyb1</i> poseen un incremento en el contenido de clorofila lo que correlación con un aumento en la eficiencia fotosintética.	70
4.3 Las líneas transgénicas de <i>N. tabacum</i> poseen un incremento en parámetros de crecimiento y biomasa.....	73
4.4 Las líneas transgénicas de <i>N. tabacum</i> que poseen un incremento en su fitness y biomasa poseen un mayor contenido de giberelinas.	74
4.5 La expresión heteróloga de <i>DcLcyb1</i> en <i>N. tabacum</i> promueve la inducción de genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides, clorofilas y giberelinas.	78
CONCLUSIONES.....	82
ANEXOS	83
REFERENCIAS.....	86

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas.	15
Figura 2 Niveles de pigmentos en plantas de tabaco transgénicas para el gen <i>DcLcyb1</i>	24
Figura 3 Espectro de absorción de los pigmentos clorofila <i>a, b</i> y carotenoides.	43
Figura 4 Niveles de expresión de <i>DcLcyb1</i> en las líneas transgénicas de tabaco.	47
Figura 5 Concentración de pigmentos en las líneas transgénicas de <i>N. tabacum</i>	49
Figura 6 Diferencias entre los parámetros de crecimiento entre líneas transgénicas T1 de tabaco portadoras del gen <i>Lcyb1</i> de <i>D. carota</i> y planta control S/l.	52
Figura 7 Niveles de expresión de los genes carotenogénicos claves en las líneas transgénicas de tabaco.	58
Figura 8 Niveles de expresión de genes clave en la biosíntesis de clorofila, giberelinas, ABA y precursores comunes a estas rutas.	60
Figura 9 Ensayo de inhibición de la biosíntesis de giberelinas en plantas de 21 días.	62
Figura 10 Ensayo de inhibición de la biosíntesis de giberelinas en plantas de 1 mes.	64
Figura 11 Concentración de giberelinas bioactivas en las plantas transgénicas de <i>N. tabacum</i>	65
Figura A1 Concentración de pigmentos de clorofila en las líneas transgénicas de <i>N. tabacum</i>	83
Figura A2 Concentración de ácido abscísico en las plantas transgénicas de <i>N. tabacum</i>	85
Figura A3 Porcentajes de disminución de los parámetros evaluados en los ensayos de inhibición.....	86

INDICE DE TABLAS

Tabla I Partidores utilizados en esta Tesis.....	31
Tabla II Programas de PCR utilizadas en esta Tesis.	40
Tabla III Cuantificación de los parámetros de crecimiento de las líneas de tabaco T ₁ transgénicas que presentan el gen <i>Lcyb1</i> de <i>D. carota</i>	51
Tabla IV Comparación de los parámetros reproductivos entre plantas de tabaco T ₁ que portan el vector pGWB2 sin inserto y las líneas transgénicas con el gen <i>DcLcyb1</i>	53
Tabla V Comparación de la biomasa entre la generación T ₁ de plantas transformadas con el vector sin inserto y plantas transgénicas portadoras del gen <i>DcLcyb1</i>	54
Tabla VI Comparación de la eficiencia fotosintética entre plantas de tabaco T ₁ que portan el vector pGWB2 sin inserto y las líneas transgénicas con el gen <i>DcLcyb1</i>	55
Tabla IA Comparación de los parámetros vegetativos y reproductivos entre plantas de tabaco T ₂ que portan el vector pGWB2 sin inserto y las líneas transgénicas con el gen <i>DcLcyb1</i>	84
Tabla IIA Comparación de la Biomasa entre la generación T ₂ de plantas transformadas con el vector sin inserto y plantas transgénicas portadoras del gen <i>DcLcyb1</i>	84

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABA : Ácido abscísico
- AND : Ácido desoxirribonucleico
- ADNc : Ácido desoxirribonucleico complementario
- ARN : Ácido ribonucleico
- ARNm : Ácido ribonucleico mensajero
- dNTP : Desoxinucleótido trifosfato
- GA : Ácido giberélico
- Gas : Giberelinas
- Kb : Kilobase
- LCYB : Licopeno β -ciclasa
- MS : Murashige y Skoog
- pb : Pares de bases
- PCR : Reacción en cadena de la Polimerasa
- qPCR : PCR cuantitativo o en tiempo real
- RP-HPLC : Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
- S/I : Sin inserto
- UPLC : Cromatografía líquida de ultra resolución

RESUMEN

Los carotenoides son compuestos presentes en todas las plantas y algunas bacterias, hongos y algas. En plantas estos se localizan en plastidios y poseen un rol crítico en los complejos cosechadores de luz, fotoprotección y biosíntesis de fitohormonas. También, han sido reconocidos como nutrientes necesarios en la dieta humana debido a que son precursores de la vitamina A y poseen un alto poder antioxidante. Los carotenoides son sintetizados a partir de geranyl-geranyl-pirofosfato (GGPP), precursor metabólico utilizado también para la biosíntesis de clorofilas y giberelinas. Uno de los puntos clave en la ruta de síntesis de carotenoides es la síntesis de β -caroteno a partir de licopeno, reacción catalizada por la enzima licopeno β -ciclase (LCYB). En *D. carota* (zanahoria) se han descrito dos genes parálogos (*Lcyb1* y *Lcyb2*) que codifican esta enzima, de los cuales *Lcyb1* participa en la síntesis de carotenoides en todos los tejidos de la planta, a pesar de su expresión preferencial en hojas. En este trabajo se muestra que la expresión heteróloga del gen *Lcyb1* de *D. carota* (*DcLcyb1*) en *N. tabacum* provoca un aumento de aproximadamente 2 veces en el contenido total de carotenoides, β -caroteno y clorofilas. En conjunto con este aumento se observó un aumento de la eficiencia fotosintética en todas las líneas transgénicas analizadas. Por otro lado, y contrario a reportes anteriores, la expresión de *DcLcyb1* produjo un aumento en el contenido de la giberelina GA4. El aumento de esta giberelina bioactiva se correlacionó con un aumento en la altura, área foliar, biomasa y un adelanto en la floración de las líneas transgénicas. A nivel molecular, se encontró que la expresión del gen *DcLcyb1* aumentó significativamente la expresión de genes endógenos claves de la ruta de síntesis de carotenoides (*Psy1*, *Psy2* y *Lcyb*), clorofilas (*Chl*) y giberelinas (*Cps* y *Ks*). Interesantemente, también se observó una inducción de genes involucrados en la

síntesis de precursores metabólicos comunes a estas tres rutas (*Dxs2* y *Ggps*). Todos estos antecedentes sugieren que la expresión heteróloga de gen *DcLcyb1* en *N. tabacum* genera una retroalimentación positiva que afecta la expresión de genes involucrados en la síntesis de precursores isoprenoides y en la síntesis de carotenoides, clorofilas y giberelinas, lo que se traduce finalmente en un incremento de parámetros asociados al crecimiento (vegetativo y reproductivo), eficiencia fotosintética y composición de pigmentos (clorofila y carotenoides).

ABSTRACT

Carotenoids are compounds present in plants, some bacteria, fungi, and algae. Plant carotenoids are located in plastids, playing a critical role in light harvesting, photoprotection and phytohormones biosynthesis. Also, these pigments have been recognized as necessary nutrients, acting as vitamin-A precursors and antioxidants in humans. Carotenoids are synthesized from geranyl-geranyl pyrophosphate (GGPP), metabolic precursor which is also used for the biosynthesis of chlorophylls and gibberellins. One of the key points in the carotenoid pathway is the synthesis of β -carotene from lycopene, a reaction catalyzed by the enzyme lycopene β -cyclase (LCYB). In *D.carota* (carrot) two paralog genes (*Lcyb1* and *Lcyb2*) that encode this enzyme have been described. In particular, *Lcyb1* participates in carotenoid biosynthesis in all tissues of the plant despite its preferential expression in leaves. This work shows that the carrot *Lcyb1* (*DcLcyb1*) heterologous gene expression in *N.tabacum* causes an increase of approximately 2-folds in total carotenoids, β -carotene and chlorophyll. Also increased photosynthetic efficiency was observed in all transgenic lines tested. Furthermore, and contrary to previous reports, *DcLcyb1* expression resulted in a significant increase in the bioactive GA4 gibberellin content. This was correlated with an increase in height, leaf area, biomass and early flowering phenotype in transgenic lines. At the molecular level, *DcLcyb1* expression significantly increased the endogenous expression of key carotenogenic genes (*NtPsy1*, *NtPsy2* and *NtLcyb*), chlorophyll (*NtChl*) and gibberellins (*NtCps* and *NtKs*). Interestingly, induction of *NtDxs2* and *NtGgps*, genes involved in the synthesis of the common metabolic precursor of these three routes, was also observed. All these results suggest that *DcLcyb1* heterologous gene expression in *N.tabacum* generates a positive feedback that affects the expression of genes involved in isoprenoid precursors synthesis as well as in carotenoid, chlorophyll and gibberellin pathways, which

finally results in an increase in parameters associated with vegetative and reproductive growth, photosynthetic efficiency and pigment composition (chlorophyll and carotenoids).

INTRODUCCIÓN

1.1 Carotenoides: Estructura y función.

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides de naturaleza lipofílica que son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos (plantas, algas y cianobacterias) y algunas bacterias y hongos no fotosintéticos (Walter y Strack, 2011). Su estructura consta de 8 unidades isoprenicas unidas en sus extremos, constituyendo en su mayoría polienos de 40 carbonos. Ésta determina la existencia de un sistema de dobles enlaces conjugados que les confieren la propiedad de actuar como cromóforos, vale decir, moléculas capaces de absorber luz y generar color.

Respecto a su abundancia, corresponden al segundo grupo de pigmentos más abundantes en la naturaleza y en la actualidad se han descrito más de 700 carotenoides distintos (Giorio y col., 2007). Dentro de ellos se distinguen dos grandes grupos: aquellos constituidos solo por átomos de carbono e hidrogeno denominados carotenos y aquellos que poseen adicionalmente átomos de oxígeno en su esqueleto hidrocarbonado, denominados xantófilas (Bhosale y Bernstein, 2005).

En plantas y algas, los carotenoides son sintetizados y acumulados al interior de plastidios, principalmente en cloroplastos y cromoplastos (Cunningham y Gantt, 1998). En los cloroplastos, los carotenoides en conjunto con clorofilas, se localizan en las membranas tilacoidales y constituyen componentes esenciales de la maquinaria fotosintética, donde están involucrados en el ensamblaje de los fotosistemas y juegan un papel importante en la captación de la luz (Howitt y Pogson, 2006). Por otro lado, estos pigmentos también pueden ser localizados en cuerpos lipídicos o estructuras cristalinas ubicadas al interior de cromoplastos presentes en flores, frutas y raíces

modificadas (Howitt y Pogson, 2006; Ampomah-Dwamena y col., 2009; Maass y col., 2009).

El papel fisiológico que ejercen estos compuestos en plantas es muy amplio. En plastidios, éstos actúan como pigmentos accesorios en los complejos cosechadores de luz, en los cuales absorben luz de la región azul y parte de la región verde del espectro visible (450-570 nm) transfiriendo posteriormente la energía absorbida a las clorofilas durante el proceso de la fotosíntesis (Ritz y col., 2000; Koyama y col., 2004; Dall'Osto y col., 2006; Stange y Flores, 2012). Por otro lado, los carotenoides ejercen un rol crítico como moléculas fotoprotectoras, previniendo el daño fotooxidativo provocado por moléculas derivadas del exceso nocivo de energía durante la fotosíntesis como el oxígeno singlete o la clorofila triplete (Woodall y col., 1997; Howitt y Pogson, 2006) y disipando la energía térmica a través del ciclo de las xantófilas (Dall'Osto y col., 2007; Kim y col., 2009). Además, los carotenoides corresponden a precursores en la biosíntesis de ácido abscísico (ABA) y estrigolactonas, importantes fitohormonas para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Cazzonelli y Pogson, 2010). El ABA está involucrado en la dormancia de semillas, maduración y diferenciación de células vegetales embrionarias, regulación de la apertura estomática y tolerancia a estrés abiótico (North y col., 2007; Barrero y col., 2008; Galpaz y col., 2008), mientras que las estrigolactonas están involucradas en el establecimiento de relaciones simbióticas con micorrizas, estimulación de la germinación de plantas parasíticas y la inhibición de las ramificaciones de los brotes (Akiyama y col., 2010; Xie y Yoneyama, 2010; Yoneyama y col., 2010). Finalmente y por su característica de otorgar colores rojos, naranjos y amarillos a distintos órganos de las plantas (principalmente flores y frutos), facilitan la polinización y dispersión de semillas (Grotewold, 2006; Howitt y Pogson, 2006).

Respecto a los animales y salvo unas pocas excepciones (Moran y Jarvik, 2010; Altincicek y col., 2012), éstos son incapaces de sintetizar carotenoides, por lo que deben adquirirlos a través del consumo de alimentos vegetales en la dieta. Su importancia en animales radica principalmente en que algunos carotenoides (β -caroteno, α -caroteno, criptoxantina) son precursores de la vitamina A (Yeum y Russell, 2002), la cual es esencial para el buen funcionamiento de la visión, respuesta inmune, reproducción y desarrollo embrionario, metabolismo de los huesos, hematopoyesis, mantención de la piel y mucosas (Fraser y Bramley, 2004; Krinsky y Johnson, 2005; Zhao y col., 2006; Cazzonelli y Pogson, 2010; Wan y col., 2012). En animales, también ejercen un rol como antioxidantes, previniendo enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer y enfermedades degenerativas relacionadas con el envejecimiento (Collins, 1999; Hadley y col., 2002; Bone y Landrum, 2010; Misawa, 2011). Por esta razón, los carotenoides se utilizan como suplemento en formulaciones alimenticias animales y humanas, e incluso como colorantes naturales en la industria alimenticia y cosmética (Umeno y col., 2005).

Debido a la importancia de los carotenoides tanto para plantas como animales, en las últimas décadas se ha dedicado un esfuerzo considerable en determinar los mecanismos regulatorios que subyacen a la biosíntesis de estos pigmentos. Los avances dentro de esta área de estudio, y especialmente en plantas, han permitido el descubrimiento y caracterización de la mayoría de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis de los carotenoides (Howitt y Pogson, 2006). Además, se han llevado a cabo un sinnúmero de experimentos cuyo fin último corresponde al aumento en los niveles de carotenoides a través de la sobreexpresión de los genes involucrados en su biosíntesis en distintas especies vegetales (Shewmaker y col., 1999; Mann y col., 2000; Beyer y col., 2002; Diretto y col., 2007; Aluru y col., 2008).



1.2 Biosíntesis de carotenoides en plantas.

En plantas superiores, la ruta de biosíntesis de carotenoides se encuentra altamente conservada y la mayoría de los genes involucrados junto con sus respectivas enzimas codificadas, ya han sido descritos (Cunningham y Gantt, 1998). Estos genes están localizados en el genoma nuclear y una vez que el gen es transcrito y posteriormente traducido, las proteínas son destinadas a plastidios en forma de pre-proteínas.

Una característica común a todos los isoprenoides, es que se sintetizan a partir de prenil pirofosfatos como el isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero, el dimetalil pirofosfato (DMAPP). En células vegetales existen dos vías independientes para la formación de estos precursores carotenogénicos; sin embargo, los carotenoides son principalmente sintetizados a partir del IPP y DMAPP producidos por la ruta plastidial del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato o MEP (Rodríguez-Concepcion, 2010). En esta ruta ocurre la condensación del piruvato con el gliceraldehido 3-fosfato, para dar lugar al 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP) por medio de la enzima DXP sintasa (DXS), seguido de una reacción catalizada por la enzima DXP reductoisomerasa (DXR) y una cascada de otras reacciones que llevan finalmente a la síntesis de IPP y DMAPP (Rodríguez-Concepcion y col., 2001; Carretero-Paulet y col., 2006). La condensación de 3 moléculas de IPP con DMAPP da lugar a un precursor de muchos isoprenoides plastidiales incluyendo los carotenoides, el geranilgeranil pirofosfato (GGPP) y cuya síntesis es catalizada por la enzima GGPP sintasa (GGPPS) (Lichtenthaler, 1999; Bouvier y col., 2005)(Figura 1). Los otros compuestos isoprenoides derivados del GGPP en plantas, corresponden a las plastoquinonas, la cadena fitol de las clorofilas, filoquinonas, tocoferoles y ácido giberélico (GA) (Meier y col., 2011).

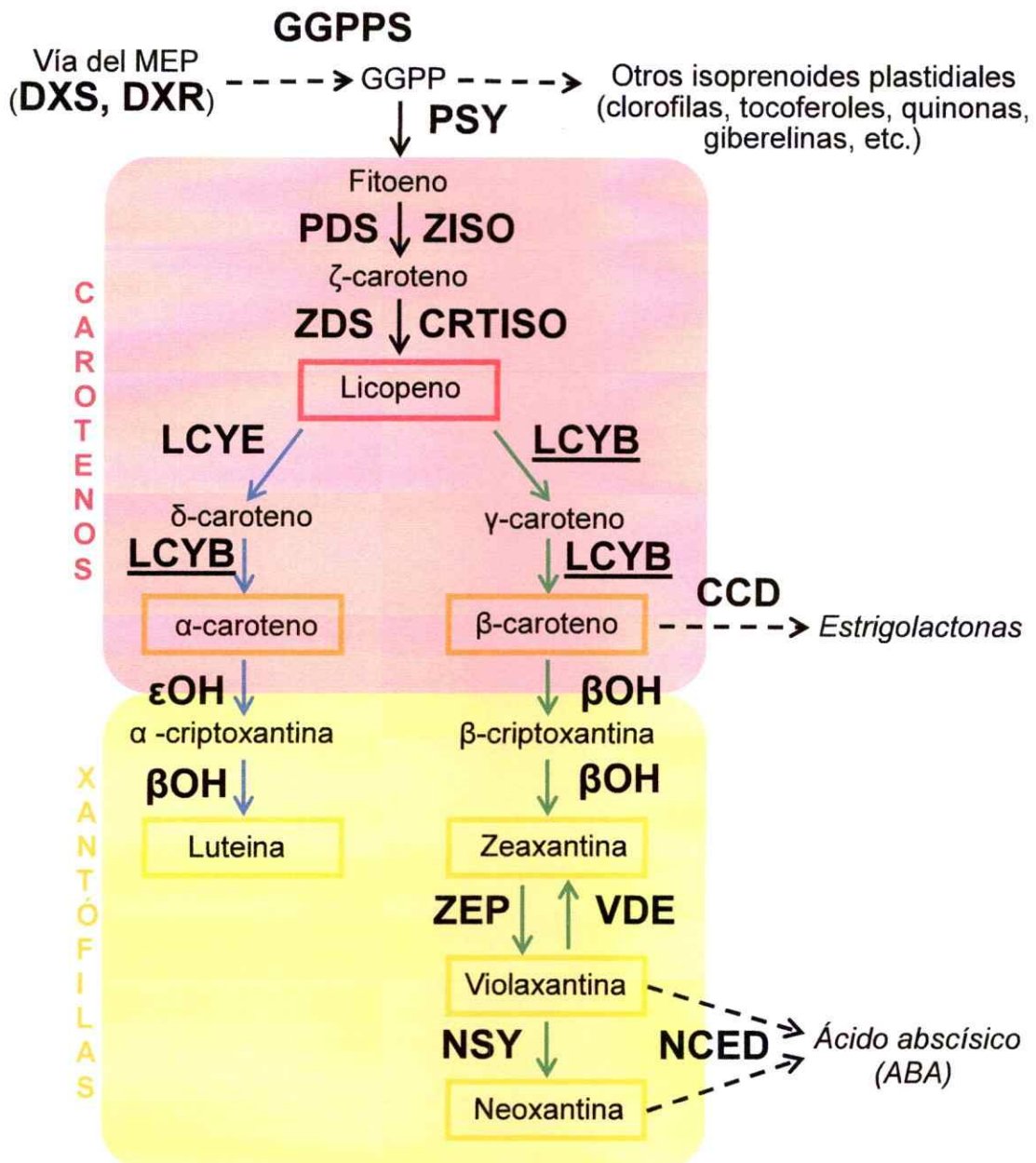


Figura 1 Ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas. Diagrama que indica las enzimas (negrita) y principales productos de la biosíntesis de carotenoides en plantas. Además se indica el color del metabolito cuando corresponde (rectángulos coloreados en productos) y la enzima en la que se enfoca este estudio (subrayada). Las líneas punteadas representan múltiples pasos. **MEP**: metileritritol 4-fosfato **DXS**: 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa, **DXR**: 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa, **GGPPS**: geranylgeranyl pirofosfato sintasa, **PSY**: fitoeno sintasa, **PDS**: fitoeno desaturasa, **ZISO**: ζ-caroteno isomerasa, **ZDS**: ζ-caroteno desaturasa, **CRTISO**: caroteno isomerasa, **LCYE**: licopeno ε-ciclasa, **LCYB**: licopeno β-ciclasa, **βOH**: β-caroteno hidroxilasa, **εOH**: ε-caroteno hidroxilasa **ZEP**: zeaxantina epoxidasa, **VDE**: Violaxantina deepoxidasa, **NSY**: Neoxantina sintasa, **CCD**: dioxigenasa clivadora de carotenoides y **NCED**: 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa. (Modificado de Rodríguez-Concepción y Stange, 2013)

El primer paso que da origen a un carotenoide en la ruta, es la generación de una molécula de 40 carbonos denominada fitoeno a partir de la condensación de dos moléculas de GGPP (**Figura 1**). Esta reacción es catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY) y es considerada el principal paso limitante en la ruta de biosíntesis de carotenoides (Hirschberg, 2001; Fraser y Bramley, 2004; Cazzonelli y Pogson, 2010).

Posteriormente, el fitoeno es desaturado para dar origen al cromóforo con dobles enlaces conjugados que forma la estructura base de los carotenoides vegetales y que determina las propiedades fisicoquímicas y biológicas características de este grupo de pigmentos (Britton, 1995). Es así como el fitoeno, un compuesto incoloro, tras ser sometido a una serie de 4 desaturaciones y 2 isomerizaciones, es transformado en licopeno: un carotenoide de coloración rojiza. Las desaturaciones son catalizadas por las enzimas fitoeno desaturasa (PDS) y ζ -caroteno desaturasa (ZDS), dando lugar en forma secuencial al fitoflueno, ζ -caroteno, neurosporeno y finalmente licopeno (Cunningham y Gantt, 1998). Adicionalmente, estas moléculas sufren isomerizaciones catalizadas por las enzimas ζ -caroteno isomerasa (Z-ISO) y caroteno isomerasa (CRTISO), las que permitirán finalmente la formación de all-trans-licopeno, configuración estable requerida para las reacciones subsiguientes. A continuación, el licopeno sufre ciclaciones en ambos extremos de su cadena, representando este suceso el primer punto de ramificación en la ruta de biosíntesis de carotenoides. Por un lado se forma α -caroteno, el cual presenta un anillo ϵ en un extremo y un anillo β en el otro y cuya síntesis es catalizada por las enzimas licopeno ϵ -ciclaza (LCYE) y licopeno β -ciclaza (LCYB), respectivamente. Mientras que por la otra vía de la ruta, se forma β -caroteno, molécula con 2 anillos β , uno en cada extremo, y cuya síntesis es catalizada de forma única por la enzima LCYB. La hidroxilación de los anillos de los carotenos genera las xantófilas

como la luteína (formada a partir del α -caroteno) y la zeaxantina (formada a partir del β -caroteno). En el caso de la formación de luteína participan las enzimas ϵ -hidroxilasa (ϵ OH) y β -hidroxilasa (β OH), mientras que en la síntesis de zeaxantina solo participa la β OH. La zeaxantina puede ser epoxidada dos veces por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP) para formar violaxantina, la cual posteriormente puede ser modificada para dar origen finalmente a la fitohormona ácido abscísico (ABA). Tanto carotenos como xantófilas pueden ser modificados a posterioridad para dar lugar a la gran diversidad de carotenoides encontrados en plantas y otros organismos (Walter y Strack, 2011). Por ejemplo, la degradación de los carotenoides genera apocarotenoides, una clase de compuestos muy variable estructuralmente y entre los que se encuentran compuestos biológicamente activos como el ABA y las estrigolactonas (Auldridge y col., 2006; Yoneyama y col., 2010).

1.3 Regulación de la biosíntesis de carotenoides en plantas.

La regulación de la biosíntesis de carotenoides en plantas es altamente compleja e incluye un sinnúmero de factores interrelacionados. Entre estos factores son de relevancia las interconexiones con otras rutas metabólicas relacionadas, el tipo y morfología de los plastidios en los que se acumulan, el estadio de desarrollo en el que se encuentra la planta y los estímulos medioambientales que recibe. Además, la regulación en la ruta puede ser tanto a nivel transcripcional como post-traducciona (Howitt y Pogson, 2006; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012).

La regulación transcripcional de la ruta carotenogénica corresponde al primer punto de regulación en la acumulación de estos pigmentos en plantas. Este tipo de regulación, controla la expresión de los genes carotenogénicas mediante el desarrollo, luz, ciclo

circadiano, retroalimentación mediada por ABA y por mecanismos epigenéticos (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012).

En primera instancia, se ha propuesto que la producción de carotenoides se regula a través del ciclo de vida de una planta por una interacción dinámica entre el desarrollo y los estímulos medioambientales externos que recibe (Hannoufa y Hossain, 2012). Uno de los mejores modelos de estudio para demostrar esta relación corresponde al caso de la maduración de frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*), ya que la biosíntesis de carotenoides en tomate está regulada por el desarrollo, pero también fuertemente influenciada por cambios de luz y temperatura, estímulos que se integran para determinar el nivel de transcripción de los genes carotenogénicos. Es así como previamente a la acumulación de carotenoides, aumentan los niveles de transcrito de los genes *Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Crtiso* y *Z-iso*, mientras que disminuyen los niveles de *Lcyb* y *Lcye* (Fraser y col., 1994; Lois y col., 2000; Alba y col., 2005). Esta regulación finalmente determina que un fruto maduro verde con una composición de carotenoides similar a la de una hoja se convierta en un fruto rojo con una acumulación masiva de carotenoides, particularmente licopeno (Giovannoni, 2001). Este tipo de regulación parece ser el mecanismo principal de regulación de la biosíntesis de carotenoides en la mayoría de los órganos vegetales que poseen cromoplastos como flores y frutos (Moehs y col., 2001; Kato y col., 2004; Skelton y col., 2006; Kita y col., 2007).

El principal estímulo medioambiental externo al cual responde la ruta carotenogénica corresponde a la luz y posee un rol importante tanto en la transición de etioplastos a cloroplastos (de-etiolación) como en el desarrollo de frutos y flores (Romer y Fraser, 2005; Rodríguez-Villalon y col., 2009). En general se ha establecido que la luz es captada por diversos fotoreceptores como los fitocromos y criptocromos, y este

estimulo procesado ejerce un efecto positivo sobre la expresión de los genes carotenogénicos (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Respecto a esto se ha demostrado que en *Arabidopsis thaliana* y *Sinapsis alba* (mostaza) los niveles de transcrito del gen *Psy* aumentan por efecto de la luz (von Lintig y col., 1997). Por otro lado, en tabaco (*Nicotiana tabacum*) frente a exposición de luz roja y blanca continua se ha reportado una inducción de los genes *Psy*, *β OH*, *Zep* (Woitsch y Romer, 2003). Recientemente, en zanahoria (*Daucus carota*) se han identificado diversas cajas regulatorias en promotores de genes carotenogénicos que responden a fitohormonas y luz. Además, experimentalmente se ha demostrado que la luz inhibe el desarrollo de la raíz de reserva de la zanahoria y la transición de leucoplastos a cromoplastos en este órgano (Fuentes y col., 2012). La luz también altera la expresión de la mayoría de los genes implicados en la síntesis de carotenoides en *D. carota* (Fuentes, 2011).

También se ha descrito una retroalimentación positiva por ABA, ya que bajo ciertas condiciones de estrés abiótico que requieren una producción activa de ABA, un incremento en la actividad PSY puede proveer de los precursores carotenogénicos necesarios para la producción suficiente de ABA (Li y col., 2008; Welsch y col., 2008; Arango y col., 2010). Es así como en algunas raíces vegetales ciertos isogenes de *Psy* (muchos genes carotenogénicos poseen redundancia génica especializada) no responden transcripcionalmente a la luz, sino más bien a estrés abiótico (osmótico principalmente) y específicamente a ABA (Li y col., 2008; Welsch y col., 2008; Meier y col., 2011).

A pesar que la regulación transcripcional de los genes carotenogénicos puede explicar en parte la biosíntesis de los carotenoides, sólo los mecanismos post-traduccionales pueden explicar la baja correlación entre patrones de expresión génica y

la acumulación de estos pigmentos en algunos modelos vegetales. Estos mecanismos comprenden principalmente; la modulación de los niveles y actividades enzimáticas, canalización de sustratos por complejos multienzimáticos, equilibrio síntesis/degradación y capacidad de secuestro y almacenaje (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Este último es uno de los más importantes en el caso de flores y frutos, ya que el tipo de plastidio donde ocurra la síntesis posee efectos considerablemente significativos en la capacidad de acumulación de carotenoides (Deruere y col., 1994; Vishnevetsky y col., 1999; Simkin y col., 2007). Finalmente el equilibrio entre degradación y síntesis también parece ser un factor determinante en la acumulación de carotenoides ya que éstos se pueden degradar tanto por fotooxidación no enzimática como por oxidación enzimática (Walter y Strack, 2011).

1.4 El gen *Lcyb* en la ruta de biosíntesis de los carotenoides.

El gen *Lcyb* codifica la enzima licopeno β -ciclase (LCYB), la cual está involucrada en la ciclación del licopeno y corresponde al punto de ramificación de la ruta de biosíntesis de carotenoides (**Figura 1**). Las enzimas tipo licopeno ciclasas (LCYB y LCYE) presentan alrededor de 400 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 40 kDa, además de un péptido de destinación a cloroplasto en el extremo amino terminal que en el caso de las licopeno β -ciclase de plantas es de una longitud de entre 50-100 aminoácidos (Schnurr, G. y col., 1996). Ambas enzimas poseen una alta similitud de secuencia aminoacídica y es probable que hayan evolucionado desde un ancestro común (Krubasik y Sandmann, 2000).

En las plantas, los carotenoides asociados al aparato fotosintético son compuestos cíclicos, comúnmente con dos anillos o modificaciones de éstos, entre estos destaca el β -caroteno, el cual posee un anillo β en cada extremo (Cunningham y Gantt, 1998). La

enzima LCYB puede actuar secuencialmente sobre los dos extremos de la molécula lineal del licopeno, introduciendo los dos anillos β y produciendo de esta forma β -caroteno (Alquezar y col., 2009) (Figura 1). También puede catalizar el paso de licopeno a α -caroteno en conjunto con LCYE (Figura 1), agregando un anillo β en solo uno de los extremos de la molécula lineal de licopeno (Hirschberg, 2001; Fraser y Bramley, 2004; Bouvier y col., 2005). Debido a la importancia de la enzima LCYB en la ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas y por ende en el desarrollo de estas, múltiples estudios se han realizado para identificar y caracterizar que la codifiquen en organismos vegetales (Cunningham y col., 1996; Pecker y col., 1996; Dalal y col., 2010; Araya-Garay y col., 2011; Moreno y col., 2013; Takemura y col., 2014; Zeng y col., 2015). Todas las enzimas identificadas a la fecha en plantas superiores poseen por sobre un 75% de identidad de secuencia aminoacídica y poseen un sitio de unión al dinucleótido (FAD/NADH) y dos motivos conservados característicos de este tipo de enzimas (Hugueney y col., 1995). Dada la esencialidad de esta enzima para la planta, deleciones en el gen *Lcyb* generan en la mayoría de los casos plantas inviables o cuyo fenotipo es letal a las pocas semanas de desarrollo. Mutantes heterocigotas del gen *Lcyb* se caracterizan por un fenotipo que no solo afecta el contenido de carotenoides, sino que también por la aparición de blanqueamiento de las hojas, acumulación de especies reactivas de oxígeno e incluso muerte celular. También dada la condición de los carotenoides de ser precursores de ABA, las plantas presentan una disminución significativa en su resistencia al estrés abiótico y semillas de germinación temprana (Conti y col., 2004; Dong y col., 2007). Con el objetivo de aumentar el contenido total de carotenoides, y en especial el de β -caroteno, en diversos organismos vegetales y principalmente aquellos de interés alimenticio como papa y tomate, se ha sobreexpresado el gen *Lcyb* de forma endógena o heteróloga



(Rosati y col., 2000; Dharmapuri y col., 2002; Diretto y col., 2007; Ji y col., 2009; D'Ambrosio y col., 2011).

1.5 Estudio de la funcionalidad de *Lcyb1* de *D. carota*.

En algunos modelos vegetales, la presencia de distintas isoformas de genes carotenogénicos está asociada con una función órgano-específica. En zanahoria (*Daucus carota*) existen dos genes codificantes de enzimas LCYB (*Lcyb1* y *Lcyb2*), de los cuales *Lcyb1* se expresa preferencialmente en hojas y la raíz de almacenamiento durante el desarrollo de la zanahoria, correlacionando con un aumento en el contenido de carotenoides, particularmente de β -caroteno (Moreno, 2012). Además, el gen *Lcyb1* es aquel gen carotenogénico que presenta el mayor aumento en sus niveles de expresión durante el desarrollo de *D. carota* (Fuentes, 2011). Teniendo en cuenta los antecedentes recién mencionados, nuestro laboratorio realizó la evaluación de funcionalidad del gen *Lcyb1* de *D. carota*. Dentro de los ensayos para evaluar su funcionalidad se utilizaron experimentos de complementación heteróloga en *E. coli*, sobreexpresión y silenciamiento génico post-transcripcional en *D. carota* (Pizarro y Stange, 2009; Moreno y col., 2013). Respecto a la primera aproximación se observó que el gen *Lcyb1* de *D. carota* es capaz de convertir licopeno en β -caroteno en *E. coli* (Moreno y col., 2013). Además, en este sistema heterólogo, LCYB1 presentó una mayor tasa de conversión de licopeno a β -caroteno que su parálogo LCYB2, el cual también fue capaz de convertir el licopeno a β -caroteno pero presentó acumulación del intermediario γ -caroteno (Moreno, 2010). Por otro lado, al silenciar el gen *Lcyb1* en *D. carota*, las líneas resultantes presentaron una disminución significativa en los niveles de carotenoides totales y β -caroteno en las hojas y raíz modificada de *D. carota*, poniendo en evidencia la importancia de este gen en la síntesis de pigmentos carotenoides en toda

la planta (Pizarro y Stange, 2009). Estos antecedentes respecto a la funcionalidad del gen *Lcyb1* de *D. carota* (*DcLcyb1*) se realizaron en paralelo a la sobreexpresión de este gen en *D. carota* y su expresión en un sistema heterólogo vegetal como tabaco (*N. tabacum*), con el objetivo de aumentar el contenido de carotenoides totales y para fundamentar antecedentes sobre la funcionalidad del gen en sistemas vegetales (Moreno, 2012; Moreno y col., 2013). Para lograr tal objetivo, se utilizaron distintos vectores de expresión (pGWB2, pMDC32, pGWB8 y pMDC85) con tal de lograr una inserción estable de dicho gen en el genoma de *N. tabacum* y *D. carota*. En todas las líneas transgénicas obtenidas que expresaron el gen *DcLcyb1* (**Figura 2A**), se consiguió un aumento considerable en el contenido de carotenoides totales, y además se demostró la localización de la enzima *DcLCYB1* en los cloroplastos de las células vegetales (Moreno, 2012; Moreno y col., 2013). Tanto en tabaco como en zanahoria, el aumento en los niveles de expresión del gen *DcLcyb1* causó una alteración en la expresión de genes endógenos clave de la ruta carotenogénica lo cual se correlacionó con los niveles de carotenoides observados, especialmente β -caroteno (Moreno, 2012; Moreno y col., 2013). En el caso particular de las líneas transgénicas de tabaco obtenidas al utilizar el vector pGWB2/*DcLcyb1*, un número importante de líneas transgénicas T₀ (3 de un total de 6 analizadas) presentaron además un aumento en tamaño y área foliar, presencia adelantada de estructuras florales y mayor concentración de clorofila. Estas líneas (L14, L15 y L16), además correspondieron a aquellas que poseían el mayor aumento de carotenoides, específicamente de β -caroteno, tal como se muestra en la **Figura 2B** (Moreno, 2012).

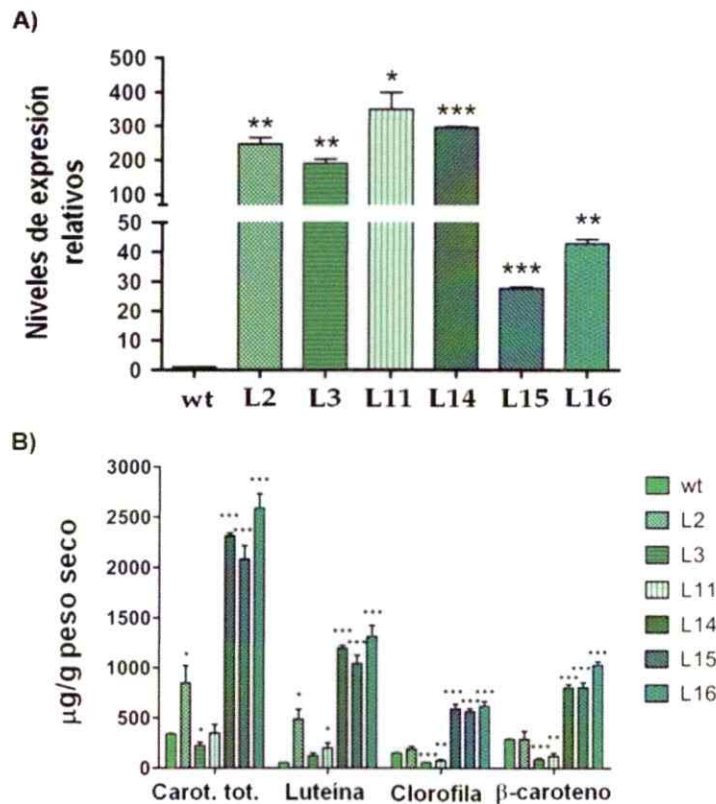


Figura 2 Análisis de la expresión del gen *DcLcyb1* y niveles de pigmentos en plantas de tabaco transgénicas para el gen *DcLcyb1*. (A) Cuantificación de los niveles de expresión del gen *DcLcyb1* en plantas de tabaco transgénicas transformadas con el vector pGWB2/*Lcyb1*. Los valores se normalizaron respecto a los niveles de expresión del gen 18S y se calibraron con respecto a las plantas de tabaco silvestres (B) Cuantificación de los niveles de acumulación de pigmentos en hojas de tabaco transgénicos (Líneas L2, L3, L11, L14, L15 y L16) para el vector pGWB2/*Lcyb1*. wt: plantas de tabacos silvestres. Asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (wt) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Imagen modificada de Moreno, 2012.

1.6 Relación entre la ruta de biosíntesis de carotenoides, clorofilas y giberelinas en plantas.

Los fenotipos observados en las líneas 14, 15 y 16 de *N. tabacum* transformadas con el vector pGWB2/*DcLcyb1* sugieren que la alteración de los niveles de expresión de un gen carotenogénico, puede alterar rutas de síntesis relacionadas a la de carotenoides.

La principal razón de la alteración de estas otras rutas podría deberse al uso de precursores metabólicos comunes; como ocurre en el caso de las rutas de síntesis de clorofilas y giberelinas (GA). En ese caso, la relación más evidente es que carotenoides, clorofilas y GAs comparten como sustrato común el geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). Evidencias de esta estrecha relación entre estas rutas de biosíntesis han aparecido en aproximaciones experimentales que principalmente se ha enfocado en la ingeniería metabólica de biosíntesis de carotenoides en plantas. Por ejemplo, la alteración de la funcionalidad de la enzima fitoeno desaturasa 3 (*PDS3*) mediante el uso de T-DNA en *Arabidopsis thaliana* da como resultado plantas mutantes con un fenotipo albino y enano, principalmente por alteración de la biosíntesis de clorofila, carotenoides y giberelinas (Qin y col., 2007). Además, la sobreexpresión de una isoforma de fitoeno sintasa (PSY) especializada en la producción de carotenoides en tomate generó enanismo en una proporción importante de las líneas transgénicas, principalmente debido a la competencia por el precursor GGPP entre carotenoides y giberelinas, estas últimas involucradas en importantes procesos del desarrollo de la planta como el crecimiento longitudinal del tallo y elongación de órganos axiales (Fray y Grierson, 1993; Fraser y col., 2007). Resultados que siguen confirmando esta relación entre rutas de biosíntesis también se han obtenido en *Arabidopsis* al sobreexpresar el gen endógeno que codifica la enzima PSY de forma específica en semillas, obteniéndose un retraso significativo en la germinación (proceso en el cual desempeña un rol importante la relación GAs/ABA) y un incremento en los niveles de carotenoides, clorofila y ABA (Lindgren y col., 2003). Pero al parecer esta comunicación no es solo a nivel de precursores metabólicos comunes, ya que al silenciar el gen codificante de PSY en la orquídea *Oncidium hybrid* mediante ARN de interferencia, dio como resultado alteraciones en el tamaño de las plantas, problemas en el desarrollo normal de los plastidios, disminución en los niveles

de clorofila y una menor expresión de los genes asociados a su síntesis (Liu y col., 2014). Además, mediante análisis de HPLC se demostró que los niveles endógenos de GAs y ABA se encontraban reducidos considerablemente (Liu y col., 2014). Todos estos antecedentes dan cuenta que la alteración en la expresión de genes carotenogénicos puede dar lugar a fenotipos en los que están involucradas múltiples vías metabólicas, como la de biosíntesis de carotenoides, clorofila, ABA y GAs, y que estos efectos pueden dar cuenta de cambios relevantes en el crecimiento y desarrollo de la planta. Considerando esto, actualmente todos los estudios se han enfocado en como la alteración en los niveles de expresión de genes involucrados en las primeras etapas de la biosíntesis de carotenoides (principalmente genes *Pds* y *Psy*) posee consecuencias sobre otras rutas relacionadas. En estos trabajos, los efectos observados han sido explicados por el uso compartido de precursores metabólicos (por ejemplo, GGPP) dando origen a fenotipos que favorecen a una ruta en particular en desmedro de otra. Además, otro punto a tomar en cuenta es el origen del gen, ya que al pertenecer a una especie vegetal que se caracteriza en producir grandes cantidades de carotenoides en la raíz modificada (*D. carota*), éste ha sido sometido constantemente a una presión selectiva ejercida por el hombre a favor de la actividad enzimática que favorece la producción de β -caroteno. No obstante y contrario a lo reportado anteriormente, las líneas 14, 15 y 16 presentan un fenotipo que involucra aumento de tamaño y área foliar, floración temprana y mayores niveles de clorofila y carotenoides totales (Moreno, 2012). Por lo tanto, en estas líneas la expresión del gen *Lcyb* de *D. carota* podría estar promoviendo las rutas de biosíntesis de clorofila o giberelinas, a diferencia de lo reportado hasta la fecha con otros genes carotenogénicos. Teniendo en cuenta esto, en esta Tesis de Magister se propuso realizar análisis de distintos parámetros fisiológicos y moleculares de las líneas transgénicas para aportar en el establecimiento de las causas

de los fenotipos observados en plantas de *N. tabacum* transformadas con el gen *DcLcyb* (Líneas 14, 15 y 16) y la obtención de información esencial para establecer mecanismos que den cuenta de la comunicación entre las rutas de biosíntesis de carotenoides, clorofilas y GAs, indispensables para el crecimiento y desarrollo de los organismos vegetales.

1.7 Hipótesis

“La expresión heteróloga del gen *DcLcyb1* en *N. tabacum* regula positivamente la biosíntesis de carotenoides, clorofilas y giberelinas, generando un aumento en la eficiencia fotosintética, crecimiento (vegetativo y reproductivo) y biomasa”

1.8 Objetivo general

Caracterizar fenotípicamente a nivel fisiológico, bioquímico y molecular las líneas L14, L15 y L16 de *N. tabacum* que expresan el gen *Lcyb1* de *D.carota*.

1.9 Objetivos específicos

- 1) Evaluar la expresión del transgen *DcLcyb1* y determinar la concentración de pigmentos (carotenoides y clorofila) en las líneas T₁ de *N. tabacum* transformadas con *DcLcyb1*.
- 2) Evaluar parámetros fisiológicos relacionados con el crecimiento (vegetativo y reproductivo), biomasa y eficiencia fotosintética de las líneas transgénicas de *N. tabacum* que expresan el gen *DcLcyb1*
- 3) Determinar la expresión de genes endógenos clave en la ruta de biosíntesis de carotenoides, clorofilas y giberelinas en las líneas transgénicas de *N. tabacum*.
- 4) Determinar la participación de las giberelinas en el fenotipo observado en las líneas transgénicas de *N. tabacum* a través de ensayos de inhibición y cuantificación de giberelinas bioactivas.

MATERIALES Y METODOS

2.1 Materiales biológicos.

En este trabajo se utilizaron muestras de tejido vegetal provenientes de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cultivar Xhanti) transgénicas transformadas con el vector PGWB2 portando el gen *Lcyb1* de *D.carota* (Líneas 14, 15 y 16) y plantas transformadas con el vector PGWB2 sin inserto (Moreno, 2012). Esas plantas (T₀) fueron caracterizadas a nivel molecular y fenotípicamente para posteriormente recolectar las semillas (Moreno, 2012). Para evaluar los parámetros fisiológicos de las plantas transgénicas, se utilizaron semillas correspondientes a plantas T₁ y T₂, la cuales fueron crecidas en medio de cultivo Murashige Skoog (MS) con 2% (p/v) de sacarosa y el antibiótico de selección kanamicina (100 mg/L) bajo un régimen de luz de 8 h de oscuridad y 16 h de luz fluorescente blanca (Irradiancia 150 μmol de quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 22°C y 50% de humedad en cámaras de cultivo localizadas en dependencias de la Universidad de Chile. El patrón de segregación de las plantas crecidas en medio de selección sugiere que el gen *DcLcyb1* se insertó solo una vez en todas las plantas analizadas. Posteriormente y luego de 1 mes de cultivo *in vitro*, las plantas fueron traspasadas a un invernadero con 16h luz / 8 h oscuridad, 22°-25° C y aproximadamente 115 μmol de quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En éste, las plantas se cultivaron en tierra estéril (1/3 de turba, 1/3 de vermiculita y 1/3 de tierra de trasplante) en potes de 1L de capacidad durante dos meses. La primera semana de este periodo las plantas estuvieron cubiertas para permitir la aclimatación luego de salir del cultivo *in vitro*. Durante este tiempo las plantas fueron regadas uniformemente 2 o 3 veces a la semana según lo ameritaba. A los 3 meses, las plantas fueron evaluadas respecto a la presencia del transgen, sus parámetros fisiológicos y se recolectaron hojas de todas las plantas

analizadas, tejido que fue congelado en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -80°C hasta su uso.

2.2 Reactivos.

Los reactivos utilizados se adquirieron según las técnicas de biología molecular requeridas y fueron escogidas de acuerdo a los estándares de calidad necesarios. Estos productos fueron obtenidos de empresas y marcas registradas como Invitrogen, Agilent Technologies, Fermentas, Promega, Axygen, New England Biolabs, Biorad, Merck, US Biological, MO BIO Laboratories Inc. y Sigma-Aldrich.

2.3 Partidores

Los partidores utilizados se describen en la **Tabla I**, y fueron necesarios para el análisis de expresión mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) del gen *Lcyb1* de *D. carota* y los distintos genes endógenos de *N. tabacum* en la plantas transgénicas PGWB2/*DcLcyb1* y PGWB2 sin inserto (S/I). Todos los partidores se diseñaron utilizando la herramienta bioinformática Vector NTI (Invitrogen) considerando los parámetros necesarios para el experimento de PCR en tiempo real (tamaño amplicon, temperatura de disociación de los partidores y contenido GC, etc). Las secuencias utilizadas para el diseño de los partidores fueron las siguientes: *DcLcyb1* (GenBank: DQ192190.1), *NtActin* (EU938079.1), *NtUbi* (U66264.1), *Nt18S* (AJ236016.1), *NtPsy1* (JF461341.1), *NtPsy2* (JX101475.1), *NtLcyb* (KC484706.1), *NtGgps* (GQ911583.1, GQ911584.1, JN656210.1 y JN967749.2), *NtDxs1* (EU650419.1), *NtDxs2* (JQ085430.1), *NtChl* (FJ905101.1), *NtCps* (AB170034.1), *NtKs* (JQ413246.1) y *NtNced* (HM068892.1, JX101472.1 y JX101473.1).

Luego, mediante el programa OligoAnalyzer (IDT) se analizaron las propiedades termodinámicas para descartar la formación de heterodímeros, homodímeros u horquillas. Además, cuando fue posible, se consideró que los fragmentos amplificados comprendieran intrones de manera de evidenciar la contaminación por ADN genómico en las muestras de ADNc.

Tabla I Partidores utilizados en esta Tesis.

Nombre	Secuencia (5'→3')	TM (°C)	Tamaño producto (pb)	Descripción
<i>DcLcyb1 F</i>	TTGACCTTCCTTTGTATGACCCGTC	58.7	107	Fragmento del Gen Carotenogénico <i>Lcyb1</i> de <i>D.carota</i>
<i>DcLcyb1 R</i>	TCCTGCCTCAGAACTTGTGTGC	59.8		
<i>NtActin F</i>	GTATGTCGCCATTCAAGCCGTTCT	59.1	242	Gen de actina. Utilizado como normalizador y para verificar la calidad del ADNc.
<i>NtActin R</i>	ACGGAGGATAGCATGTGGCAAAGCAT	60.1		
<i>NtUbiq F</i>	GCTCGAGGACGGCAGAAC	58.6	121	Gen ubiquitina. Utilizado como normalizador.
<i>NtUbiq R</i>	CTTGGGCTTGGTGTAGGTCTTC	57.7		
<i>Nt18S F</i>	CTGAGAAACGGCTACCACATCCA	58.9	170	Gen RNA ribosomal 18S. Utilizado como normalizador.
<i>Nt18S R</i>	CACCAGACTTGCCCTCCAATGG	60.4		
<i>Psy1 F</i>	GGAACCAAGCTAATGACCCCAGAGAGA	58.1	164	Fragmento del Gen Carotenogénico <i>Psy1</i> de <i>N. tabacum</i> .
<i>Psy1 R</i>	GGCCGCCCACTGAAAATATCTTCC	58.6		
<i>Psy2 F</i>	TCAGAGATGTTGGAGAAGATGC	58.4	130	Fragmento del Gen Carotenogénico <i>Psy2</i> de <i>N. tabacum</i> .
<i>Psy2 R</i>	GCTTCAATCTCGTCCAATATCTTG	57.3		
<i>Lcyb F</i>	CCGTGTTAAATTCCACCACGCCAA	59.6	132	Fragmento del Gen Carotenogénico <i>Lcyb</i> de <i>N. tabacum</i> .
<i>Lcyb R</i>	GAAGCCAGTTGCATCAAGCACCAC	59.8		
<i>Ggps F</i>	GTATTGGGTTGTTGTTTCAAGTTGTGGATG	58.6	220	Fragmento de un consenso de los 4 genes <i>Ggps</i> de <i>N. tabacum</i> .
<i>Ggps R</i>	GCAATCAATGGAGCTGCTTTGTCTGGATC	61.6		
<i>Dxs1 F</i>	GCCTTAGATGGACTTCTTGATGGCAAGT	60.4	142	Fragmento del Gen <i>Dxs1</i> de <i>N. tabacum</i> .
<i>Dxs1 R</i>	TGTTAAACACTGTTGCTGCAATGTGAGAT	59.2		

Dxs2 F	AGAGCATAACAAAGCAAATTGGACCTC	57.8	107	Fragmento del Gen <i>Dxs2</i> de <i>N. tabacum</i> .
Dxs2 R	CTCCTCAAAAAGAGTTGAACAAGAAGCAC	58.2		
Chl F	ATCAAATATGGGTGCTTCTTCTTGGAGG	58.8	250	Fragmento del Gen <i>Chl</i> de <i>N. tabacum</i> .
Chl R	ATTATGTCAGGTGTAAGGGTGCCGAACA	61.5		
Cps F	ACACTAAAGCTGACATGGATACCAAAGG	58.6	167	Fragmento del Gen <i>Cps</i> de <i>N. tabacum</i> .
Cps R	CATAAGTGCAAAGGCAGTAGAAGATGGA	58.6		
Ks F	TACTTACTACCGTGGTTGATGACTTCTTTG	58.0	177	Fragmento del Gen <i>Ks</i> de <i>N. tabacum</i> .
Ks R	CTTCATCTCCAATCTCACAAATAGTGCTGT	58.5		
Nced F	CTTTACCAAAAACAGCCGACCCACG	60.5	312	Fragmento de un consenso de los genes <i>Nced</i> de <i>N. tabacum</i> .
Nced R	CACCAATGGCTTTAGGAAAAACAGGACG	60.1		

Posteriormente, se evaluó la especificidad de los partidores respecto al gen blanco a amplificar, para esto se realizó un BLASTx utilizando la bases de datos de secuencias parciales (EST) y completas de genes de *N. tabacum*. Todos los partidores se mantuvieron a una concentración de 250 μM a -20°C y se diluyeron a 10 μM al momento de su uso.

2.4 Metodología.

En esta sección se describen en primera instancia las metodologías empleadas para la determinación de los parámetros fisiológicos de plantas transgénicas de *N. tabacum*. Luego se describen los métodos utilizados para la extracción del ARN total de hojas de *N. tabacum* y el posterior análisis de expresión en estos tejidos mediante PCR en tiempo real. También se describen los protocolos pertinentes a la medición de los distintos pigmentos obtenidos en las plantas PGWB2/*DcLcyb1* y PGWB2 S/I mediante RP-HPLC. Finalmente se muestran los protocolos para determinar el efecto del inhibidor de síntesis de giberelinas (AMO1618) en las plantas transgénicas y cuantificar el

contenido de giberelinas activas (GA1 + GA4) y ácido abscísico en las líneas transgénicas de *N. tabacum* mediante UPLC acoplado a espectrometría de masas.

2.4.1 Análisis de parámetros fisiológicos.

2.4.1.1 Medición del crecimiento de la planta.

A los 3 meses de crecimiento, 7 plantas transgénicas por cada línea, vale decir PGWB2/*DcLcyb1* (líneas 14, 15 y 16) y PGWB2 S/I, fueron evaluadas respecto a altura, diámetro del tallo, distancia internodal, número de hojas, largo y ancho foliar. La altura de la planta fue medida desde el ápice floral hasta la base, considerando solo plantas en las que el ápice floral era visible. El diámetro del tallo fue medido en el punto medio de cada uno de los 3 entrenudos consecutivos ubicados bajo el quinto nudo (considerando como el primer nudo aquel que sostenía la primera hoja madura no clorótica). Para todas las plantas analizadas se consideró un promedio de los 3 diámetros medidos. La distancia internodal fue medida 3 veces en los entrenudos ubicados por sobre el tercer nudo, estos datos también fueron graficados considerando el promedio de estas 3 mediciones por planta. Tanto para el conteo de hojas como la medición de área foliar se consideraron solo hojas maduras, en el caso de área foliar se midió tanto el largo como el ancho de la hoja (aquellas ubicadas entre el segundo y cuarto nudo) en todas las plantas analizadas. Cuando las plantas florecieron y posteriormente produjeron semillas, se contaron el número de flores totales y se pesaron las semillas (peso neto y peso por capsula). Estos análisis se realizaron también en la generación T₂, y al igual que en análisis hecho en la generación T₁, se utilizaron 7 plantas por línea (14, 15, 16 y S/I). Para procesar los datos y hacer los análisis estadísticos pertinentes se utilizó el programa GraphPad Prism utilizando como test estadístico un test de T de dos colas, no pareado, $p < 0.05$.

2.4.1.2 Medición de la biomasa de la planta.

Las plantas fueron cosechadas luego de realizar todos los ensayos fisiológicos pertinentes, para esto se recolectaron raíces, hojas y tallos. En primera instancia, estos fueron pesados para determinar el peso fresco por planta y posteriormente secados en una estufa a 70°C en papel aluminio durante 48 h para determinar el peso seco. Se consideraron 7 réplicas biológicas para cada línea (14, 15, 16 y S/I) tanto para las plantas de la generación T₁ como T₂. Nuevamente, para procesar los datos se utilizó el programa GraphPad y un test de T de dos colas, no pareado, $p < 0.05$.

2.4.1.3 Medición de eficiencia fotosintética.

Para evaluar eficiencia fotosintética de las plantas transgénicas se midió la fluorescencia de la clorofila utilizando un fluorómetro Fms1 (Hansatech). Este equipo nos fue proporcionado por el Dr. Claudio Pastenes (Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile). Para la determinación del rendimiento máximo cuántico del fotosistema II, las plantas fueron preincubadas por 30 min en oscuridad utilizando pinzas foliares. Tanto la fluorescencia mínima (F_0) como la fluorescencia máxima (F_m) fueron medidas en estos segmentos de hojas adaptadas a la oscuridad durante el transcurso del mediodía. F_0 fue medido aplicando un pulso débil de luz roja ($< 1 \mu\text{mol de quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mientras que F_m se determinó durante un pulso de 0,8 s de luz blanca de intensidad de $3,500 \mu\text{mol de quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El rendimiento cuántico máximo se calculó como $(F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$. Todas estas mediciones se realizaron en 3 hojas de los nudos distales, repitiendo 3 veces la medición por hoja y evitando la nervadura central. Para este experimento se utilizaron 10 plantas T₁ por línea y los datos se graficaron en GraphPad utilizando un test de T de dos colas, no pareado, $p < 0.05$.

2.4.2 Extracción de ARN total de tejidos de tabaco.

Para la extracción de ARN total a partir de hojas de tabaco se utilizó el reactivo TRIzol (Invitrogen). Se utilizaron 6 plantas de tabaco de 2 meses por cada línea transgénica y se pesaron aproximadamente 100 mg de hojas 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 de 1.6 mL. El homogenizado se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se agregó 200 uL de cloroformo, agitándose vigorosamente. La mezcla fue incubada durante 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4°C. Se rescataron aproximadamente 500 uL del sobrenadante y se traspasaron a un tubo limpio, en donde el ARN se precipitó con 500 uL de isopropanol durante 10 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4°C y el precipitado se lavó con 1 mL de etanol 75% (en agua libre de nucleasas). Se centrifugó nuevamente durante a 8000 g durante 5 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secando a temperatura ambiente. Una vez seco, se suspendió en 20 µL agua nanopura tratada con DEPC (pH. 5.0) y se almacenó a -80°C hasta su uso.

2.4.3 Cuantificación y análisis de la calidad del ARN total.

2.4.3.1 Cuantificación y análisis de la calidad del ARN total mediante espectrometría.

Para evaluar la calidad y cantidad de ARN total a partir hojas de tabaco se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop® (ND-1000 UV-Vis). Además de determinar la concentración de ARN total en la muestra, se evaluó la presencia de contaminantes.

Para esto se analizaron los cocientes de absorción A_{260}/A_{280} (evaluación de la contaminación por proteínas en la mezcla) y A_{260}/A_{230} (evaluación de la contaminación por polisacáridos y polifenoles). Se consideró que para una muestra de ARN total puro ambos cocientes deberían ser cercanos a 2.

2.4.3.2 Análisis de la calidad del ARN total mediante gel de agarosa denaturante.

Para evaluar la integridad del ARN total se realizó un gel de agarosa con condiciones denaturantes para el ARN. Para esto, se calentaron aproximadamente 0.5 g de agarosa en 35 mL de agua destilada a una temperatura de 60°C. Posteriormente, se agregaron 5 mL de buffer de corrida MOPS 10X (MOPS (pH 7.0) 0.4 M, Acetato de sodio 0.1 M y EDTA 0.01 M) y 9 mL de formaldehído 37% (12.3M). El gel formado fue acomodado en una cámara de electroforesis y ésta se llenó con buffer de corrida MOPS 1X. Antes de cargar el ARN en los pocillos del gel, éste fue tratado con buffer de carga de ARN (Fermentas) según las indicaciones de su fabricante. Posteriormente, una vez cargada las muestras, se procedió a realizar la electroforesis con condiciones de 70 V durante 50 min. Transcurrido este tiempo se procedió a visualizar las bandas bajo la luz de un transiluminador UV (GeneGenius Classic de SynGene) y fotografiados utilizando el software asociado al equipo (GenSnap). La calidad de las muestras se evaluó según la presencia nítida de 2 bandas características de una muestra de RNA íntegra correspondientes a los ARN ribosómicos de 23 y 18S.

2.4.4 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

Todos los productos de PCR obtenidos (100-250 pb aproximadamente) fueron analizados en geles de agarosa de concentración 1% a 1.5%. Como marcador de tamaño de banda en pares de bases (pb) se utilizó Gene Ruler de 100 pb (Fermentas).

Estos geles fueron preparados utilizando buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) como disolvente de la agarosa. Al momento de cargar las muestras en el gel, éstas se mezclaron con buffer de carga (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol 80%) en una proporción 5:1. Posteriormente, se realizó la electroforesis utilizando una diferencia de potencial entre 90 V y 110 V durante 40 a 50 min dependiendo del tamaño de banda esperado. Luego los geles, se tiñeron durante 15 min en una solución de bromuro de etidio, se visualizaron con un transiluminador UV (GeneGenius Classic de SynGene) y se fotografiaron utilizando el software asociado al equipo (GenSnap).

2.4.5 Síntesis y análisis del ADNc de *N. tabacum*.

2.4.5.1 Tratamiento del ARN total con DNasa I.

Todas las muestras de ARN total obtenidas en este trabajo, se trataron con DNasa I previo a realizar la técnica de RT-PCR, de manera de eliminar la posible contaminación con ADN genómico. Para eso se trataron 7 µg de ARN total con 50 U de DNasa I (Fermentas), 1 µL de inhibidor de RNasa (Fermentas) y 2 µL de buffer de DNasa/MgCl₂ 10X (Fermentas). Esto se realizó en un volumen total de 20 µL utilizando agua DEPC para completar ese volumen cuando fue necesario. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 35 min en un baño termoregulado. Transcurrido ese tiempo, se transfirió rápidamente a hielo y se agregaron 2 µL EDTA (25 mM). Luego se incubó la mezcla durante 10 min en hielo.

2.4.5.2 Transcripción reversa para sintetizar el ADNc (RT).

Para la síntesis del ADNc se utilizó el sistema ImProm-II Reverse Transcription (Promega). Se tomaron 9,5 µL de ARN total tratado con DNasa y se mezclaron en un

tubo de 0,6 mL con 3 μ L del partidador Oligo-AP (**Tabla I**). Cada muestra se incubó 5 min a 70°C (**Programa A en la Tabla II**). Transcurrido este tiempo el programa se detuvo, los tubos se mantuvieron en hielo y se agregó a la mezcla de transcripción reversa (10 μ L de buffer ImProm-II 5X, 1 μ L de inhibidor de RNAsa (Fermentas), 5 μ L de MgCl₂ (50 mM), 2,5 μ L de dNTPs (10 μ M), 16 μ L de agua DEPC y 3 μ L de la enzima de transcriptasa reversa ImProm-II) para completar un volumen total de 50 μ L. Luego, los tubos se colocaron nuevamente en el termociclador y se continuó el programa de RT (**Tabla II-A**). Finalmente, se obtuvieron 50 μ L de cada cDNA que fueron almacenados hasta su uso a -20°C.

2.4.5.3 PCR convencional utilizando ADNc como molde.

Para confirmar la integridad del ADNc obtenido se amplificó mediante PCR un fragmento del gen codificante de actina (*NtActin*) utilizando los partidores descritos en la **Tabla I**. Todas las reacciones de PCR llevadas a cabo en esta Tesis se realizaron en un volumen total de 25 μ L en agua libre de nucleasas e incluyendo 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen), 2,5 μ L del buffer de la *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen), 0,5 μ L dNTPs (10 mM), 0,5 μ L de los partidores sentido y antisentido correspondiente a cada gen (10 μ M) y 1 μ L de ADNc como molde. Además, al trabajar con cada pareja de partidores se incluyó un control negativo (carente de molde) y un control positivo. El programa utilizado en esta ocasión se muestra en la **Tabla II-B**. Como control para verificar la ausencia de ADN genómico contaminante se reemplazó el ADNc con ARN total tratado con DNAsa I. Esto se realizó para cada una de las muestras analizadas.

2.4.6 PCR cuantitativo en tiempo real.

Previo al experimento de PCR en Tiempo Real se procedió a amplificar todos los genes utilizados en este estudio mediante un PCR convencional (**Tabla II-C**) y utilizando los partidores descritos en la **Tabla I**. Esto se realizó desde ADNc y tuvo la finalidad de comprobar la funcionalidad y especificidad de los partidores diseñados. Luego, para evaluar la expresión de los distintos genes de interés a nivel de transcrito (*18S*, *Actina*, *Ubiquitina*, *Psy1*, *Psy2*, *NtLcyb1*, *DcLcyb1*, *Dxs*, *Ggps*, *Chl*, *Cps*, *Ks*, *Nced*) en las muestras analizadas se utilizó la técnica de PCR en tiempo real utilizando SYBR Green como sonda fluorescente. Para esto, se utilizó un termociclador Mx3000P (Stratagene) y el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 20 μL , el cual incluía 10 μL de Master Mix (*Taq* ADN polimerasa, dNTPs, MgCl_2 y SYBR Green), 7,5 μL de agua libre de nucleasas, 0,3 μL de sonda ROX (utilizada como sonda pasiva y a una dilución 1:500) y 0,6 μL de partidores antisentido y sentido (10 μM). El programa utilizado para todas las muestras es el descrito en la **Tabla II-D**. Se utilizaron muestras de 6 plantas transgénicas por línea y además, todas las reacciones fueron llevadas a cabo en triplicado técnico, seleccionando posteriormente las 2 réplicas de mayor similitud. La especificidad de reacción para cada set de partidores fue medida en la curva de denaturación del producto de PCR correspondiente, y en esta se verificó la presencia de una sola señal en el gráfico de Fluorescencia vs T° .

En este trabajo, las cuantificaciones de los niveles de expresión fueron normalizadas respecto a la expresión del gen de actina y relativizadas usando como calibrador aquella condición de menor expresión génica y se indicará en cada figura según corresponda. Se probaron tres genes candidatos como normalizadores (*18S*,

actina y *ubiquitina*) pero al evaluarlos mediante el programa NormFinder (Andersen y col., 2004), *actina* correspondió al mejor normalizador, lo cual se corroboró experimentalmente y se aplicó para todos los ensayos realizados. Para los cálculos de expresión relativa y eficiencia de cada partidor, se utilizaron las ecuaciones descritas por Pfaffl (2001).

Tabla II Programas de PCR utilizadas en esta Tesis.

A.- RT.

Segmento	Pasos		Nº de ciclos
	Temperatura	Tiempo	
1	70 °C 25°C 42°C 70°C	5 min 5 min 60 min 15min	1

B.- PCR del gen *NtActin* para evaluar el ADNc.

Segmento	Pasos		Nº de ciclos
	Temperatura	Tiempo	
1	94°C	3 min	1
2	94 °C 55°C 72°C	1 min 1 min 30 s	28
3	72°C	10 min	1

C.- PCR para evaluar partidores diseñados.

Segmento	Pasos		Nº de ciclos
	Temperatura	Tiempo	
1	94°C	3 min	1

2	94 °C	1 min	33
	55°C	1 min	
	72°C	30 s	
3	72°C	10 min	1

D.- PCR cuantitativo en Tiempo Real.

Segmento	Pasos		N° de ciclos
	Temperatura	Tiempo	
1	95°C	3 min	1
2	95°C	10 s	40
	60°C	20 s	
3	95°C	1 min	1
	60°C	30 s	
	95°C	30 s	

2.4.7 Determinación de la concentración de clorofila y carotenoides.

2.4.7.1 Extracción de pigmentos a partir de hojas de tabaco.

Para la extracción de pigmentos de tejido vegetal de tabaco se utilizaron 6 plantas de 2 meses por cada una de las líneas transgénicas analizadas (S/I, L14, L15 y L16), para cada una de ellas se consideró una mezcla de tejido congelado correspondiente a 4 hojas. Se pesaron 100 mg de la mezcla de hojas y posteriormente el tejido fue macerado en un mortero en presencia de N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. Luego, se agregaron 2 mL de una solución hexano:acetona:etanol (2:1:1) de manera de obtener



una mezcla homogénea. Ésta se traspasó a un tubo de 15 mL y se agitó vigorosamente durante 2 min. Transcurrido ese tiempo el tubo se incubó en hielo y oscuridad por otros 2 min. Luego, se centrifugó a 10.000 g por 10 min a 4°C. Finalmente, los pigmentos se recuperaron de la fase superior formada recolectándolos en tubos de 2 mL. Los tubos obtenidos por muestra fueron secados mediante un Speed-Vac durante 40 min a temperatura media. Una vez secos, las muestras se almacenaron -80°C para posteriormente cuantificar los pigmentos correspondientes. Para esto, las muestras fueron suspendidas en 2 mL de acetona. Se analizaron muestras de 6 plantas por cada una de las líneas PGWB2/*DcLcyb1* y PGWB2 S/I, utilizando además 2 réplicas técnicas por muestra. Durante todo el proceso de extracción, las muestras se mantuvieron en oscuridad y frío.

2.4.7.2 Cuantificación de pigmentos mediante espectrofotometría.

Las muestras de pigmentos obtenidos y suspendidas en acetona en el paso de extracción fueron utilizadas en una primera etapa para la determinación de carotenoides totales mediante la utilización de un espectrofotómetro (Shimadzu). Se midió la absorbancia a distintas longitudes de onda; 474 nm (Absorción de carotenoides principalmente), 645/662 nm (Absorción de las clorofilas *a* y *b*, que es utilizada para determinar su contribución en la medición a 474 nm, tal como se ilustra en la **Figura 3**) y 520/750 nm (Datos necesarios para determinar la turbidez de la muestra y por ende validar los datos obtenidos). Las expresiones utilizadas para determinar las concentraciones de carotenoides totales fueron descritas anteriormente por Lichtenthaler y Buschmann (2001). Todas las mediciones se realizaron en una cubeta de cuarzo y se procuró que los datos de absorbancia se mantuvieran en el rango de 0,3 a 0,85. Para lograr esto se diluyó la muestra cuando fue necesario. Los datos obtenidos

fueron expresados en mg/g de peso seco, para lo que fue necesario estimar el peso seco de cada muestra basado en el factor obtenido luego de someter a 60°C durante 24 h, 1 g de tejido de hoja de tabaco (Lichtenthaler y Buschmann, 2001).

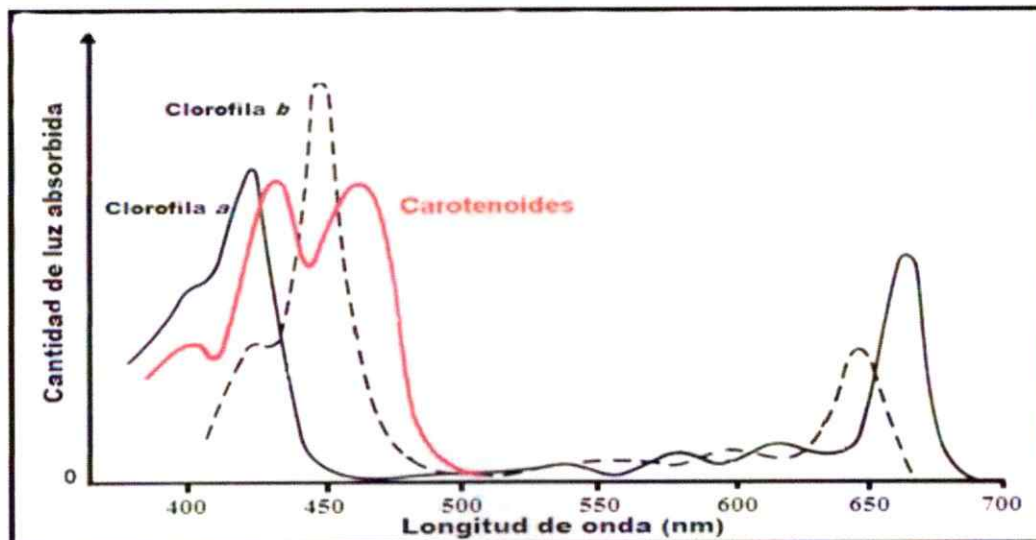


Figura 3 Espectro de absorción de los pigmentos clorofila a, b y carotenoides. En la figura se indican los espectros de absorción de los pigmentos cuantificados en este Seminario de Titulo. Además es posible visualizar que a una medición de absorbancia a 474 nm, las clorofilas contribuyen significativamente a esta medición (especialmente clorofila b). Esta contribución a los carotenoides totales puede ser estimada midiendo la absorbancia de la muestra a 645 (Clorofila b) y 662 (Clorofila a) nm, longitudes a las cuales ningún carotenoide absorbe significativamente.

2.4.7.3 Determinación de la composición de pigmentos mediante RP-HPLC.

Se utilizaron 20 μ L de los pigmentos en acetona obtenidos a partir de la extracción de pigmentos de hojas para el análisis mediante HPLC en fase reversa (RP-HPLC). Este análisis se realizó en una columna MultoHigh 100 RP 18-5 μ (150 x 4,6 mm) y se utilizó una fase móvil compuesta de acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5). Las condiciones cromatográficas consistieron en un flujo de 1,5 mL/min y una duración de 60 min. Mediante el análisis de los cromatogramas obtenidos a una longitud de onda de

474 nm, la concentración de pigmentos totales a 474 nm obtenido por espectrofotómetro y según los tiempos de retención, espectros de absorción y grado de pureza de los picos obtenidos, se determinó la concentración de los principales compuestos carotenoides y clorofilas presentes en las muestras. Se analizaron las muestras correspondientes a cada una de las líneas transgénicas analizadas (L14, L15, L16 y S/I) y adicionalmente cada muestra fue analizada con dos replicas técnicas. Los datos se graficaron en GraphPad utilizando un test de T de dos colas, no pareado, $p < 0.05$.

2.4.8 Determinación del efecto de giberelinas en las plantas transgénicas.

2.4.8.2 Ensayo de inhibición de la síntesis de giberelinas.

Se probó que el fenotipo de las plantas transgénicas puede ser revertido mediante el uso de inhibidores específicos de la síntesis de giberelinas. En este caso se utilizó el compuesto AMO1416, el cual reprime la ruta de biosíntesis en pasos tempranos, específicamente las enzimas ent-copalil difosfato sintasa y ent-kaureno sintasa (Kawaide y col., 1997). Para evaluar la concentración a utilizar se hizo una curva de crecimiento en presencia del inhibidor, determinando que la concentración óptima del inhibidor correspondía 100 μM . En placas dispuestas verticalmente con medio de cultivo Murashige Skoog (MS) que contenía 2% (p/v) de sacarosa, AMO1618 (100 μM) y el antibiótico de selección kanamicina (100 mg/L). Después de transcurridos 21 días, se evaluó la biomasa (peso fresco) y largo de raíz. Mientras que en frascos de cultivo con la misma composición descrita anteriormente, se evaluó la biomasa (peso fresco) y área foliar transcurrido 1 mes de crecimiento de las plantas. En ambos casos se midieron estos parámetros en presencia y ausencia del inhibidor AMO1618. Para la medición tanto de largo de raíz como de área foliar se utilizó el programa ImageJ (NIH). Para ambos ensayos se utilizaron 16 plantas por línea, distribuyendo las plantas de la

siguiente manera; 4 plantas por placa y 2 plantas en el caso de los frascos de cultivo. El ensayo fue repetido 2 veces obteniendo los mismos resultados y los datos fueron graficados en GraphPad utilizando un test ANOVA con Post-test de Tukey, $p < 0.05$.

2.4.8.1 Cuantificación del contenido de giberelinas bioactivas.

Para la evaluación del contenido de giberelinas activas (GA1 + GA4) en las líneas transgénicas de *N. tabacum*, se utilizó un equipo de UPLC acoplado a espectrometría de masas. Para esto se utilizaron hojas de plantas T₁ de 1 mes y cada muestra estaba constituida de 200 mg de hojas de una planta independiente, considerando 3 plantas por cada línea transgénica. Este tejido fue liofilizado y colocado en viales de fondo redondo. Posteriormente se procedió a la extracción y purificación de las muestras con 2-3 columnas de extracción en fase sólida (SPE; de fase reversa e intercambio iónico), el uso de estándares internos deuterados (en este caso particular estándares correspondientes a las hormonas GA1 y GA4), y finalmente el análisis mediante UPLC-espectrometría de masas (UPLC acoplada a Q-Exactive, Orbitrap). Este análisis fue realizado en colaboración con el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Adicionalmente, se midieron los niveles de ácido abscísico (ABA) presentes en las muestras enviadas. Cada muestra fue analizada en duplicado y los datos se graficaron en GraphPad utilizando un test de T de dos colas, no pareado, $p < 0.05$.

RESULTADOS

3.1 Expresión de *DcLcyb1* y composición de carotenoides en las líneas T₁ de *N. tabacum* transgénicas.

En primera instancia se evaluó que las líneas transgénicas 14, 15 y 16 de la generación T₁ tuvieran los mismos parámetros moleculares que las líneas parentales T₀, obtenidas anteriormente en nuestro laboratorio (Moreno, 2012). Estos primeros parámetros a evaluar consistieron en la evaluación de la expresión del transgen *Lcyb1* de *D. carota* y la comprobación de que estas líneas poseyeran un aumento en la concentración de carotenoides y clorofilas.

3.1.1 Evaluación de la expresión del gen *DcLcyb1* en las líneas transgénicas de *N. tabacum*.

Para evaluar los niveles de transcrito del transgen *Lcyb1* de *D. carota* se utilizaron 6 plantas T₁ independientes provenientes de las líneas 14, 15, 16 y S/I (Sin inserto), las cuales fueron escogidas por su resistencia a kanamicina en medio de selección (**Materiales y Métodos, 2.1**). Además, es importante de mencionar que la segregación de las semillas provenientes de las plantas T₀ y T₁ en medio de selección con antibiótico, sugiere que las plantas transgénicas son heterocigotas para el transgen *DcLcyb1* y poseen solo una copia de éste (**Datos no mostrados**). A las plantas seleccionadas, se les extrajo ARN total y mediante qPCR se evaluó los niveles de transcrito del gen *Lcyb1* de *D. carota* en hojas de las líneas de tabaco de 2 meses de edad. Se observó que las tres líneas portadoras de la construcción pGWB2/*DcLcyb1*, es decir las líneas L14, L15 y L16 poseían niveles de expresión significativos respecto a la línea control S/I (**Figura 4**). Además, se observó que la línea 14 posee los niveles más altos de ARNm de *Lcyb1* en comparación al resto de las líneas, alcanzando aproximadamente el doble de

expresión del transgen *Lcyb1* al ser comparada con la línea 15 (**Figura 4**). Por lo tanto, todas las líneas expresan el gen *Lcyb1* de *D.carota* de manera constitutiva (promotor 35S), a excepción de la línea control S/I que correspondían a plantas transformadas con el vector pGWB2 sin inserto (S/I).

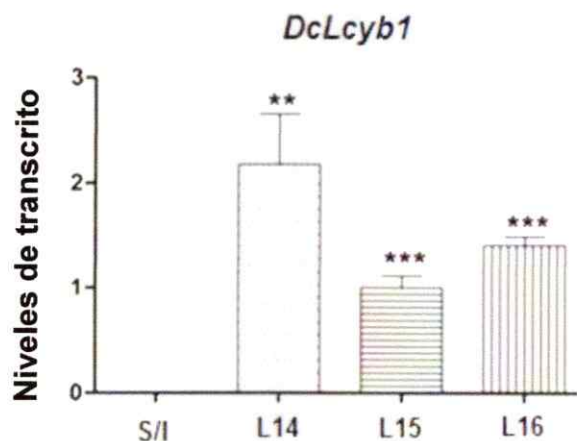


Figura 4 Niveles de expresión de *DcLcyb1* en las líneas transgénicas de tabaco. Se observan los niveles de expresión relativos del gen *Lcyb1* de *D. carota* en hojas de las líneas T₁ transgénicas de tabaco 14, 15 y 16 (2 meses de edad). Cada valor corresponde al promedio de 6 réplicas biológicas y su respectivo error estándar. Los valores de expresión relativa fueron normalizados respecto al gen de *Actina* y se utilizó como calibrador aquella línea que poseía los menores niveles de expresión (Línea L15). Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor comparando siempre con la línea control S/I. Estas diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado. **: p<0.01; *** p<0.001. S/I: Sin inserto.

3.1.2 Determinación del contenido de clorofila y carotenoides en las líneas transgénicas de *N. tabacum*.

Nuevamente con el objetivo de comprobar que las líneas T₁ transgénicas de tabaco (S/I, L14, L15 y L16) tuvieran el mismo comportamiento respecto a la composición y contenido de pigmentos (carotenoides y clorofilas) que las líneas parentales T₀ anteriormente descritas en nuestro laboratorio por Moreno (2012), se realizó una

extracción de pigmentos a hojas de 6 plantas de tabaco de 2 meses para cada línea transgénica analizada (S/I, L14, L15 y L16). Posteriormente, se cuantificaron carotenoides totales y clorofilas mediante espectrofotometría y su composición fue evaluada por RP-HPLC. Los resultados se muestran en la **Figura 5**. En esta se puede observar que al cuantificar los carotenoides totales (carotenos y xantófilas en este caso particular) se evidencia un incremento de aproximadamente 2 veces en las líneas 14, 15 y 16 al ser comparadas con la línea control S/I, alcanzando valores cercanos a los 900 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (**Figura 5A**). Al analizar la composición de carotenoides en las hojas de las distintas líneas de tabaco mediante RP-HPLC, los pigmentos carotenoides más abundantes correspondieron al β -caroteno y la luteína. Respecto a β -caroteno, las líneas transgénicas que poseen el gen *Lcyb1* de *D. carota* poseen un incremento de 2 veces alcanzando valores cercanos a 700 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (**Figura 5B**). En una rama opuesta a la del β -caroteno en la ruta de biosíntesis de carotenoides se encuentra la luteína, la cual también presenta un aumento en las líneas 14, 15 y 16 de entre 1.8 a 2.2 veces, alcanzando una concentración de hasta 150 $\mu\text{g/g}$ de peso seco en la línea 16 (**Figura 5C**).

Por otro lado, también se cuantificó la cantidad de clorofila presente en las hojas de las líneas transgénicas debido a su estrecha relación funcional con los carotenoides, observándose también un incremento de 2 veces en todas las líneas comparadas con la línea S/I, y alcanzando concentraciones cercanas a los 5000 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (**Figura 5D**). En la **Figura 5D** se muestran la cantidad de clorofila *a* y clorofila *b* en todas las líneas; sin embargo, al analizar la concentración de ambas clorofilas por separado se observa que el aumento de clorofila en las hojas de las líneas 14, 15 y 16 se debe principalmente a un aumento en la concentración de clorofila *a* en todas ellas (**Figura Anexa 1**).

Teniendo en cuenta el antecedente de la expresión del transgen y el incremento en la concentración de pigmentos en las líneas 14, 15 y 16, se comprobó que plantas transgénicas de la generación T₁ presentan los mismos parámetros moleculares anteriormente vistos en la generación parental de esas líneas (Moreno, 2012).

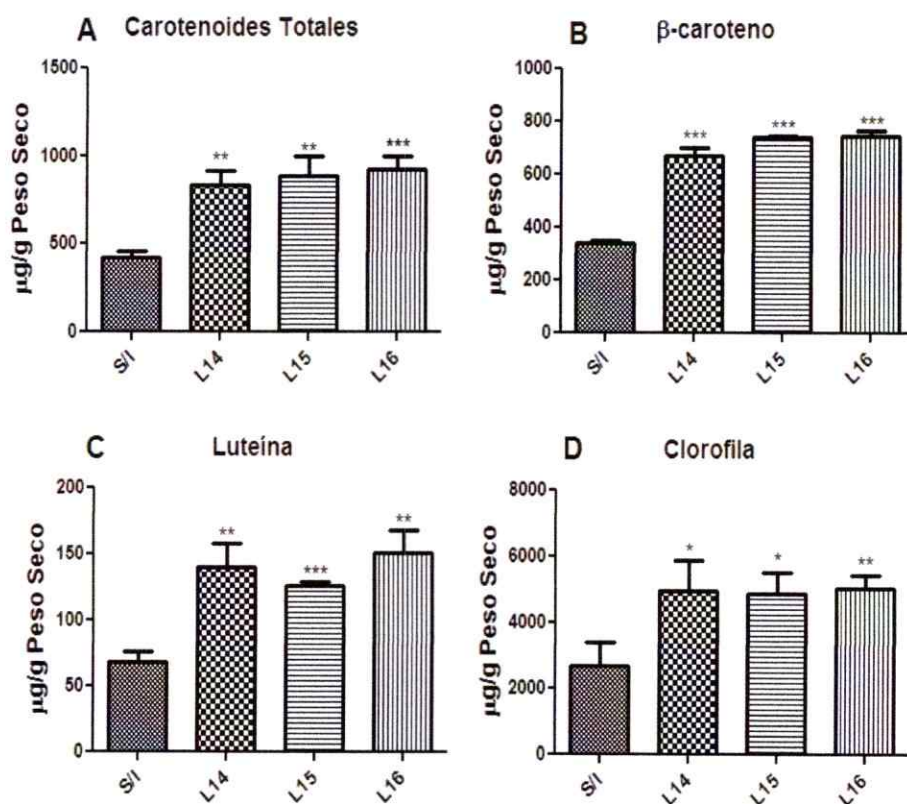


Figura 5 Concentración de pigmentos en las líneas transgénicas de *N. tabacum*. Evaluación mediante espectrofotometría y HPLC de la composición y concentración de pigmentos de plantas T₁ de las líneas S/I, 14, 15 y 16 de *N. tabacum*. Cada barra corresponde a la cuantificación del determinado pigmento utilizando muestras de hojas de tabaco de 2 meses (n=6). **A:** Cantidad de carotenoides totales (carotenos y xantófilas), **B:** Cantidad de β-caroteno, **C:** Cantidad de luteína y **D:** Cantidad de clorofilas, incluyendo clorofila a y b. Los asteriscos indican diferencias significativas comparando con la línea control S/I, estas diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado. *: p<0.05; **: p<0.01; *** p<0.001. S/I: Sin inserto.

3.2 Evaluación de parámetros fisiológicos de *N. tabacum* transformados con la construcción pGWB2/DcLcyb1.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la expresión heteróloga del gen *Lcyb1* de *D. carota* bajo un promotor fuerte y constitutivo en *N. tabacum*, se analizaron distintos parámetros fisiológicos en las líneas T₁ transgénicas (L14, L15 y L16) luego de 3 meses de crecimiento. Para ello, se consideraron diversos parámetros que abarcan tanto el crecimiento vegetativo como reproductivo de las líneas evaluadas. Adicionalmente, con el objetivo de obtener información adicional acerca de las causas de la alteración en los parámetros de crecimiento evaluados debida a la expresión del transgen *DcLcyb1*, se evaluó la biomasa alcanzada y eficiencia fotosintética en las plantas transgénicas de *N. tabacum*.

3.2.1 Medición del crecimiento de las líneas transgénicas.

Las líneas transgénicas fueron evaluadas respecto a altura, diámetro de tallo, distancia internodal, número de hojas, largo y ancho foliar en plantas de 3 meses de edad, utilizándose 7 plantas por cada línea transgénica (Líneas 14, 15, 16 y S/I). Los parámetros evaluados se resumen en la **Tabla III**, y en ella se observa que todas aquellas plantas de tabaco transgénicas portadoras del gen *DcLcyb1* de la generación T₁ (L14, 15 y 16) presentan un incremento general de los parámetros de crecimiento evaluados, a excepción del diámetro del tallo y número de hojas (**Tabla III**) al ser comparadas con la línea control S/I. Respecto a la altura, se observa que las líneas evaluadas presentan un incremento de dos veces al ser comparados con las plantas control (S/I, **Tabla III**). Este incremento en altura, fue acompañado de un aumento de 1.4 veces aproximadamente en la longitud del espacio internodal, así como también de un incremento de 1.4 veces en el largo y ancho de las hojas de las líneas 14, 15 y 16 (**Tabla**

III). El incremento en el largo y ancho de las hojas se manifiesta como un aumento general del área foliar y por ende la envergadura de las líneas 14, 15 y 16 (**Figura 6A**). Por otro lado, se observó una reducción de aproximadamente el 35% en el número de hojas y una mantención del diámetro del tallo en todas las líneas de interés al compararlas con la construcción control (**Tabla III**).

Tabla III Cuantificación de los parámetros de crecimiento de las líneas de tabaco T₁ transgénicas que presentan el gen *Lcyb1* de *D. carota*.

Líneas	Altura (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Largo foliar (cm)	Ancho foliar (cm)	Espacio internodal (cm)	Número de hojas
S/I	28.6 ± 2.9	7.9 ± 0.6	13.4 ± 1.1	7.8 ± 0.5	2.1 ± 0.2	21.9 ± 1,2
L14	55.8 ± 6.1***	7.5 ± 0.5	19.2 ± 0.8***	11.2 ± 1.0***	3.0 ± 0.2***	14.3 ± 1.1***
L15	56.2 ± 4.4***	7.6 ± 0.7	19.0 ± 0.8***	11.2 ± 0.7***	3.0 ± 0.2***	14 ± 1.3***
L16	54.0 ± 4.6***	7.6 ± 0.8	18.7 ± 1.2***	11.0 ± 0.8***	2.9 ± 0.3***	13.9 ± 1.9***

Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor en comparación al valor obtenido con el vector sin inserto (S/I), esta diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado.*** p<0.001. Además se muestra el promedio y su desviación estándar. Los valores significativos han sido destacados en negrita.

Otra diferencia encontrada al comparar las líneas transformadas con el vector sin inserto vector y las líneas 14, 15 y 16, es que las últimas alcanzaron el periodo de floración a los 2 meses y medio de edad aproximadamente (**Figura 6B**). Mientras que en las plantas control el periodo de floración se alcanzó después de los 3 meses; en ambos casos el crecimiento vegetativo de las plantas se detuvo una vez éstas florecieron. Al detenerse el crecimiento vegetativo, se procedió a medir aquellos parámetros relacionados con el crecimiento reproductivo de las plantas de tabaco transgénicas, utilizando nuevamente 7 plantas por línea. Para eso se procedió a evaluar

la cantidad de flores y la producción de semillas total o por capsula (**Tabla IV**). Respecto a estos parámetros, todas las líneas evaluadas presentaron un aumento en la cantidad de flores y el peso total de semillas al ser comparados con las plantas transformadas con el vector sin inserto (**Tabla IV**). La cantidad de flores en las líneas evaluadas (14, 15 y 16) aumentó alrededor de un 40% y el peso total de las semillas lo hizo entre un 60 a 75%. No obstante, al evaluar el peso de las semillas por capsula, solo la línea 14 presentó una diferencia significativa con la línea control (**Tabla IV**)

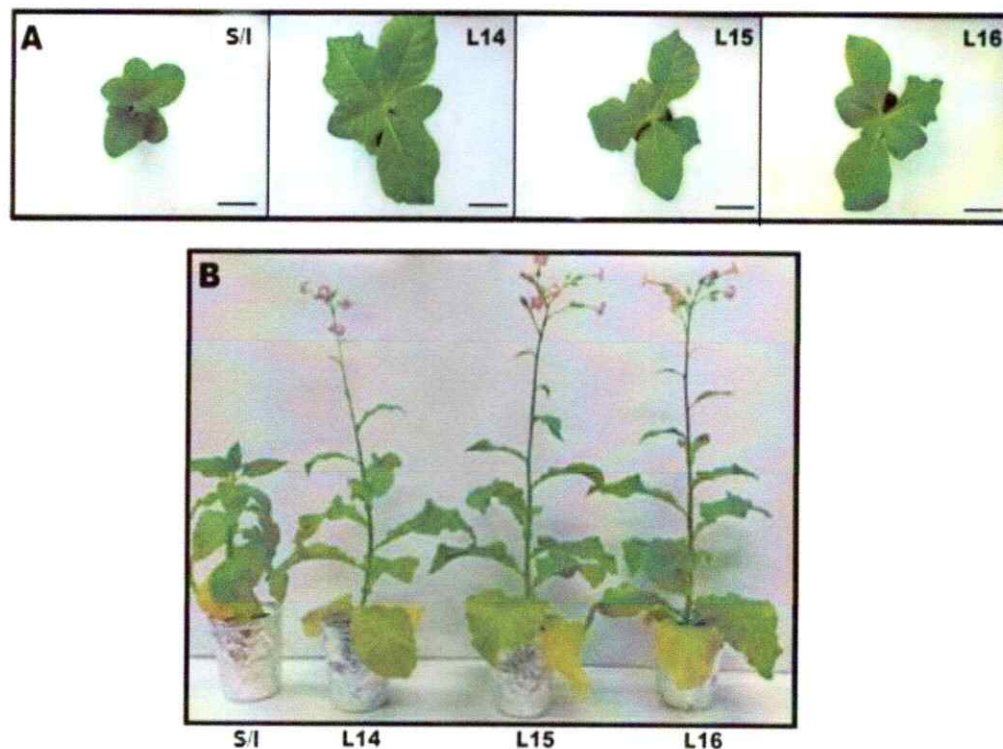


Figura 6 Diferencias entre los parámetros de crecimiento entre líneas transgénicas T1 de tabaco portadoras del gen *Lcyb1* de *D. carota* y planta control S/I. En la figura se observan las principales diferencias, respecto a crecimiento, de las líneas 14, 15 y 16 en comparación a la planta control S/I. En **A** se muestra las diferencias relacionadas con el ancho y largo de las hojas (2 meses de edad). Además se indica una escala equivalente a 10 cm (recta negra). Mientras que en **B** se muestran las diferencias tanto en altura como tiempo de floración (2 meses y medio de edad).

Tabla IV Comparación de los parámetros reproductivos entre plantas de tabaco T₁ que portan el vector pGWB2 sin inserto y las líneas transgénicas con el gen *DcLcyb1*.

Líneas	Número de Flores	Peso semillas total (g)	Peso semillas por capsula (g)
S/I	16.0 ± 2.2	0.8 ± 0.3	0.055 ± 0.019
L14	22.9 ± 5.2**	1.3 ± 0.2**	0.088 ± 0.016*
L15	23.7 ± 4.3**	1.4 ± 0.3**	0.067 ± 0.015
L16	22.3 ± 4.2**	1.4 ± 0.3**	0.077 ± 0.018

Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor en comparación al valor obtenido con el vector sin inserto (S/I), esta diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado.*: p<0.05; **: p<0.01. Además se muestra el promedio y su desviación estándar. Los valores significativos han sido remarcados en negrita.

3.2.2 Medición de la biomasa de las plantas transgénicas.

Con el objetivo de evaluar si la alteración de los parámetros de crecimiento se explicaba en parte por un aumento de biomasa de las plantas transgénicas, las plantas fueron cosechadas a los 3 meses aproximadamente, inmediatamente después de la evaluación de los parámetros de crecimiento vegetativo y reproductivo. Para esto, se recolectaron hojas y tallos por separado, y posteriormente estos fueron pesados para la determinación de peso fresco y peso seco para cada una de las líneas transgénicas (Tabla V). Todas las líneas transgénicas portadoras del gen *DcLcyb1* presentaron un aumento significativo de aproximadamente 1.6 a 1.8 veces en el peso fresco de tallos, 1.3 a 1.5 veces en el peso fresco de hojas y entre 1.4 a 1.7 veces en el peso fresco total (Tabla V). Con respecto al peso seco evaluado en las líneas 14, 15 y 17, todas ellas no presentaron diferencias significativas en el peso seco de tallos y el peso seco total de la planta a ser comparadas con las plantas control transformadas con el vector sin inserto (Tabla V). Sin embargo, si se observó un aumento de alrededor de 1.4 veces en el peso seco de tallos en las tres líneas comparadas al control (Tabla V).

Tabla V Comparación de la biomasa entre la generación T₁ de plantas transformadas con el vector sin inserto y plantas transgénicas portadoras del gen *DcLcyb1*.

Líneas	Peso Fresco Tallos (g)	Peso Fresco Hojas (g)	Peso Fresco Total (g)	Peso Seco Tallos (g)	Peso Seco Hojas (g)	Peso Seco Total (g)
S/I	11.0 ± 1.8	16.9 ± 2.4	27.5 ± 4.2	1.7 ± 0.2	1.9 ± 0.2	3.7 ± 0.3
L14	19.5 ± 1.6**	26.0 ± 6.1**	45.5 ± 7.5**	2.3 ± 0.2**	2.6 ± 1.0	4.9 ± 1.0
L15	17.9 ± 2.5**	22.0 ± 4.5*	39.9 ± 6.6*	2.3 ± 0.3*	1.9 ± 0.3	4.1 ± 0.6
L16	17.7 ± 1.1***	21.9 ± 5.7*	39.6 ± 5.9*	2.3 ± 0.3*	1.9 ± 0.3	4.1 ± 0.3

Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor en comparación al valor obtenido en plantas con el vector sin inserto (S/I), esta diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado. *: p<0.05; **: p<0.01; *** p<0.001. Además se muestra el promedio y su desviación estándar. Los valores significativos han sido destacados en negrita

Los parámetros de crecimiento vegetativo, reproductivo y biomasa se midieron nuevamente en la generación T₂ de plantas transgénicas, con el objetivo de demostrar que los cambios en estos parámetros eran heredables, obteniéndose resultados similares (Tablas Anexas: IA y IIA).

3.2.3 Medición de eficiencia fotosintética.

Debido al incremento general de parámetros de crecimiento vegetativo y reproductivo en las líneas 14, 15 y 16 (Tablas III, IV y V), se decidió medir algún parámetro fotosintético que pudiera dar cuenta de este comportamiento. Esto teniendo en cuenta además que todas las líneas transgénicas analizadas presentaban un incremento en clorofilas y carotenoides (Figura 5), pigmentos esenciales para el proceso de fotosíntesis. Es por esto, que en plantas de 3 meses de edad se midió el cociente F_v/F_m , el cual permite explicar variaciones en la eficiencia fotosintética en términos de la fluorescencia de la clorofila (Tabla VI). Se puede observar que todas las líneas

transgénicas PGWB2/*DcLcyb1* de tabaco analizadas presentan una eficiencia fotosintética significativamente mayor que la línea control (Tabla VI)

Tabla VI Comparación de la eficiencia fotosintética entre plantas de tabaco T₁ que portan el vector pGWB2 sin inserto y las líneas transgénicas con el gen *DcLcyb1*.

Líneas	F _v /F _m
S/I	0.745 ± 0.10
L14	0.861 ± 0.02^{**}
L15	0.841 ± 0.03[*]
L16	0.866 ± 0.01^{**}

Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor en comparación al valor obtenido en plantas con el vector sin inserto (S/I), esta diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado.*: p<0.05; **: p<0.01. Además se muestra el promedio y su desviación estándar. Los valores significativos han sido remarcados en negrita.

3.3 Evaluación de la expresión de genes carotenogénicos y otros genes endógenos relacionados a la ruta.

Con el objetivo entregar antecedentes respecto al fenotipo observado en las líneas 14, 15 y 16, se procedió a evaluar los niveles de transcrito, mediante qPCR, de distintos genes carotenogénicos y otros genes endógenos que podrían estar relacionados a la ruta de biosíntesis de carotenoides. Para esto, se extrajo ARN total a partir de hojas de tabaco de 2 meses de edad de las líneas transgénicas S/I, L14, L15 y L16. Posterior a la eliminación de ADN genómico remanente y evaluación de la calidad del ARN obtenido, se procedió a la síntesis de ADNc (**Materiales y Métodos, 2.4.3**). Para verificar tanto la calidad como la uniformidad respecto a la concentración del ADNc de cada muestra, se amplificó mediante PCR un fragmento de 156 pb correspondiente al gen de *actina* de *N. tabacum*, encontrándose que todas las muestras analizadas presentaban una amplificación homogénea del fragmento. En paralelo se demostró que ninguna de las muestras de ARN total utilizadas para la síntesis de ADNc presentaba

remanentes de ADN genómico (**Datos no mostrados**). Para la evaluación de los niveles de transcrito de los genes de interés mediante qPCR se diseñaron partidores específicos a cada uno de ellos (**Materiales y Métodos, Tabla I**). Los genes evaluados corresponden a aquellos claves en la síntesis de pigmentos carotenoides (*Psy1*, *Psy2* y *Lcyb*), genes involucrados en la síntesis de clorofila (*Chl*), giberelinas (*Cps* y *Ks*) y en la síntesis de la fitohormona ABA (*Nced*). También se evaluó la expresión de genes involucrados en la síntesis de precursores metabólicos comunes a las rutas anteriormente mencionadas como lo son el gen *Dxs* y *Ggpps*. La inclusión de genes relacionados con la biosíntesis de carotenoides viene dada porque anteriormente en nuestro laboratorio se había demostrado que la sobreexpresión del gen *Lcyb1* en *D. carota* altera la expresión de los genes endógenos *Psy1*, *Psy2* y *Lcyb2* (Moreno y col., 2013) mientras que la expresión de este mismo gen en la generación T₀ de las líneas transgénicas de *N. tabacum* también alteraba los genes aquí evaluados (Moreno, 2012). Además, diversas estrategias biotecnológicas que buscan aumentar el contenido de carotenoides en organismos vegetales, han demostrado empíricamente que los genes que codifican las enzimas PSY y LCYB dirigen puntos claves en la ruta carotenogénica, ya que corresponden a pasos limitantes en la producción de pigmentos carotenoides (Bramley, 2002). Por otro lado, se incluyó el gen codificante de la clorofila sintasa (*Chl*), debido a su estrecha relación funcional con carotenoides y al antecedente de las líneas evaluadas que presentaban un aumento considerable en la cantidad de clorofilas (**Figura 5D**). La enzima clorofila sintasa (CHL) participa en los últimos pasos de la ruta de biosíntesis de clorofilas y ha sido ampliamente descrita como uno de los pasos limitantes en la síntesis de éste pigmento (Tanaka y Tanaka, 2007). Junto con esto, también se han descrito mecanismos de retroalimentación positiva que involucran la expresión del gen *Chl* con la regulación de la biosíntesis de clorofilas (Shalygo y col., 2009).

Por otro lado, y en busca de encontrar una relación entre los niveles de transcrito del gen *DcLcyb1* y el aumento en los parámetros de crecimiento aquí cuantificados, se evaluó la expresión de dos genes involucrados en la biosíntesis de giberelinas (*Cps* y *Ks*), dado el rol de esta fitohormona en el crecimiento vegetativo y reproductivo de las plantas y que comparten precursor en común con la síntesis de carotenoides. Si bien, los pasos limitantes en la biosíntesis de giberelinas no han sido identificados (Gupta y Chakrabarty, 2013), los genes *Cps* y *Ks* codifican las enzimas involucradas en los primeros pasos de la ruta y están altamente reguladas durante el desarrollo de las plantas, por lo que han sido descritas como un potencial punto de regulación de los niveles de GAs bioactivas (Fleet y col., 2003). La inclusión del gen *Nced* viene dada principalmente a que el β -caroteno (compuesto sintetizado por LCYB1) corresponde a un precursor del ABA. La enzima NCED cataliza la degradación oxidativa de la 9'-cis-neoxantina o 9-cis-violaxantina para formar xantonina, el cual es el paso limitante en la biosíntesis de ABA (Nambara y Marion-Poll, 2005). Finalmente, los genes *Dxs* y *Ggpps* codifican enzimas plastidiales esenciales para el desarrollo de plantas y requeridas para la producción de los principales grupos de isoprenoides plastidiales, vale decir: carotenoides, giberelinas, clorofilas, tocoferoles, filoquinonas y plastoquinonas (Ruiz-Sola y col., 2015). Además, ambos genes han sido descritos como limitantes en la biosíntesis de precursores de isoprenoides (Misawa, 2011). Para todos estos genes se evaluó la cantidad relativa del ARNm para comparar su expresión entre la línea control *S/l* que carecía del gen *Lcyb1* de *D. carota* y aquellas líneas transgénicas portadoras del gen *DcLcyb1* (L14, L15 y L16).

Respecto a los genes carotenogénicos endógenos, se observó que en general en las líneas 14, 15 y 16, existe una inducción significativa o una tendencia clara al aumento en los niveles de transcrito de los genes *Psy1*, *Psy2* y *Lcyb* al ser comparados con la línea control S/I (**Figura 7**). El aumento en la cantidad del ARNm correspondiente a los genes carotenogénicos endógenos *Psy1*, *Psy2* y *Lcyb1*, es alrededor de 2 a 5 veces, 1.5 a 3 veces y 1.5 a 3 veces, respectivamente (**Figura 7**). Esta inducción generalizada de los genes carotenogénicos anteriormente mencionados se acentúa en el caso de la línea 15, la cual posee los niveles más altos de cantidad de ARNm (**Figura 7**).

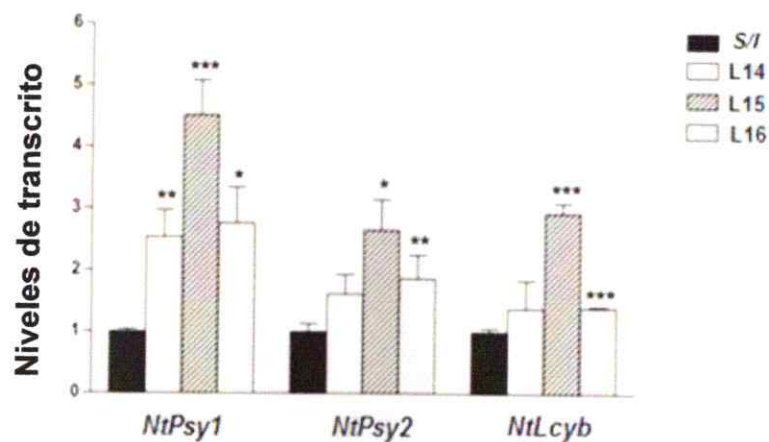


Figura 7 Niveles de expresión de los genes carotenogénicos claves en hojas de las líneas transgénicas de tabaco. En la figura se observan los niveles de expresión relativos de los genes endógenos *Psy1*, *Psy2* y *Lcyb* en las líneas transgénicas de tabaco. Cada valor corresponde al promedio de 6 plantas independientes por línea analizada y su respectivo error estándar. Los valores de expresión relativa fueron normalizados respecto al gen de *Actina* y en cada gráfico se utilizó como calibrador aquella línea que poseía los menores niveles de expresión (Línea S/I). Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor comparando siempre con la línea control S/I. Estas diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. S/I: Sin inserto.

Por otro lado se analizaron los niveles de transcrito de genes de rutas relacionadas a la biosíntesis de carotenoides y genes involucrados en la síntesis de

precursores comunes a estas rutas (**Figura 8**). En el caso del gen que codifica la clorofila sintasa (*Chl*), enzima encargada de la síntesis de clorofila, éste se encuentra inducido alrededor de 1.5 veces en todas las líneas transgénicas analizadas (**Figura 8D**), lo que se relaciona con el aumento del contenido de clorofilas observado en la **Figura 5**. Aquellos genes involucrados en la síntesis de giberelinas, como aquellos que codifican la ent-copalil difosfato (*Cps*) y ent-kaureno sintasa (*Ks*), también se encuentran inducidos en las líneas 14, 15 y 16 (**Figura 8E y F** respectivamente). En el caso de *Cps*, éste se encuentra inducido alrededor de 1.5 veces en las líneas portadoras del gen *DcLcyb1* (**Figura 8E**), mientras que en el caso del gen *Ks*, la inducción es variable fluctuando entre 2 (L14) a 7 veces (L16) de inducción (**Figura 8F**). Además, se decidió evaluar los niveles de transcrito de genes directamente involucrados en la síntesis de ácido abscísico como el gen que codifica la enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (*Nced*); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al ser comparado con la línea control S/I (**Figura 8G**). Respecto a los genes involucrados en la síntesis de precursores comunes a la biosíntesis de carotenoides, clorofilas y giberelinas, entre otras, se analizaron los niveles de transcrito de los genes que codifican las enzimas 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (*Dxs1* y *Dxs2*) y geranylgeranyl difosfato sintasa (*Ggpps*). En el caso del gen *Ggpps*, se analizó la expresión conjunta de 4 parálogos de *N. tabacum* (*Ggpps1*, *Ggpps2*, *Ggpps3* y *Ggpps4*). Los niveles de transcrito de éstos, en promedio, están inducidos aproximadamente 2 veces en las líneas 15 y 16 (**Figura 8C**). Por otro lado, la cantidad de ARNm del gen *Dxs1* no presentó diferencias significativas en ninguna de las líneas al ser comparadas con la línea control S/I (**Figura 8A**), mientras que el gen *Dxs2* se encontró inducido alrededor de 1.5 veces en las 3 líneas transgénicas (**Figura 8B**).



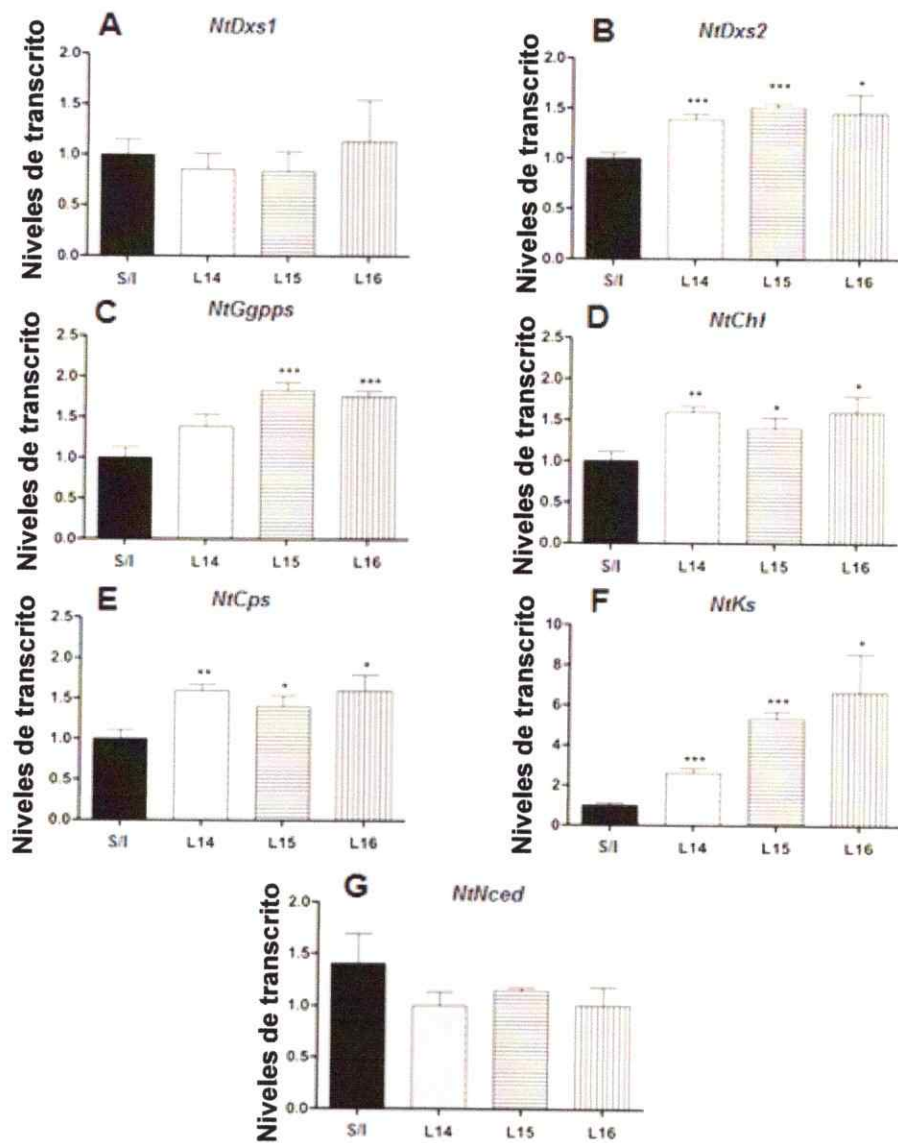


Figura 8 Niveles de expresión de genes clave en la biosíntesis de clorofila, giberelinas, ABA y precursores comunes a estas rutas. (A-G) Expresión relativa de genes involucrados en rutas relacionadas directa o indirectamente a la biosíntesis de carotenoides en hojas de tabaco de las líneas transgénicas (S/I, L14, L15 y L16). Los genes correspondientes salen indicados sobre cada gráfico. Cada valor corresponde al promedio de 6 plantas independientes por cada línea analizada y su respectivo error estándar. Los valores de expresión relativa fueron normalizados respecto al gen de *Actina* y en cada grafico se utilizó como calibrador la línea control S/I. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor comparando siempre con la línea control S/I. Estas diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. S/I: Sin inserto.

3.4 Evaluación del efecto de giberelinas en las plantas transgénicas.

Para relacionar el aumento en los parámetros de crecimiento cuantificados (Tabla III, IV y V) y la inducción de aquellos genes involucrados en la biosíntesis de giberelinas (Figura 8E y F), se procedió a determinar el efecto de las giberelinas (GAs) mediante el uso de inhibidores específicos de la ruta de biosíntesis de giberelinas y a evaluar directamente la concentración de ellas en las líneas transgénicas.

3.4.1 Ensayo de inhibición de la síntesis de giberelinas.

Para evaluar si el fenotipo observado en las líneas 14, 15 y 16 se debe en parte a un aumento en el contenido de giberelinas, se utilizó el compuesto AMO1618. Este compuesto corresponde a un inhibidor específico de la síntesis de giberelinas en pasos tempranos de la ruta de síntesis (Kawaide y col., 1997). En placas dispuestas verticalmente, se observó el crecimiento de las líneas transgénicas de tabaco (S/I, L14, L15 y L16) transcurridos 21 días y comparando placas con inhibidor (100 μ M de AMO1618) y sin inhibidor (Control). Los principales parámetros evaluados en este experimento correspondieron a biomasa total (peso fresco) y largo de raíz. Los resultados se ilustran en la Figura 9. Respecto al peso fresco, en general se observa que todas las líneas transgénicas evaluadas (S/I, L14, L15 y L16) presentaron una disminución significativa al ser crecidas en presencia del inhibidor AMO1618 (Figura 9A). Además, se muestra que el peso fresco de las líneas S/I en presencia de inhibidor es significativamente menor que el resto de las líneas en la misma condición (L14, L15 y L16), siendo estas últimas (en particular las líneas L14 y L15) similares al peso fresco de la línea S/I en ausencia de AMO1618 (Figura 9A). Interesantemente se observa también que a los 21 días de crecimiento las líneas transgénicas portadoras de la construcción pGWB2/DcLcyb1 ya presentan un incremento de más de 2 veces en el

peso fresco total en comparación a las líneas controles (**Figura 9A**). Por otro lado y en relación al tamaño de la raíz principal, todas las líneas presentaron una disminución cercana al 50% al ser expuestas al inhibidor de síntesis de giberelinas (**Figura 9B**). Sin embargo, no se observaron diferencias entre líneas tanto en presencia como ausencia de inhibidor (**Figura 9B**).

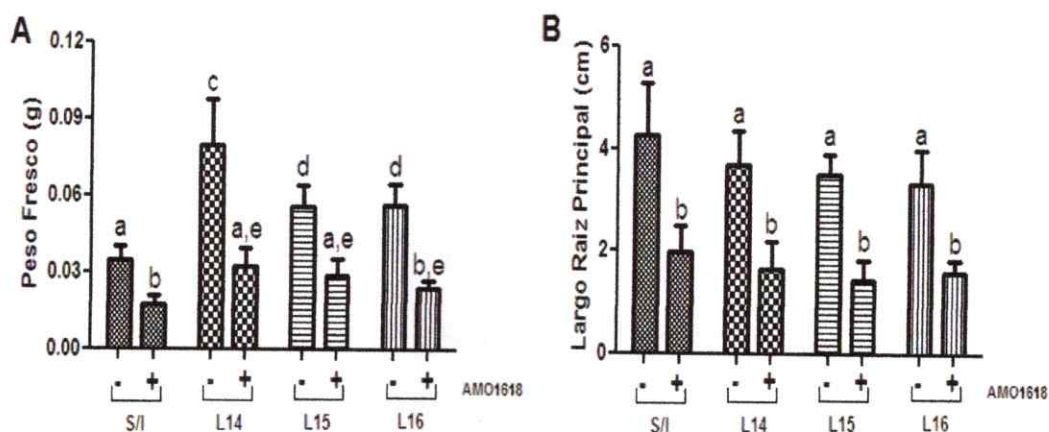


Figura 9 Ensayo de inhibición de la biosíntesis de giberelinas en plantas de 21 días de edad. En la figura se muestran los resultados obtenidos al crecer las líneas transgénicas en ausencia o presencia del inhibidor AMO1618 (100 μ M) en placas dispuestas verticalmente durante 21 días. En **A** se observa el peso fresco de cada una de las líneas en ambas condiciones, mientras en **B** se muestra el largo de raíz principal para cada una de las líneas evaluadas en ambas condiciones. En este ensayo se utilizaron 16 plantas por línea y los datos se graficaron en GraphPad utilizando un test ANOVA con Post-test de Tukey, $p < 0.0001$ (letras a, b, c, d y e en **A**, mientras que a y b en **B**). S/I: sin inserto.

Por otro lado y con el objetivo de cuantificar los efectos del inhibidor AMO1618 en el área foliar, se colocaron las líneas recién analizadas en frascos de cultivo en presencia ó ausencia del inhibidor (**Figura 10**). Transcurrido aproximadamente 1 mes de crecimiento se evaluó área foliar y biomasa (peso fresco) (**Figura 10B y C**, respectivamente). En la **Figura 10A** es posible observar que luego de 1 mes de crecimiento, las líneas 14, 15 y 16 poseen un área foliar evidentemente mayor. También

se hace evidente la reducción del área foliar en todas las líneas al aplicar el inhibidor AMO1618 (100 μ M). Esto es confirmado cuantitativamente en la **Figura 10B**, donde se muestra que el inhibidor AMO1618 disminuye el área foliar de todas las líneas analizadas y que al mes de crecimiento en ausencia de inhibidor las líneas que poseen el gen *Lcyb1* de *D. carota* poseen un incremento en el área foliar de entre 1.3 a 1.6 veces. Además, se observa que el área foliar en presencia de inhibidor en las líneas 14, 15 y 16 alcanza niveles similares a la línea S/I en ausencia de inhibidor de síntesis de giberelinas (**Figura 10B**). Por otro lado, al observar el efecto de AMO1618 en el peso fresco de la planta (**Figura 10C**), se observa prácticamente el mismo efecto observado en las plantas crecidas verticalmente durante 21 días (**Figura 9A**). En ambos experimentos de inhibición se graficó el porcentaje de disminución de cada uno de los parámetros evaluados, tomando en consideración las condiciones con y sin inhibidor AMO1618 (**Figura A3**), observándose en todos los caso una disminución del parámetro observado cercana al 50% tanto en las líneas S/I como las líneas transgénicas portadoras del gen *DcLcyb1*. Por lo tanto, de los ensayos de inhibición solo es posible sugerir el rol de las giberelinas en el fenotipo observado pero no es posible afirmar de forma directa el rol de las enzimas afectadas por el inhibidor (KS y CPS) y el contenido de giberelinas bioactivas en los tejidos analizados.

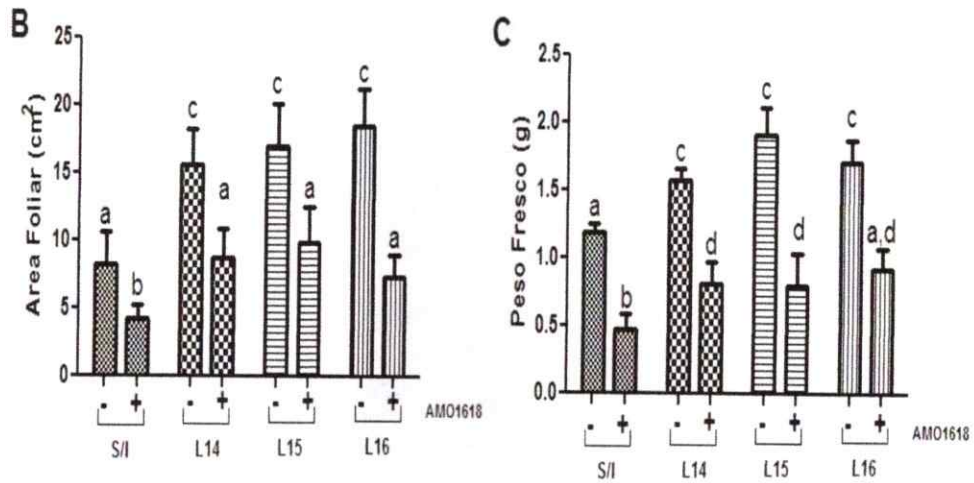
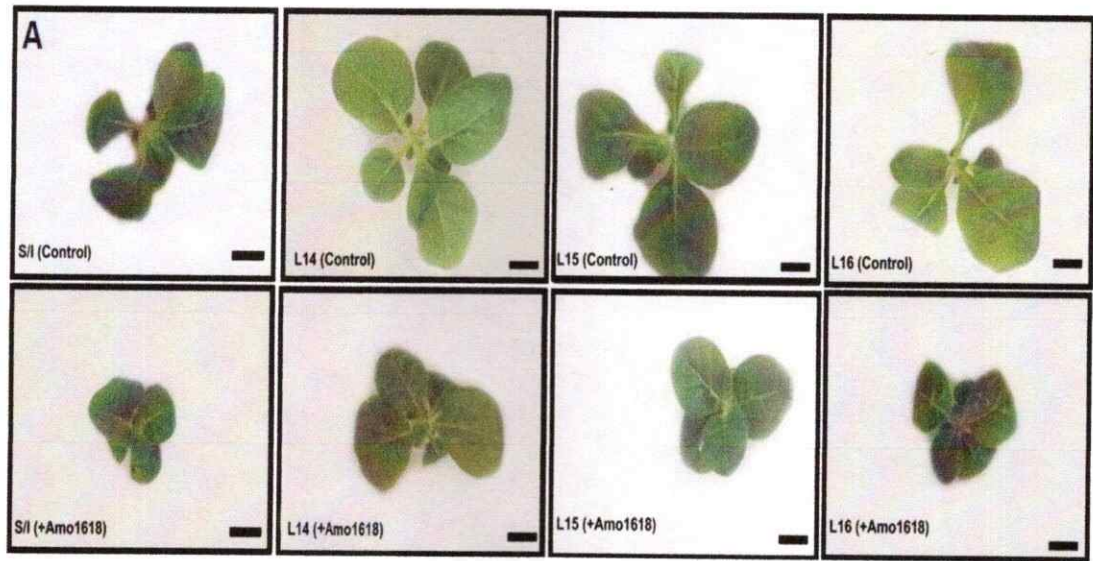


Figura 10 Ensayo de inhibición de la biosíntesis de giberelinas en plantas de 1 mes. En la figura se muestran los resultados obtenidos al crecer las líneas transgénicas en ausencia o presencia del inhibidor AMO1618 (100 μ M) en frascos de cultivo durante 1 mes. En **A** se muestran fotografías representativas de las distintas líneas transgénicas en ausencia (Control) y presencia (+AMO1618) del inhibidor de síntesis de giberelinas. Además se indica una escala equivalente a 2 cm (recta negra). En **B** se muestra el área foliar de cada una de las líneas en ambas condiciones, mientras que en **C** se muestra el peso fresco para cada una de las líneas evaluadas en ambas condiciones. En este ensayo se utilizaron 16 plantas por línea y los datos se graficaron en GraphPad utilizando un test ANOVA con Post-test de Tukey, $p < 0.0001$ (letras a, b y c en **B**, mientras que a, b, c y d en **C**). S/I: sin inserto

3.4.2 Cuantificación del contenido de giberelinas bioactivas.

Posteriormente, para corroborar la participación de las giberelinas en el fenotipo de las líneas transgénicas de *N. tabacum*, se procedió a evaluar el contenido de giberelinas activas (GA1 + GA4) en las líneas 14, 15, 16 y S/I. Esto fue evaluado en hojas de 3 plantas independientes de 1 mes por cada línea, en las cuales el fenotipo descrito anteriormente (Figura 6), ya era evidente. Para la cuantificación se utilizó una cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) acoplado a espectrometría de masas y los resultados son ilustrados en la Figura 11.

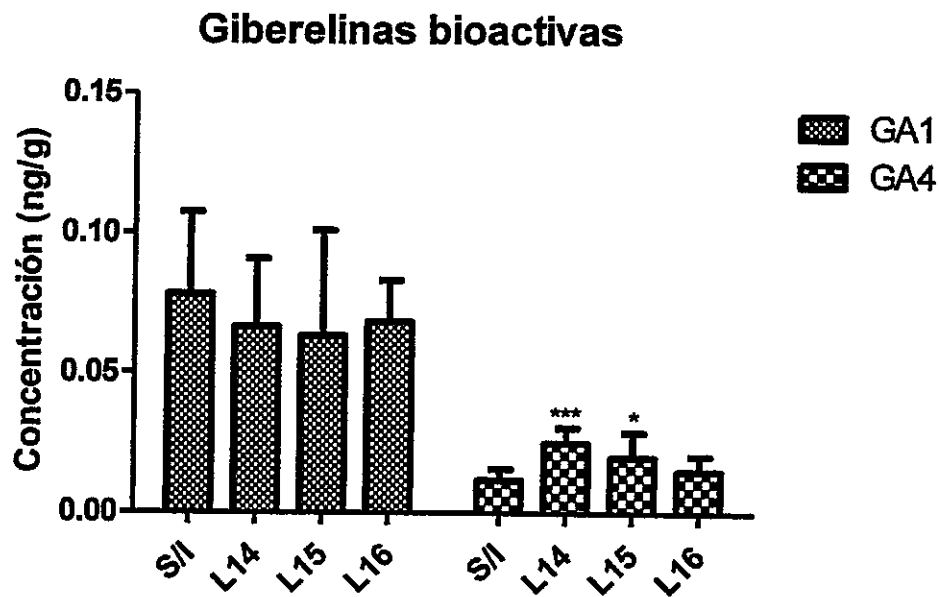


Figura 11 Concentración de giberelinas bioactivas en las plantas transgénicas de *N. tabacum*. En la figura se observa la concentración de giberelinas bioactivas (GA1 y GA4) en plantas transformadas con el vector sin inserto y plantas transformadas con la construcción pGWB2/DcLcyb1. Se utilizaron hojas de plantas de tabaco de 1 mes de edad. En este análisis se utilizaron 3 plantas independientes por línea transgénica y 2 réplicas técnicas. Los datos se graficaron en GraphPad y los datos fueron comparados respecto a la línea S/I utilizando un test de T de dos colas, no pareado, *: $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. S/I: sin inserto.

En la **Figura 11**, se observa que no existen cambios significativos en GA1 en hojas de plantas de 1 mes al ser comparados con la planta control (S/I). Por otro lado, respecto a GA4 se observaron cambios en la concentración de esta hormona en las líneas 14 y 15 de 2.1 y 1.7 veces, respectivamente, mientras que en la línea 16 los cambios no son estadísticamente significativos (**Figura 11**). Adicionalmente y utilizando el mismo tejido vegetal analizado, se midió también la concentración de ácido abscísico (ABA) presente en las plantas de tabaco transgénicas (**Figura Anexa 2**), no encontrándose diferencias en ninguna de las líneas transgénicas pGWB2/DcLcyb1 al ser comparadas con la línea sin inserto. Por lo tanto, se corrobora que todas las líneas transgénicas que portaban el gen *Lcyb1* de *D.carota*, presentan una inducción de genes clave en la síntesis de giberelinas (*Cps* y *Ks*, **Figura 8E** y **F** respectivamente) y junto con esto, un aumento significativo de GA4 ó alteración del fenotipo observado al aplicar el inhibidor AMO1618, sugiriendo fuertemente el rol de esta fitohormona en los parámetros afectados en las líneas 14, 15 y 16.

DISCUSIÓN

En nuestro laboratorio y con el objetivo de alterar el contenido total de carotenoides en *N. tabacum* (tabaco), especialmente β -caroteno, se clonó la secuencia codificante del gen *Lcyb1* de *D. carota* bajo el promotor 35S en el vector de expresión pGWB2 (Moreno, 2012). Se obtuvieron 6 líneas T₀ transgénicas, de las cuales 3 de ellas presentaron particularidades desde el punto de vista molecular y fenotípico (L14, 15 y 16). Estas líneas además de presentar una alta expresión del transgen *DcLcyb1* y alto contenido de carotenoides en comparación a una planta control, presentaron un aumento en tamaño, área foliar, contenido de clorofilas y una floración temprana (Moreno, 2012). Con el objetivo de entender cómo alteraciones en la ruta de biosíntesis de carotenoides puede dar cuenta del fenotipo, plantas T₁ provenientes de estas líneas fueron sometidas a un análisis molecular, fenotípico y fisiológico.

4.1 Las líneas transgénicas de *N. tabacum* que expresan el gen *DcLcyb1* poseen un incremento en el contenido de carotenoides lo que se correlaciona con una inducción en genes carotenogénicos endógenos.

En primera instancia se corroboró que la generación T₁ de las líneas 14, 15 y 16 descritas por Moreno (2012) presentaron los mismos parámetros moleculares anteriormente descritos en su trabajo (Figura 2). Respecto a esto, todas las plantas de las líneas 14, 15 y 16 expresaron el gen *Lcyb1* de *D. carota* (Figura 4) y presentaron un aumento significativo de aproximadamente 2 veces en carotenoides totales, y particularmente: luteína y β -caroteno (Figura 5). Por otro lado, el trabajar con líneas provenientes de la generación T₁ en desmedro de la generación T₀, supone una gran ventaja teniendo en cuenta que la metodología de obtención de estas líneas corresponde a organogénesis somática. Esto se debe principalmente a que éste método de obtención

de líneas transgénicas posee una serie de desventajas que afectan a la generación T₀, entre las cuales se encuentran; anomalías morfológicas y fisiológicas, poliembriónia y la obtención de organismos con una composición celular heterogénea desde el punto de vista genético. Además, si bien no se analizó el número de copias del transgen, todas las plantas antes de ser sembradas en tierra pasaron por placas con medio de selección con kanamicina y la germinación en este medio de las semillas de las plantas utilizadas en este trabajo (T₁ y T₂), sugiere que todas ellas corresponden a plantas heterocigotas con solo una copia del gen *DcLcyb1*, ya que se seleccionaron plantas cuyas semillas segregaran en una razón 3:1 respecto a su resistencia al agente de selección (**Datos no mostrados**). Ahora bien, el hecho que llevó al establecimiento de la hipótesis del presente trabajo es que los carotenoides al ser isoprenoides, son sintetizados en cloroplastos a partir del geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), el cual adicionalmente es utilizado como precursor inmediato de otras rutas biosintéticas de isoprenoides localizadas en cloroplastos, incluyendo entre ellas plastoquinonas (PQ), la cadena fitol de las clorofilas, filoquinonas, tocoferoles y la fitohormona ácido giberélico (GA) (Meier y col., 2011). Por lo tanto, la biosíntesis de importantes fitohormonas (ABA y GA), clorofilas, vitaminas y otros pigmentos esenciales para los plastidios están estrechamente relacionados con los carotenoides. En vista de eso y para apoyar la hipótesis de que la expresión heteróloga del gen *DcLcyb1* en *N. tabacum* podría estar alterando de cierta forma rutas biosintéticas relacionadas se analizó en primera instancia la expresión de aquellos genes endógenos clave en la síntesis de pigmentos carotenoides (*Psy1*, *Psy2* y *Lcyb*). Esto principalmente debido a reportes de que la sobreexpresión de genes carotenogénicos puede dar lugar a mecanismos de retroalimentación positiva que den cuenta de la inducción de genes de la misma ruta (Lindgren y col., 2003; Meier y col., 2011; Nisar y col., 2015). Lo anterior también ha sido

observado en nuestro laboratorio al sobreexpresar el gen *DcLcyb1* en *D. carota* (Moreno y col., 2013) y en las líneas T₀ de *N. tabacum* analizadas en este trabajo (Moreno, 2012). Al observar la expresión del transgen y genes endógenos clave de la ruta de biosíntesis de carotenoides en la generación T₁ de las líneas 14, 15 y 16, se observó que: (i) la expresión del transgen *DcLcyb1* en todas las líneas (a excepción de la línea transgénica transformada con el vector sin inserto, que carece de este gen) es relativamente similar, vale decir, se encuentra en órdenes de magnitud similares (Figura 4) y (ii) que además todas presentaban una inducción de los 3 genes carotenogénicos analizados (Figura 7). Estos resultados confirman lo ya observado en la generación T₀ y sugiere nuevamente la presencia de un mecanismo de regulación positiva en los genes carotenogénicos *Psy* y *Lcyb* mediada por la expresión heteróloga de *DcLcyb1*. Este comportamiento también podría sugerir que a nivel de la ruta carotenogénica podría estar ocurriendo una regulación por aumento de producto, ya sea por el β-caroteno o un compuesto río debajo de este, el cual regularía directa o indirectamente la expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de precursores del β-caroteno (Moreno, 2012).

Ahora bien, la sobreexpresión de genes carotenogénicos en general se ha correlacionado con un aumento del contenido de carotenoides totales (Diretto y col., 2007; Maass y col., 2009; Ahn y col., 2012). Respecto a esto, al evaluar el contenido de carotenoides totales y su composición mediante espectrofotometría y RP-HPLC, se observó un aumento considerable de carotenoides, específicamente de luteína y β-caroteno, en las líneas 14, 15 y 16 (Figura 5). De manera que la expresión del gen *DcLcyb1* en estas líneas de *N. tabacum* produjo cambios metabólicos y una alteración transcripcional de genes carotenogénicos, que en conjunto lleva a un incremento en carotenoides totales y específicos, hecho que también había sido reportado en nuestro

laboratorio en plantas de zanahoria (Moreno y col., 2013). Además, respecto al aumento de carotenoides específicamente de luteína y β -caroteno, (Figura 5), β -caroteno corresponde un precursor directo de zeaxantina que en conjunto con luteína son las principales xantófilas que componen los fotosistemas vegetales, lo que podría explicar en parte el aumento en la eficiencia fotosintética de las líneas 14, 15 y 16 (Tabla VI). Además, los carotenoides también han sido descritos como estabilizadores de membrana en cloroplastos, específicamente aquellos que corresponden a xantófilas que, junto con otros terpenoides, estabilizan y protegen del daño oxidativo la fase lipídica de las membranas tilacoidales (Havaux, 2014).

4.2 Las líneas transgénicas de *N. tabacum* que expresan el gen *DcLcyb1* poseen un incremento en el contenido de clorofila lo que se correlaciona con un aumento en la eficiencia fotosintética.

Todos los antecedentes obtenidos en este trabajo respecto a los parámetros fisiológicos de las líneas transgénicas, no pueden ser explicados solo por alteraciones en la ruta de biosíntesis de carotenoides, sino más bien con otras rutas de biosíntesis directamente relacionadas con la fotosíntesis y crecimiento de la planta que podrían estar influyendo positivamente en el fitness de las líneas transgénicas de tabaco. Siguiendo esta línea, al realizar cuantificación de los pigmentos totales de las líneas por espectrofotometría y RP-HPLC, interesantemente se observó un aumento de clorofilas totales en las líneas 14, 15 y 16 (Figura 5), específicamente de clorofila *a*, ya que los niveles de clorofila *b* no fueron afectados (Figura Anexa 1). Como se mencionó anteriormente, tanto carotenoides como clorofilas desempeñan un rol fundamental en el ensamblaje de los complejos captadores de luz, siendo el complejo captador de luz II (LHC-II) la principal estructura que une estos pigmentos en las membranas de

cloroplastos (Telfer, 2014). Este complejo une clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides (Kusaba y col., 2007; Pilkington y col., 2012). A causa de que carotenoides junto con clorofilas son componentes esenciales de estos complejos de membrana, el ensamblaje de éstos depende de la presencia de ambos (Sagar y Briggs, 1990). Por lo tanto, no es raro que los sistemas vegetales hayan desarrollado sistemas capaces de coordinar y regular la síntesis de carotenoides y clorofilas con tal de asegurar el desarrollo de la planta (Toledo-Ortiz y col., 2010). Una de los posibles mecanismos que puede explicar esta coordinación corresponde a respuestas de señalización retrograda provenientes desde el núcleo, generados en respuesta a una señalización intracelular mediada por cloroplastos (Chi y col., 2015). Esta señalización, no solo coordina la expresión de genes nucleares y plastidiales, sino que además es esencial para la biogénesis de los plastidios y por ende; su estructura y composición (Chi y col., 2015). En estos últimos años, muchos estudios se han enfocado en la búsqueda de la identidad de estas señales retrogradadas, y entre ellas se han propuesto la participación de diversos compuesto carotenoides o derivados de ellos. Entre estas señales se ha propuesto al β -ciclocitral, compuesto derivado de la oxidación de los carotenoides, que posee la particularidad de ser volátil y soluble en membranas (Ramel y col., 2012). Por otro lado, también se ha demostrado que una molécula derivada de la degradación de los carotenoides es capaz de regular el desarrollo foliar y la expresión de genes nucleares codificantes de proteínas plastidiales (Avendano-Vazquez y col., 2014). De manera que se ha propuesto que esta molécula, aun no identificada y que requiere de la acción de enzimas clivadoras de carotenoides (en particular de CCD4), podría estar regulando la estructura y composición de los cloroplastos (Avendano-Vazquez y col., 2014). A pesar de todos los antecedentes a favor de la existencia de una molécula capaz de permitir la comunicación entre síntesis de clorofila y carotenoides (Chi y col., 2015), esta señal retrograda y los mecanismos

que le permitirían ejercer este rol, aún no han sido identificados. En el mismo contexto, este trabajo y el realizado anteriormente en nuestro laboratorio (Moreno, 2012; Moreno y col., 2013), también apoyan la síntesis coordinada entre carotenoides y clorofilas. Esto no solo se observa en la ya mencionada cuantificación de clorofilas por espectrofotometría y RP-HPLC (Figura 5), sino que también por el aumento en la expresión de genes endógenos relacionados directamente con la síntesis de clorofila (*Chl*, Figura 8D). Por otro lado, en las 3 líneas estudiadas (L14, 15 y 16), la eficiencia fotosintética explicada en términos de F_v/F_m fue significativamente mayor al ser comparadas con las líneas controles transformadas con el vector pGWB2 sin inserto (Tabla VI). Ahora bien, el aumento de la eficiencia fotosintética puede ser explicado como una consecuencia directa del aumento del contenido de carotenoides y clorofila (Figura 5), pues ambos desempeñan un rol estructural fundamental en el ensamblaje de los complejos cosechadores de luz en plantas (Nisar y col., 2015; Pogson y col., 2015). Además, paralelamente a este trabajo se demostró que la alteración de la expresión de un gen carotenogénico en *N. tabacum*, como es el caso del gen *Lcye* (Figura 1), tiene como consecuencia un aumento en el contenido de carotenoides y un aumento concomitante de la eficiencia fotosintética (Shi y col., 2014). Esto concuerda con la evidencia de que el flujo hacia cada una de las ramas de la ruta de biosíntesis de carotenoides puede ser alterada por manipulación de la expresión de los genes licopeno ciclasa o la actividad de las enzimas codificadas por ellos (Yu y Beyer, 2012; Giorio y col., 2013). Por lo tanto, en el trabajo de Shi y col. (2014), al igual que en el presente trabajo, se obtuvo un aumento en el contenido de clorofila y carotenoides totales (Figura 5) asociado a un aumento en la eficiencia fotosintética (Tabla VI). Sin embargo, en nuestro caso este aumento viene dado por la alteración de la ruta de biosíntesis de

carotenoides mediado por la expresión heteróloga de *DcLcyb1* en *N. tabacum*, gen responsable directo de la síntesis de β -caroteno.

4.3 Las líneas transgénicas de *N. tabacum* poseen un incremento en parámetros de crecimiento y biomasa.

Para obtener más antecedentes cuantitativos que caracterizaran el fenotipo de las líneas transgénicas transformadas con el gen *DcLcyb1*, se evaluaron distintos parámetros fisiológicos en las líneas transgénicas de tabaco, observándose un claro incremento en el crecimiento vegetativo y reproductivo (Tabla III y IV). En el caso de los parámetros de crecimiento vegetativo, se obtuvo un aumento significativo en la altura, área foliar y distancia internodal, aunque el diámetro del tallo permaneció invariable y el número de hojas disminuyó en un 35% (Tabla III). Respecto a los parámetros de crecimiento reproductivo de las líneas 14, 15 y 16 de *N. tabacum*, el fenotipo más evidente correspondió a la floración temprana de las líneas transgénicas, ya que las plantas controles florecieron después de los 3 meses, mientras que todas las plantas T₁ provenientes de las líneas 14, 15 y 16, lo hicieron a los 2 meses y medio (Figura 6). Este adelanto en la floración, no fue en desmedro de aquellos parámetros necesarios que facilitan el éxito reproductivo de la planta, ya que en conjunto con un aumento en el número de flores totales, se obtuvo un aumento en el peso total de las semillas por planta (Tabla IV). Además, este adelanto en el cambio a una fase reproductiva de las líneas L14, L15 y L16, no afecta negativamente a los parámetros de crecimiento vegetativo o biomasa, al contrario, la mayoría de estos se encuentra aumentado (Tabla III y V). Por otro lado, el aumento en el crecimiento vegetativo y reproductivos de la plantas transgénicas, también fueron acompañados con un aumento considerable del peso fresco de las hojas, tallo y total de las líneas 14, 15 y 16, no obstante al evaluar el peso

seco de estas líneas, solo se vio un aumento significativo en el peso seco de los tallos (Tabla V). Respecto a esto, las giberelinas han sido descritas ampliamente por su rol en elongación del tallo y expansión foliar a través de expansión celular y división celular (Ogawa y col., 2003; Lucas y col., 2008; Gallego-Bartolomé y col., 2011). En particular, las giberelinas estimulan la expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la distensión de la pared celular, el control de la división celular y el reordenamiento de microtúbulos asociados con expansión celular (Ogawa y col., 2003; Achard y col., 2009; Sambade y col., 2012). Estos antecedentes, ponen en manifiesto y nos permiten sugerir que el aumento en estos parámetros de crecimiento podría ser mediado principalmente giberelinas a través de expansión celular más que por división celular. Esto se explica debido a que las líneas presentan un aumento en biomasa debido división celular, suelen tener un aumento en peso seco a causa del incremento en el número de células por tejido. Mientras que aquellas plantas que presentan un incremento en biomasa debido a expansión celular, suelen tener un incremento en peso fresco, debido a la expansión celular mediada por agua, hecho que parece predominar en las líneas analizadas (Hauvermale y col., 2012).

4.4 Las líneas transgénicas de *N. tabacum* que poseen un incremento en su fitness y biomasa poseen un mayor contenido de giberelinas.

Los resultados y antecedentes expuestos hasta ahora explican en parte como las líneas transgénicas transformadas con el gen *DcLcyb1* podrían estar afectando a la planta, específicamente procesos involucrados con la fotosíntesis y por ende tener un impacto en el desarrollo y crecimiento de la planta. Sin embargo, no existe evidencias suficientes de que clorofilas o carotenoides ejerzan un efecto tan evidente como el visto en este trabajo en el aumento del área foliar, crecimiento longitudinal de la planta y

adelanto de la floración (Nisar y col., 2015; Pogson y col., 2015). Por lo tanto, en el transcurso del desarrollo de este trabajo se buscó un candidato que pudiera estar relacionado con estos parámetros y al mismo tiempo tuviera alguna relación con la ruta de biosíntesis de carotenoides. Dentro de los posibles compuestos, los más idóneos resultaron ser aquellos compuestos derivados de la ruta de biosíntesis de giberelinas (GAs). Esto apoyado por las siguientes antecedentes: (i) no solo carotenoides y clorofilas comparten el GGPP como precursor, sino que como se dijo anteriormente, las giberelinas también lo hacen y (ii) las GAs son fitohormonas esenciales para muchos procesos de desarrollo en las plantas, incluyendo la germinación de las semillas, elongación del tallo, expansión de hojas, desarrollo de tricomas, maduración del polen e inducción de la floración (Achard y Genschik, 2009). Además, es importante mencionar que plantas deficientes en GAs, poseen un fenotipo enano y una floración tardía, fenotipo que puede ser revertido al de una planta silvestre con el suministro de GAs de forma exógena (Daviere y Achard, 2013). Estos antecedentes y los distintos parámetros fisiológicos de las líneas transgénicas pGWB2/*DcLcyb1* (Tablas III, IV y V), nos llevaron a considerar la participación de las GAs en el fenotipo observado en las líneas 14, 15 y 16 mediante 3 aproximaciones; la evaluación de la expresión de genes involucrados directamente en la síntesis de estas fitohormonas (*Cps* y *Ks*), la utilización de inhibidores de síntesis de GAs (AMO1618) para evaluar si los parámetros que observábamos (Ej: aumento del área foliar) eran mediados por un aumento en la concentración de GAs y la cuantificación directa de la GAs bioactivas. Respecto a los genes *Cps* y *Ks*, estos codifican dos terpeno sintasas (ent-copalil-difosfato y ent-kaureno sintasas; CPS Y KS, respectivamente) involucradas en la conversión de GGPP al intermediario tetracíclico hidrocarbonado ent-kaureno, paso temprano de la ruta de biosíntesis de GAs. Al evaluar los niveles de transcrito, ambos genes se encontraron inducidos en las 3 líneas

analizadas (L14, L15 y L16), dando cuenta de un posible antecedente que pudiera explicar un aumento en el contenido de giberelinas en estas líneas (**Figura 8E y F**). Además, al utilizar el inhibidor AMO1618, observamos que parámetros como el peso fresco o área foliar, los cuales se encontraban aumentados en las líneas 14, 15 y 16, se veían afectados, alcanzando valores similares a los observados en la línea control S/l sin tratamiento de inhibidor (**Figura 9 y 10**). Además, al cuantificar las GAs bioactivas, se comprobó que al menos en las hojas de dos de las líneas analizadas existe una mayor concentración de GA4 (**Figura 11**). Además, es relevante el hecho de que solo se utilizaron hojas para la cuantificación de GAs bioactivas; sin embargo, diversos estudios fisiológicos y caracterizaciones fenotípicas de plantas mutantes afectadas en la biosíntesis de GAs y los mismos resultados aquí expuestos (**Tabla III, Figura 9 y Figura 10**) demuestran que estas fitohormonas también poseen un importante rol en la elongación internodal y por ende en la altura de la planta (Hooley, 1994; Swain y Olszewski, 1996; Blazquez, 2008). Por lo tanto, la concentración local de GAs podría ser distinta al utilizar otro tejido para cuantificar, como por ejemplo parte del tallo o los ápices apicales durante el crecimiento de la planta, ya que si bien se conocen los componentes de la ruta de biosíntesis de GAs, es muy difícil determinar el lugar preciso de biosíntesis de ésta en plantas (Gupta y Chakrabarty, 2013). Tomando todos estos antecedentes en consideración, es muy probable que el aumento de altura y área foliar en las líneas 14, 15 y 16 se deba principalmente a estimulación de la división y expansión celular mediada por un aumento en la concentración de giberelinas (Ogawa y col., 2003; de Lucas y col., 2008), lo que también puede ser corroborado por el aumento de biomasa obtenido en hojas totales y tallo de las líneas transgénicas (**Tabla V**). No obstante, falta investigación precisa sobre los niveles locales de GAs en plantas y se desconocen muchos componentes de las vías de transducción de señales que finalmente llevan a la

elongación del tallo y hojas mediado por esta fitohormona (Gupta y Chakrabarty, 2013). Por otro lado, la floración temprana y el aumento en el número de flores y semillas observados en las líneas 14, 15 y 16, también puede ser explicado por el rol de las GAs en la iniciación y desarrollo de la floración (Griffiths y col., 2006; Gupta y Chakrabarty, 2013). Esto se evidencia claramente en plantas deficientes en GAs, ya que suelen presentar floración tardía, problemas de fertilidad, estructuras florales deficientes funcionalmente e incluso aborto prematuro de las flores (Chhun y col., 2007; Hu y col., 2008). Mientras que la sobreexpresión de genes relacionados con la biosíntesis de GAs o respuestas constitutivas a estas fitohormonas, ya han reportado anteriormente plantas con hipocótilos alargados, incremento en el crecimiento del tallo o floración temprana, junto con un incremento en giberelinas bioactivas (Coles y col., 1999; Daviere y Achard, 2013). Por otro lado, a la fecha, los trabajos en los cuales se han sobreexpresado genes carotenogénicos han reportado que la ruta de biosíntesis de GAs se ve afectada negativamente. Por ejemplo, la sobreexpresión de *Psy* en tomate causa un fenotipo enano a causa de la disminución del precursor GGPP para la biosíntesis de GAs (Fray y col., 1995). Mientras que en *A. thaliana* la sobreexpresión específica del gen endógeno *Psy* aumentó la concentración de ABA, carotenoides y clorofila, pero las semillas poseían un retraso en su germinación (Lindgren y col., 2003). De todos modos, la relación entre estas rutas de biosíntesis (carotenoides, clorofilas y GAs) parece no solo radicar en los precursores comunes, dado que *A. thaliana* mutantes en el *Pds3* no solo presentan una deficiencia en el contenido de carotenoides, sino que también una disminución de la concentración de clorofilas y GAs (Qin y col., 2007). Respecto a lo mismo, también se ha reportado que el silenciamiento del gen *Psy* en la orquídea *Oncidium hybrid* afecta el crecimiento, el contenido de carotenoides y la morfología de los plastidios de la planta, dando cuenta nuevamente la estrecha relación entre estas 3 rutas de biosíntesis.

Finalmente, y dado el rol antagónico de GAs y ABA durante la germinación de las semillas, se evaluó si la germinación de la semillas estaba alterada en las plantas portadoras del gen *DcLcyb1*, ya que si bien existía un aumento en la concentración de giberelinas no se observó un aumento en la concentración de ABA (**Figura Anexa 2**) ni los niveles de transcritos de uno de los genes directamente involucrado en su síntesis (**Figura 8G**). Sin embargo, ninguna de las líneas transgénicas evaluadas (semillas de plantas T₀ y T₁) presentó diferencias en la germinación al ser comparadas con la línea control S/I (**Datos no mostrados**).

4.5 La expresión heteróloga de *DcLcyb1* en *N. tabacum* promueve la inducción de genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides, clorofilas y giberelinas.

Tomando todos los antecedentes mencionados hasta ahora, se puede sugerir que la expresión del gen carotenogénico *Lcyb1*, es capaz de alterar de manera significativa los parámetros fisiológicos y moleculares a través de una inducción de genes claves en las rutas de biosíntesis de carotenoides, clorofilas y giberelinas. No obstante y tomando en cuenta los antecedentes mencionados anteriormente, para explicar la inducción simultánea de las 3 vías de síntesis y los efectos fisiológicos observados en las líneas 14, 15 y 16, se evaluó la expresión de genes involucrados en la síntesis del precursor común a ellas, GGPP. Se observó que los genes endógenos *Ggpps* y *Dxs2* que codifican las enzimas encargadas de la síntesis de GGPP y DXP, respectivamente (**Figura 1**), se encontraban inducidos en todas las plantas transgénicas con el gen *DcLcyb1* (**Figura 8E y F**). Los pasos catalizados por las enzimas GGPPS y DXS, han sido descritos anteriormente como pasos limitantes en la síntesis de compuestos derivados de isoprenoides, como lo son clorofilas, carotenoides y giberelinas (Rodríguez-Concepción, 2010; Beck y col., 2013). Anteriormente, ya se ha

descrito que la inducción del gen *Psy* en *Arabidopsis*, además de incrementar el contenido de carotenoides, es capaz de permitir la inducción del gen codificante de la enzima DXS mediante un mecanismo de retroalimentación positiva (Rodríguez-Villalón y col., 2009). Ambos genes codificantes de enzimas PSY se encuentran inducidos, o existe una tendencia a la inducción, en todas las líneas 14, 15 y 16 analizadas (**Figura 7**), por lo que estos genes podrían ser los responsables de la inducción del gen *Dxs2* y por ende permitir la disponibilidad de sustrato para las 3 rutas biosintéticas. No obstante, se desconoce el mecanismo y hace falta evidencia para determinar como la expresión del transgen *DcLcyb1* podría estar induciendo, ya sea directamente o a través de un intermediario, la expresión de genes codificantes de la enzima GGPPS.

Tomando en cuenta todos los antecedentes mostrados en este trabajo, se construyó un modelo para explicar los efectos de la expresión de *DcLcyb1* en *N. tabacum* (**Figura 12**). En éste proponemos que la expresión del gen *Lcyb1*, además de producir un incremento en los carotenoides (y específicamente en β -carotenoides) también puede inducir la expresión de genes clave en la síntesis de carotenoides. De estos genes clave, es probable que cualquiera de los dos genes *Psy* evaluados (*Psy1* y *Psy2* de *N. tabacum*) mediante un mecanismo de retroalimentación positiva permitan directamente o via un intermediario, la inducción del gen endógeno *Dxs2* (**Figura 12**). Por otro lado, *DcLcyb1* o alguno de los otros genes inducidos por la expresión de éste, podría permitir también la inducción de algunas de los genes codificantes de las isoformas de las enzimas GGPPS. La inducción de los genes *Ggps* y *Dxs2*, potencialmente puede explicar porque este efecto no se ha visto en otros trabajos donde la sobreexpresión de un gen carotenogénico en general lleva a fenotipos que afectan el crecimiento de la planta de

forma negativa debido a la falta de disponibilidad de precursores para distribuir a las rutas de biosíntesis.

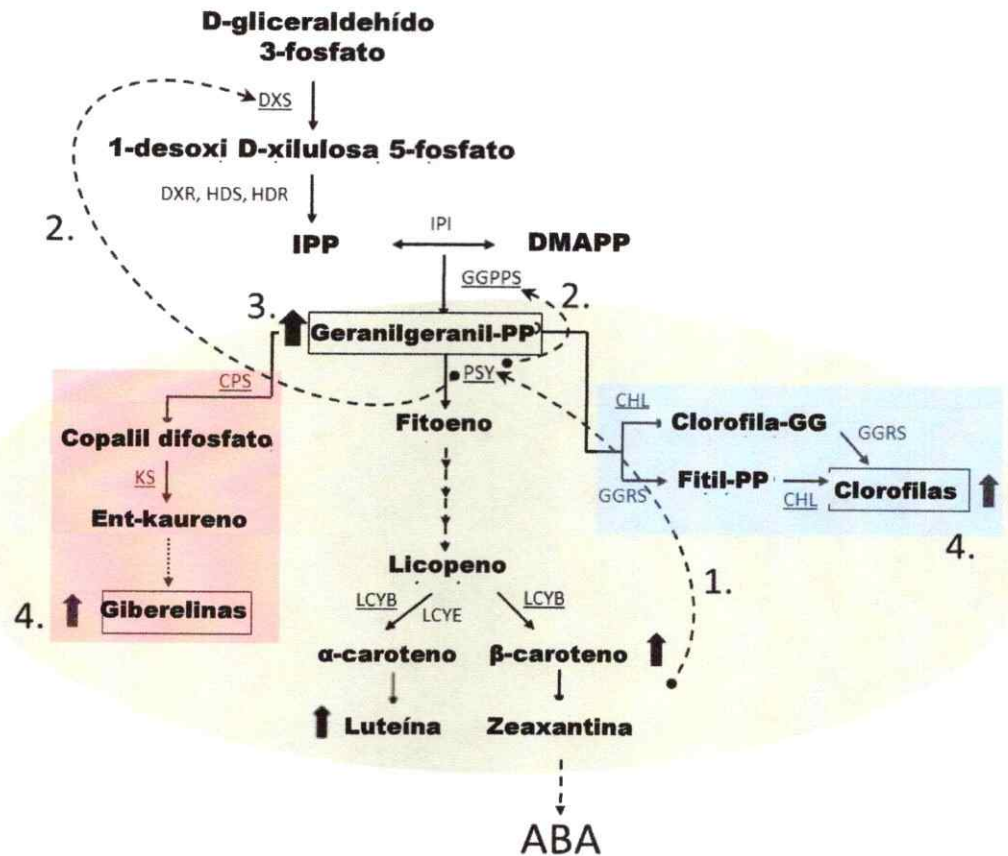


Figura 12. Esquema del modelo propuesto para la regulación positiva de las rutas de biosíntesis de carotenoides, clorofilas y giberelinas en las plantas de *N. tabacum* que expresan el gen *DcLcyb1*. Rutas de biosíntesis de carotenoides, clorofila (rectángulo celeste) y giberelinas (rectángulo rosado) que toman lugar en el cloroplasto (ovalo gris). (1) La expresión heteróloga de *DcLcyb1* produce un aumento en la producción de luteína y β -caroteno, ésta última molécula u otras producidas río abajo podría activar la expresión de los genes endógenos *Psy* (En *N. tabacum*, *Psy1* y *Psy2*). (2) Esto a su vez, desencadena la inducción de genes involucrados en la síntesis de precursores de isoprenoides, como lo son los genes *Dxs* y *Ggpps*. (3) Esta inducción aumenta la producción del precursor común de síntesis, Geranilgeranil pirofosfato (GGPP). (4) Finalmente, el aumento en GGPP conlleva una mayor disponibilidad de sustrato para las 3 rutas metabólicas, resultando en una mayor acumulación de giberelinas, clorofilas y carotenoides.

Por lo tanto, la inducción de los genes responsables de la síntesis de precursores isoprenoides en conjunto con la inducción de genes clave de las rutas de biosíntesis de carotenoides, clorofilas y GAs, puede explicar los efectos fisiológicos observados en las

líneas (**Figura 12**). Estos efectos se pueden resumir en un incremento general de parámetros de crecimiento vegetativo y reproductivo, lo que contribuye a mejorar el fitness de las líneas 14, 15 y 16 de *N. tabacum*. El mecanismo por el cual la expresión de *DcLcyb1* está alterando la expresión de los genes carotenogénicos endógenos de tabaco, podría ser mediado por una molécula específica que en la ruta de biosíntesis en la cual está involucrada. Entre los candidatos se encuentra el compuesto sintetizado directamente por el producto génico de *Lcyb1*, el β -caroteno, o algún compuesto producido río abajo como la fitohormona ABA. Al respecto, se ha demostrado que un tratamiento exógeno de ABA puede inducir la expresión del gen *Psy* endógeno en raíces de *A. thaliana* (Ruiz-Sola y col., 2014) y que elementos de respuesta a ácido abscísico (ABRE) en los promotores de los genes *Psy2* de *D. carota* son funcionales (Fuentes, 2011), lo que potencialmente podría explicar el efecto de la expresión de *DcLcyb1* sobre la inducción de los genes *Psy1* y *Psy2* de *N. tabacum*. En nuestro trabajo la concentración de ABA posee una tendencia al aumento en las líneas transgénicas analizadas, no obstante, estas diferencias no fueron significativas estadísticamente (**Figura Anexa 2**). Una explicación a esto podría ser la edad de las plantas, el tejido escogido o la cantidad de muestras analizadas.

De todas maneras y esperando a futuro encontrar los mecanismos subyacentes a este fenómeno, este trabajo representa una valiosa alternativa a la manipulación genética del contenido de carotenoides, clorofila y GAs mediante la sobreexpresión de un único gen carotenogénico.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo son:

- Las líneas de *N. tabacum* que expresan el gen *DcLcyb1* poseen un incremento significativo del contenido de carotenoides (β -caroteno y luteína), el cual se correlaciona con una inducción de los genes endógenos clave en la biosíntesis de carotenoides.
- Estas líneas también poseen un incremento en el contenido de clorofila lo que correlaciona positivamente con un aumento en la eficiencia fotosintética y la expresión del gen codificante de la enzima clorofila sintasa (CHL).
- Las líneas transgénicas de *N. tabacum* poseen un incremento en parámetros de crecimiento (vegetativo y reproductivo) y biomasa. Este incremento puede explicarse por la inducción de genes involucrados en la síntesis de giberelinas (*NtCps* y *NtKs*) que explicaría en parte el mayor contenido de GA4 (giberelina bioactiva) en las líneas evaluadas.
- Finalmente, se sugiere que la expresión heteróloga de *DcLcyb1* en *N. tabacum* promueve la inducción de genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides, clorofilas y giberelinas. Esto en conjunto con la inducción de genes responsables de la síntesis de precursores de isoprenoides, puede explicar el fenotipo molecular y fisiológico de las líneas 14, 15 y 16 de *N. tabacum*.

ANEXOS

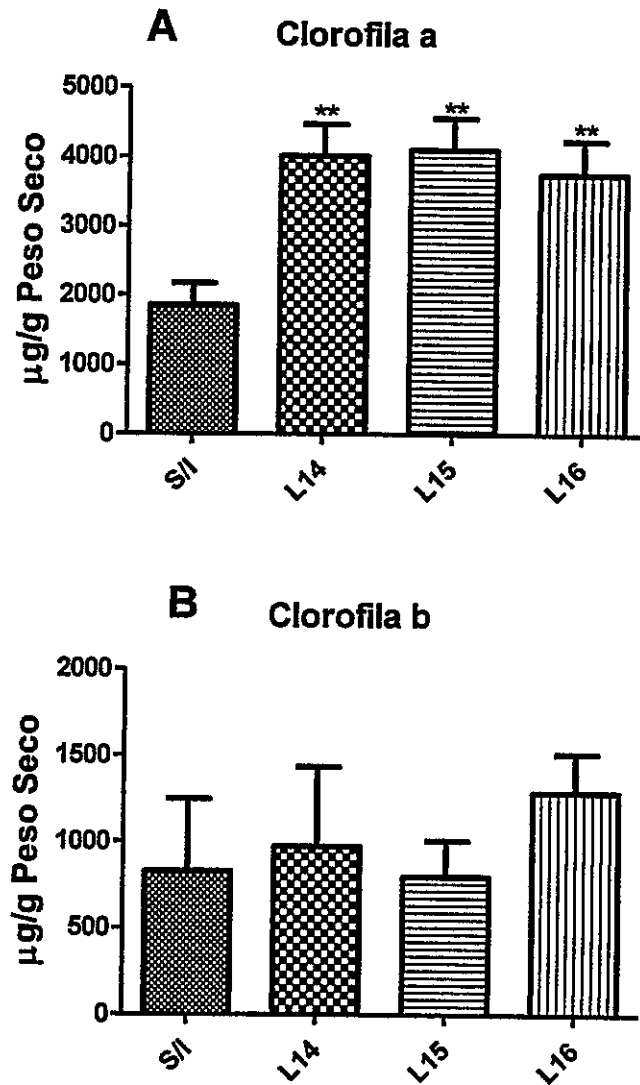


Figura A1 Concentración de pigmentos de clorofila en las líneas transgénicas de *N. tabacum*. Evaluación mediante espectrofotometría y HPLC de la concentración de pigmentos en plantas T₁ de las líneas S/I, 14, 15 y 16 de *N. tabacum*. Cada barra corresponde a la cuantificación del pigmento utilizando muestras de hojas de tabaco de 3 meses (n=6). **A:** Cantidad de clorofila *a* y **B:** Cantidad de clorofila *b*. Los asteriscos indican diferencias significativas comparando con la línea control S/I, estas diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado. **: p<0.01. S/I: Sin inserto.

Tabla IA Comparación de los parámetros vegetativos y reproductivos entre plantas de tabaco T2 que portan el vector pGWB2 sin inserto y las líneas transgénicas con el gen *DcLcyb1*.

Líneas	Altura (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Largo foliar (cm)	Ancho foliar (cm)	Espacio Internodal (cm)	Número de hojas	Número de Flores	Peso semillas total (g)	Peso semillas por capsula (g)
S/I	31.8 ± 4.8	8.0 ± 0.6	12.8 ± 2.5	8.1 ± 0.6	1.8 ± 0.6	21.3 ± 1.5	18.3 ± 1.1	0.7 ± 0.1	0.065 ± 0.021
L14	57.8 ± 6.2***	7.5 ± 0.6	22.0 ± 4.5**	11.8 ± 0.7***	3.1 ± 0.7**	15.3 ± 1.3***	25.3 ± 4.3**	1.5 ± 0.3*	0.086 ± 0.019
L15	58.2 ± 5.5***	7.9 ± 0.5	21.9 ± 4.5**	13.1 ± 1.8***	3.1 ± 0.5**	15.2 ± 0.8***	24.0 ± 4.3**	1.6 ± 0.2*	0.077 ± 0.012
L16	55.7 ± 2.6***	7.9 ± 0.6	20.2 ± 3.6**	12.9 ± 2.1***	3.0 ± 0.5**	14.8 ± 1.7***	24.4 ± 3.6**	1.5 ± 0.3*	0.077 ± 0.015

Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor en comparación al valor obtenido con el vector sin inserto (S/I), esta diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado. *: p<0.05; **: p<0.01; *** p<0.001. Además se muestra el promedio y su desviación estándar. Los valores significativos han sido remarcados en negrita

Tabla IIA Comparación de la Biomasa entre la generación T₂ de plantas transformadas con el vector sin inserto y plantas transgénicas portadoras del gen *DcLcyb1*.

Líneas	Peso Fresco Tallos (g)	Peso Fresco Hojas (g)	Peso Fresco Total (g)	Peso Seco Tallos (g)	Peso Seco Hojas (g)	Peso Seco Total (g)
S/I	10.1 ± 1.4	16.3 ± 3.0	26.4 ± 5.8	1.7 ± 0.4	1.9 ± 0.3	3.6 ± 0.7
L14	17.5 ± 2.3**	23.0 ± 5.1*	40.5 ± 6.8*	2.2 ± 0.2*	2.2 ± 0.6	4.4 ± 0.9
L15	17.9 ± 3.5**	21.6 ± 3.3*	39.5 ± 6.3*	2.2 ± 0.4*	2.0 ± 0.2	4.2 ± 0.7
L16	18.7 ± 0.9***	22.6 ± 3.9*	41.3 ± 4.8*	2.2 ± 0.1*	2.1 ± 0.6	4.3 ± 0.8

Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor en comparación al valor obtenido con el vector sin inserto (S/I), esta diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado. *: p<0.05; **: p<0.01; *** p<0.001. Además se muestra el promedio y su desviación estándar. Los valores significativos han sido remarcados en negrita

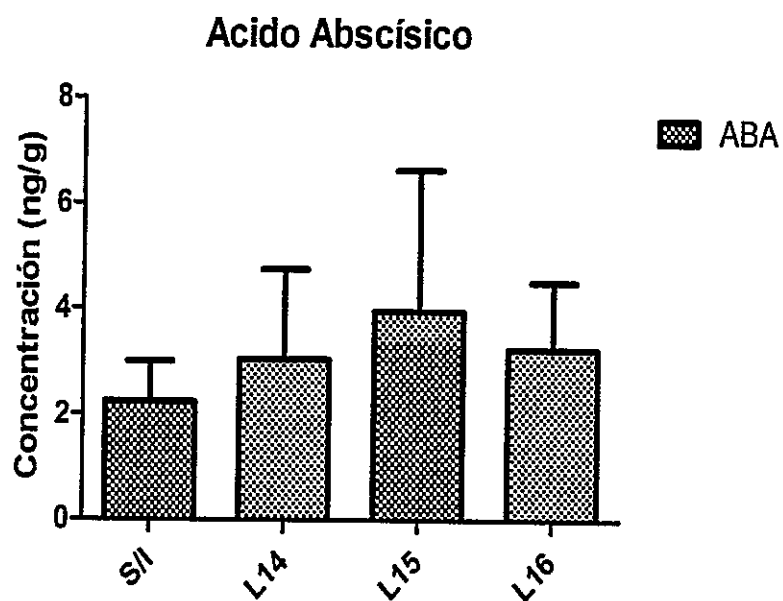


Figura A2 Concentración de ácido abscísico en las plantas transgénicas de *N. tabacum*. En la figura se observa la concentración de ácido abscísico (ABA) en plantas transformadas con el vector sin inserto y plantas transformadas con la construcción pGWB2/DcLcyb1. Se utilizaron hojas de plantas de tabaco de 1 mes de edad. En este análisis se utilizaron 3 muestras por línea transgénica y 2 réplicas técnicas. Los datos se graficaron en GraphPad utilizando un test de T de dos colas, no pareado, $p < 0.05$. S/I: sin inserto.

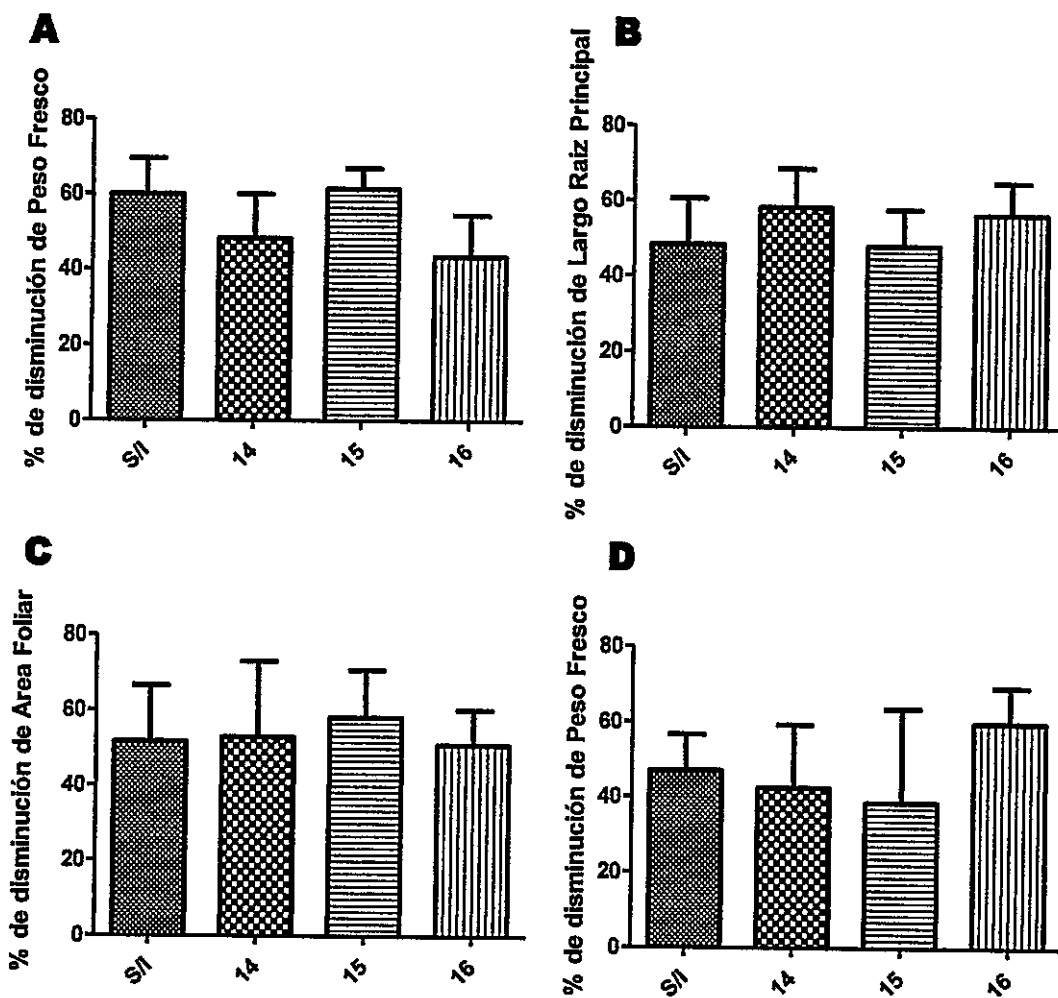


Figura A3 Porcentajes de disminución de los parámetros evaluados en los ensayos de inhibición (A) Porcentaje de disminución del parámetro de peso fresco en plantas que han sido crecidas en placas verticales durante 21 días en presencia del inhibidor AMO1618 (100 μ M) (B) Porcentaje de disminución del parámetro de largo de raíz principal en condiciones idénticas que en A. (C) Porcentaje de disminución del parámetro de área foliar en plantas que han sido crecidas en frascos de cultivo durante 1 mes en presencia del inhibidor AMO1618 (100 μ M). (D) Porcentaje de disminución del parámetro de peso fresco en condiciones idénticas que en C.

REFERENCIAS

- Achard P, Genschik P (2009) Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J Exp Bot* **60**: 1085-1092
- Ahn MJ, Noh SA, Ha SH, Back K, Lee SW (2012) Production of ketocarotenoids in transgenic carrot plants with an enhanced level of β -carotene. *Plant Biotechnology R.* **6** :133-140.
- Akiyama K, Ogasawara S, Ito S, Hayashi H (2010) Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol* **51**: 1104-1117
- Alba R, Payton P, Fei Z, McQuinn R, Debbie P, Martin GB, Tanksley SD, Giovannoni JJ (2005) Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell* **17**: 2954-2965
- Alquezar B, Zacarias L, Rodrigo MJ (2009) Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene beta-cyclase from Citrus and its relation to lycopene accumulation. *J Exp Bot* **60**: 1783-1797
- Altincicek B, Kovacs JL, Gerardo NM (2012) Horizontally transferred fungal carotenoid genes in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Biol Lett* **8**: 253-257
- Aluru M, Xu Y, Guo R, Wang Z, Li S, White W, Wang K, Rodermel S (2008) Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *J Exp Bot* **59**: 3551-3562
- Ampomah-Dwamena C, McGhie T, Wibisono R, Montefiori M, Hellens RP, Allan AC (2009) The kiwifruit lycopene beta-cyclase plays a significant role in carotenoid accumulation in fruit. *J Exp Bot* **60**: 3765-3779
- Andersen C, Jensen J, Orntoft T (2004) Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research* **64**: 5245-5250
- Arango J, Wust F, Beyer P, Welsch R (2010) Characterization of phytoene synthases from cassava and their involvement in abiotic stress-mediated responses. *Planta* **232**: 1251-1262
- Araya-Garay JM, Feijoo-Siota L, Veiga-Crespo P, Villa TG (2011) cDNA cloning of a novel gene codifying for the enzyme lycopene beta-cyclase from *Ficus carica* and its expression in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **92**: 769-777
- Auldridge ME, McCarty DR, Klee HJ (2006) Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 315-321
- Avendano-Vazquez AO, Cordoba E, Llamas E, San Roman C, Nisar N, De la Torre S, Ramos-Vega M, Gutierrez-Nava MD, Cazzonelli CI, Pogson BJ, Leon P (2014) An Uncharacterized Apocarotenoid-Derived Signal Generated in zeta-Carotene Desaturase Mutants Regulates Leaf Development and the Expression of Chloroplast and Nuclear Genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**: 2524-2537
- Barrero JM, Rodriguez PL, Quesada V, Alabadi D, Blazquez MA, Boutin JP, Marion-Poll A, Ponce MR, Micol JL (2008) The ABA1 gene and carotenoid biosynthesis are required for late skotomorphogenic growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **31**: 227-234
- Beck G, Coman D, Herren E, Ruiz-Sola MA, Rodriguez-Concepcion M, Grisse W, Vranova E (2013) Characterization of the GGPP synthase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **82**: 393-416

- Beyer P, Al-Babili S, Ye X, Lucca P, Schaub P, Welsch R, Potrykus I (2002)** Golden Rice: introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *J Nutr* **132**: 506S-510S
- Bhosale P, Bernstein PS (2005)** Microbial xanthophylls. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 445-455
- Blazquez M (2008)** Phenotypic analysis of *Arabidopsis* mutants: gibberellin/abscisic acid/paclobotrazol hormone response. *CSH Protoc* **2008**: pdb prot4964
- Bone RA, Landrum JT (2010)** Dose-dependent response of serum lutein and macular pigment optical density to supplementation with lutein esters. *Arch Biochem Biophys* **504**: 50-55
- Bouvier F, Isner JC, Dogbo O, Camara B (2005)** Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *Trends Plant Sci* **10**: 187-194
- Bouvier F, Rahier A, Camara B (2005)** Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res* **44**: 357-429
- Britton G (1995)** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* **9**: 1551-1558
- Carretero-Paulet L, Cairo A, Botella-Pavia P, Besumbes O, Campos N, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M (2006)** Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Mol Biol* **62**: 683-695
- Cazzonelli CI, Pogson BJ (2010)** Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* **15**: 266-274
- Coles JP, Phillips AL, Croker SJ, Garcia-Lepe R, Lewis MJ, Hedden P (1999)** Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *Plant J* **17**: 547-556
- Collins AR (1999)** Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* **21**: 238-246
- Conti A, Pancaldi S, Fambrini M, Michelotti V, Bonora A, Salvini M, Pugliesi C (2004)** A deficiency at the gene coding for zeta-carotene desaturase characterizes the sunflower non dormant-1 mutant. *Plant Cell Physiol* **45**: 445-455
- Cunningham FX, Gantt E (1998)** Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 557-583
- Cunningham FX, Jr., Pogson B, Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D, Gantt E (1996)** Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* **8**: 1613-1626
- Chhun T, Aya K, Asano K, Yamamoto E, Morinaka Y, Watanabe M, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M, Ueguchi-Tanaka M (2007)** Gibberellin regulates pollen viability and pollen tube growth in rice. *Plant Cell* **19**: 3876-3888
- Chi W, Feng P, Ma J, Zhang L (2015)** Metabolites and chloroplast retrograde signaling. *Current opinion in plant biology* **25**: 32-38
- D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS (2011)** Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients* **3**: 63-103
- Dalal M, Chinnusamy V, Bansal KC (2010)** Isolation and functional characterization of lycopene beta-cyclase (CYC-B) promoter from *Solanum habrochaites*. *BMC Plant Biol* **10**: 61
- Dall'Osto L, Cazzaniga S, North H, Marion-Poll A, Bassi R (2007)** The *Arabidopsis* aba4-1 mutant reveals a specific function for neoxanthin in protection against photooxidative stress. *Plant Cell* **19**: 1048-1064

- Dall'Osto L, Lico C, Alric J, Giuliano G, Havaux M, Bassi R (2006)** Lutein is needed for efficient chlorophyll triplet quenching in the major LHCII antenna complex of higher plants and effective photoprotection in vivo under strong light. *BMC Plant Biol* **6**: 32
- Daviere JM, Achard P (2013)** Gibberellin signaling in plants. *Development* **140**: 1147-1151
- de Lucas M, Daviere JM, Rodriguez-Falcon M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blazquez MA, Titarenko E, Prat S (2008)** A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**: 480-484
- Deruere J, Bouvier F, Steppuhn J, Klein A, Camara B, Kuntz M (1994)** Structure and expression of two plant genes encoding chromoplast-specific proteins: occurrence of partially spliced transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* **199**: 1144-1150
- Dharmapuri S, Rosati C, Pallara P, Aquilani R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G (2002)** Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits. *FEBS Lett* **519**: 30-34
- Diretto G, Al-Babili S, Tavazza R, Papacchioli V, Beyer P, Giuliano G (2007)** Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. *PLoS One* **2**: e350
- Dong H, Deng Y, Mu J, Lu Q, Wang Y, Xu Y, Chu C, Chong K, Lu C, Zuo J (2007)** The *Arabidopsis* Spontaneous Cell Death1 gene, encoding a zeta-carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. *Cell Res* **17**: 458-470
- Fraser PD, Bramley PM (2004)** The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* **43**: 228-265
- Fraser PD, Enfissi EM, Halket JM, Truesdale MR, Yu D, Gerrish C, Bramley PM (2007)** Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell* **19**: 3194-3211
- Fraser PD, Truesdale MR, Bird CR, Schuch W, Bramley PM (1994)** Carotenoid Biosynthesis during Tomato Fruit Development (Evidence for Tissue-Specific Gene Expression). *Plant Physiol* **105**: 405-413
- Fray RG, Grierson D (1993)** Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. *Plant Mol Biol* **22**: 589-602
- 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 para optar al título de Magister en Ciencias Biológicas. Universidad de Chile, Santiago, 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
- Galpaz N, Wang Q, Menda N, Zamir D, Hirschberg J (2008)** Abscisic acid deficiency in the tomato mutant high-pigment 3 leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content. *Plant J* **53**: 717-730
- Glorio 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
- Glorio G, Yildirim A, Stigliani AL, D'Ambrosio C (2013)** Elevation of lutein content in tomato: a biochemical tug-of-war between lycopene cyclases. *Metab Eng* **20**: 167-176
- Giovannoni J (2001)** Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 725-749

- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun TP, Thomas SG (2006) Genetic characterization and functional analysis of the *GID1* gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 3399-3414
- Grotewold E (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 761-780
- Gupta R, Chakrabarty SK (2013) Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved. *Plant Signal Behav* **8**: 120-125
- Hadley CW, Miller EC, Schwartz SJ, Clinton SK (2002) Tomatoes, lycopene, and prostate cancer: progress and promise. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**: 869-880
- Hannoufa A, Hossain Z (2012) Regulation of carotenoid accumulation in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **1**: 167-178
- Havaux M (2014) Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *Plant J* **79**: 597-606
- Hirschberg J (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 210-218
- Hooley R (1994) Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Mol Biol* **26**: 1529-1555
- Howitt CA, Pogson BJ (2006) Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ* **29**: 435-445
- Hu J, Mitchum MG, Barnaby N, Ayele BT, Ogawa M, Nam E, Lai WC, Hanada A, Alonso JM, Ecker JR, Swain SM, Yamaguchi S, Kamiya Y, Sun TP (2008) Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 320-336
- Huguene P, Badillo A, Chen HC, Klein A, Hirschberg J, Camara B, Kuntz M (1995) Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant J* **8**: 417-424
- Ji J, Wang G, Wang J, Wang P (2009) Functional analysis of multiple carotenogenic genes from *Lycium barbarum* and *Gentiana lutea* L. for their effects on beta-carotene production in transgenic tobacco. *Biotechnol Lett* **31**: 305-312
- Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M (2004) Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol* **134**: 824-837
- Kawaide H, Imai R, Sassa T, Kamiya Y (1997) Ent-kaurene synthase from the fungus *Phaeosphaeria* sp. L487. cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase in fungal gibberellin biosynthesis. *J Biol Chem* **272**: 21706-21712
- Kim J, Smith JJ, Tian L, Dellapenna D (2009) The evolution and function of carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **50**: 463-479
- Kita M, Kato M, Ban Y, Honda C, Yaegaki H, Ikoma Y, Moriguchi T (2007) Carotenoid accumulation in Japanese apricot (*Prunus mume* Siebold & Zucc.): molecular analysis of carotenogenic gene expression and ethylene regulation. *J Agric Food Chem* **55**: 3414-3420
- Koyama Y, Rondonuwu FS, Fujii R, Watanabe Y (2004) Light-harvesting function of carotenoids in photo-synthesis: the roles of the newly found 1(1)Bu- state. *Biopolymers* **74**: 2-18
- Krinsky NI, Johnson EJ (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* **26**: 459-516
- Krubasik P, Sandmann G (2000) Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochem Soc Trans* **28**: 806-810

- Kusaba M, Ito H, Morita R, Iida S, Sato Y, Fujimoto M, Kawasaki S, Tanaka R, Hirochika H, Nishimura M, Tanaka A (2007) Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. *Plant Cell* **19**: 1362-1375
- 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
- Lichtenthaler HK (1999) The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 47-65
- Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV VIS Spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*
- Lindgren LO, Stalberg KG, Hoglund AS (2003) Seed-specific overexpression of an endogenous *Arabidopsis* phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll, and abscisic acid. *Plant Physiol* **132**: 779-785
- Liu JX, Chiou CY, Shen CH, Chen PJ, Liu YC, Jian CD, Shen XL, Shen FQ, Yeh KW (2014) RNA interference-based gene silencing of phytoene synthase impairs growth, carotenoids, and plastid phenotype in *Oncidium hybrid* orchid. *Springerplus* **3**: 478
- Lois LM, Rodriguez-Concepcion M, Gallego F, Campos N, Boronat A (2000) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J* **22**: 503-513
- 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
- Mann V, Harker M, Pecker I, Hirschberg J (2000) Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nat Biotechnol* **18**: 888-892
- Meier S, Tzfadia O, Vallabhaneni R, Gehring C, Wurtzel ET (2011) A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Syst Biol* **5**: 77
- Misawa N (2011) Pathway engineering for functional isoprenoids. *Curr Opin Biotechnol* **22**: 627-633
- Moehs CP, Tian L, Osteryoung KW, Dellapenna D (2001) Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Mol Biol* **45**: 281-293
- Moran NA, Jarvik T (2010) Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science* **328**: 624-627
- Moreno J (2012) Lycopene β -cylase1 gene (*lcyb1*) from *Daucus carota* regulates carotenoid biosynthesis in tobacco and carrot. Tesis de Magister para optar al título de Magister en Ciencias Biológicas. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Moreno JC (2010) Evaluación de la funcionalidad de la licopeno β -ciclase de *Daucus carota* L. (zanahoria) mediante complementación heteróloga. Tesis para optar al grado de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Moreno JC, Pizarro L, Fuentes P, Handford M, Cifuentes V, Stange C (2013) Levels of lycopene beta-cyclase 1 modulate carotenoid gene expression and accumulation in *Daucus carota*. *PLoS One* **8**: e58144
- Nisar N, Li L, Lu S, Khin NC, Pogson BJ (2015) Carotenoid metabolism in plants. *Mol Plant* **8**: 68-82

- North HM, De Almeida A, Boutin JP, Frey A, To A, Botran L, Sotta B, Marion-Poll A (2007) The *Arabidopsis* ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J* **50**: 810-824
- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* **15**: 1591-1604
- Pecker I, Gabbay R, Cunningham FX, Jr., Hirschberg J (1996) Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Mol Biol* **30**: 807-819
- Pfaffl M (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: 2002-2007
- Pilkington SM, Montefiori M, Jameson PE, Allan AC (2012) The control of chlorophyll levels in maturing kiwifruit. *Planta* **236**: 1615-1628
- Pizarro L, Stange C (2009) Light dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia e Invest Agr* **36**: 143-162.
- Pogson BJ, Ganguly D, Albrecht-Borth V (2015) Insights into chloroplast biogenesis and development. *Biochim Biophys Acta* **4**: 256-262
- Qin G, Gu H, Ma L, Peng Y, Deng XW, Chen Z, Qu LJ (2007) Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Res* **17**: 471-482
- Ramel F, Birtic S, Ginies C, Soubigou-Taconnat L, Triantaphylides C, Havaux M (2012) Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 5535-5540
- Ritz T, Damjanovic A, Schulten K, Zhang JP, Koyama Y (2000) Efficient light harvesting through carotenoids. *Photosynth Res* **66**: 125-144
- Rodriguez-Concepcion M (2010) Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Arch Biochem Biophys* **504**: 118-122
- Rodriguez-Concepcion M, Ahumada I, Diez-Juez E, Sauret-Gueto S, Lois LM, Gallego F, Carretero-Paulet L, Campos N, Boronat A (2001) 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant J* **27**: 213-222
- Rodriguez-Concepcion M, Stange C (2013) Biosynthesis of carotenoids in carrot: an underground story comes to light. *Arch Biochem Biophys* **539**: 110-116
- Rodriguez-Villalon A, Gas E, Rodriguez-Concepcion M (2009) Colors in the dark: a model for the regulation of carotenoid biosynthesis in etioplasts. *Plant Signal Behav* **4**: 965-967
- 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
- Romer S, Fraser PD (2005) Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta* **221**: 305-308
- Rosati C, Aquilani R, Dharmapuri S, Pallara P, Marusic C, Tavazza R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G (2000) Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant J* **24**: 413-419
- Ruiz-Sola M, Rodríguez-Concepción M (2012) Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **10**: 231-245

- 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
- Sagar AD, Briggs WR (1990) Effects of High Light Stress on Carotenoid-Deficient Chloroplasts in *Pisum sativum*. *Plant Physiol* **94**: 1663-1670
- Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY (1999) Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J* **20**: 401-412X
- Shi Y, Wang R, Luo Z, Jin L, Liu P, Chen Q, Li Z, Li F, Wei C, Wu M, Wei P, Xie H, Qu L, Lin F, Yang J (2014) Molecular cloning and functional characterization of the lycopene epsilon-cyclase gene via virus-induced gene silencing and its expression pattern in *Nicotiana tabacum*. *Int J Mol Sci* **15**: 14766-14785
- Simkin AJ, Gaffe J, Alcaraz JP, Carde JP, Bramley PM, Fraser PD, Kuntz M (2007) Fibrillin influence on plastid ultrastructure and pigment content in tomato fruit. *Phytochemistry* **68**: 1545-1556
- Skelton RL, Yu Q, Srinivasan R, Manshardt R, Moore PH, Ming R (2006) Tissue differential expression of lycopene beta-cyclase gene in papaya. *Cell Res* **16**: 731-739
- Stange C, Flores C (2012) Carotenoids and Photosynthesis - Regulation of Carotenoid Biosynthesis by Photoreceptors. Ed. Mohammad Mahadi N. INTECH
- Swain SM, Olszewski NE (1996) Genetic Analysis of Gibberellin Signal Transduction. *Plant Physiol* **112**: 11-17
- Takemura M, Maoka T, Misawa N (2014) Carotenoid analysis of a liverwort *Marchantia polymorpha* and functional identification of its lycopene beta- and epsilon-cyclase genes. *Plant Cell Physiol* **55**: 194-200
- Telfer A (2014) Singlet oxygen production by PSII under light stress: mechanism, detection and the protective role of beta-carotene. *Plant Cell Physiol* **55**: 1216-1223
- 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
- Umeno D, Tobias AV, Arnold FH (2005) Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 51-78
- Vishnevetsky M, Ovadis M, Vainstein A (1999) Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci* **4**: 232-235
- von Lintig J, Welsch R, Bonk M, Giuliano G, Batschauer A, Kleinig H (1997) Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J* **12**: 625-634
- Walter MH, Strack D (2011) Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Nat Prod Rep* **28**: 663-692
- Wan Y, Yang S, Sun F, Wang J, Chen Q, Hong A (2012) All-trans retinoic acid induces chromatin remodeling at the promoter of the mouse liver, bone, and kidney alkaline phosphatase gene in C3H10T 1/2 cells. *Biochem Genet* **50**: 495-507
- 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

- Woitsch S, Romer S (2003)** Expression of xanthophyll biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation. *Plant Physiol* **132**: 1508-1517
- Woodall AA, Britton G, Jackson MJ (1997)** Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1336**: 575-586
- Xie X, Yoneyama K (2010)** The strigolactone story. *Annu Rev Phytopathol* **48**: 93-117
- Yeum KJ, Russell RM (2002)** Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu Rev Nutr* **22**: 483-504
- Yoneyama K, Awad AA, Xie X, Takeuchi Y (2010)** Strigolactones as germination stimulants for root parasitic plants. *Plant Cell Physiol* **51**: 1095-1103
- Yu Q, Beyer P (2012)** Reaction specificities of the epsilon-ionone-forming lycopene cyclase from rice (*Oryza sativa*) elucidated in vitro. *FEBS Lett* **586**: 3415-3420
- Zeng J, Wang C, Chen X, Zang M, Yuan C, Wang X, Wang Q, Li M, Li X, Chen L, Li K, Chang J, Wang Y, Yang G, He G (2015)** The lycopene beta-cyclase plays a significant role in provitamin A biosynthesis in wheat endosperm. *BMC Plant Biol* **15**: 112
- Zhao X, Aldini G, Johnson EJ, Rasmussen H, Kraemer K, Woolf H, Musaeus N, Krinsky NI, Russell RM, Yeum KJ (2006)** Modification of lymphocyte DNA damage by carotenoid supplementation in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* **83**: 163-169