



Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

# **Caracterización funcional del gen Fitocromo A (*DcPHYA*) y su rol en la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva de zanahoria (*Daucus carota*)**

Tesis entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al Grado de Doctora en Biotecnología

Facultad de Ciencias

Por

Rocío Belén Quian Ulloa

Agosto, 2022

Directora de Tesis: Dra. Claudia Stange Klein

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

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el/la candidato/a

**Rocío Belén Quian Ulloa**

ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 31 de agosto de 2022.

Director/a de Tesis:

Dra. Claudia Stange Klein

---

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Victor Cifuentes Guzmán

---

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

---

Dr. Francisco Pérez correa

---

Dra. María Francisca Blanco Herrera

---

A mis padres;  
María Ulloa Peña y Jaime Quian Fernández,  
porque sin proponérselo,  
despertaron en mí el interés sobre la biología de las plantas.

## Biografía



Nací en Temuco en la primavera de 1992. La tercera de 5 hermanas. Soy Fruto de la educación pública y orgullosa liceana del Liceo Pablo Neruda A-28. En el año 2011 entré a estudiar Biotecnología a la Universidad de la Frontera y ahí resolví dedicarme a trabajar con plantas, aunque este modelo ya lo tenía interiorizado en mí. Entre al doctorado en Biotecnología Molecular buscando nuevos desafíos y me siento feliz de terminar esta etapa. Ahora estoy expectante sobre lo que vendrá.

## **Agradecimientos**

A mis padres, por recibirme siempre con tanto cariño cuando viajo a visitarlos, por dejarme ser y encaminarme a esto que hago ahora y me encanta. A mis hermanas. A Rominita, por ser mi “pepe grillo”, por siempre escucharme y acompañarme a ver las hojas de los tréboles morados cerrarse cuando éramos niñas. A Torita -mi roomie-, con quien he compartido tantas risas, paseos y profundas conversaciones. A Ana, por compartir conmigo en los momentos importantes, por los paseos, los conciertos y los cafés.

A mis amigos de la vida; María Elena, Jason (esposo de María Elena), Pame y Toto. Gracias por compartir su vida conmigo y escucharme hablar de la zanahoria. Gracias especiales a Jason por aconsejarme venir a estudiar a Santiago.

A mi tutora, la Dra. Claudia Stange, por recibirme en su laboratorio sin conocerme previamente (y hacerme parte del grupo CSK), por las discusiones, por escucharme cuando lo necesite y -sobre todo- por creer en mi tantas veces y de tantas diferentes maneras.

Al team CSK. A Leti, Dani, Christian y Samuel, gracias por escucharme cuando necesitaba hablar con alguien. Gracias especiales, a Leti, a quien le debo el cuidado de las plantas de esta tesis, ya que sin su ayuda hubiera sido imposible mantenerlas durante las cuarentenas, a Dani, por las conversaciones y las tantas discusiones sobre "las moléculas de señalización por luz" que tanto amamos y a Christian, por la ayuda en el uso de algunos equipos. También, gracias a Fabiana por ayudarme con algunas extracciones de RNA y carotenoides de esta tesis y a los que ya no están en el grupo y compartieron parte de su conocimiento conmigo; Noel, Pancha, Luisfe y Pauli. Además, gracias especiales a Ange, por compartir conversaciones y risas.

A las chicas del team MH. A Maripi por compartir conmigo los problemas del doctorado que ambas cursamos. A Fran y Pame, por escucharme cuando necesite hablar con alguien.

A Ede, por ser mi amiga del doctorado, por leer y discutir papers conmigo y por las conversaciones y risas.

A las chicas de "Palillos y pipetas"; Dani, Maripi, Pauli y Pancha, quienes compartieron un hobby que he tenido desde muy pequeña.

Al grupo "Salseba", porque gracias a Seba aprendí a bailar salsa que ahora disfruto tanto. Además de que esto sirvió para dejar de pensar en los problemas del doctorado.

Gracias especiales a Ximena Zuñiga, secretaria de postgrado, quien siempre respondió los correos de forma muy veloz y eficiente.

A Jan Dijkman de Phillips y a la empresa Delight, quienes donaron las luces rojas lejanas y la carpa de interior usada en esta tesis.

A la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) por el financiamiento de esta tesis. Específicamente, al proyecto FONDECYT 1180747 y a la beca de Doctorado Nacional 2018, folio 21181369.

## Índice de contenido

Lista de Tablas	X
Lista de Figuras	XI
Abreviaciones	XIII
Resumen	1
Abstract	4
1. Introducción	7
1.1 Los fitocromos son fotoreceptores que participan en la fotomorfogénesis	7
1.2 La síntesis de los carotenoides es positivamente regulada por luz en tejido fotosintético y en frutos	16
1.3 La zanahoria ( <i>Daucus carota</i> ) como modelo de estudio de plantas acumuladoras de carotenoides en la raíz de reserva	18
1.4 Hipótesis y objetivos	18
2. Materiales y métodos	19
2.1 Medios de cultivo y materiales de biología molecular	19
2.2 Materiales Biológicos	19
2.3 Métodos de cultivo y transformación génica de bacterias y plantas	19
2.3.1 Producción de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> cepa Top10	19
2.3.2 Transformación de <i>E. coli</i> cepa Top10 quimiocompetentes	20
2.3.3 Producción de células quimiocompetentes de <i>A. tumefaciens</i> cepa GV3101	21
2.3.4 Transformación de células quimiocompetentes de <i>A. tumefaciens</i> cepa GV3101	21

2.3.5 Preparación del cultivo bacteriano de <i>A. tumefaciens</i> cepa GV3101 para la transformación de plantas	22
2.3.6 Transformación estable de zanahoria	23
2.3.7 Transformación estable de tabaco	24
2.4 Ensayos de funcionalidad en LRL de líneas expresoras de <i>DcPHYA</i> de tabaco	25
2.5 Métodos de biología molecular	26
2.5.1 Extracción de ácido Desoxirribonucleico (ADN)	26
2.5.2 Extracción de ácido ribonucleico (ARN)	27
2.5.3 Síntesis de ADN complementario	28
2.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28
2.5.5 Generación de los vectores binarios	30
2.5.6 Determinación de la expresión relativa de genes	32
2.6 Extracción y cuantificación de carotenoides totales	33
2.6.1 Extracción de carotenoides	33
2.6.2 Cuantificación de carotenoides	34
3. Resultados	36
3.1 Análisis bioinformático y estudio funcional de <i>DcPHYA</i> en LRL en <i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco)	36
3.1.1 Análisis <i>in silico</i> del gen fitocromo A de <i>Daucus carota</i>	36
3.1.2 Generación de un vector binario para la expresión de <i>DcPHYA</i> en plantas de tabaco	40



3.1.3 Transformación y obtención de plantas de tabaco expresoras del gen <i>DcPHYA</i>	40
3.1.4 Funcionalidad de <i>DcPHYA</i> en líneas de tabaco	42
3.1.5 Perfil de expresión de genes regulados por PHYA en líneas de tabaco que expresan <i>DcPHYA</i> , crecidas en LRL	44
3.1.6 Perfil de expresión de genes carotenogénicos en líneas de tabaco que expresan el gen <i>DcPHYA</i> , crecidas en LRL	46
3.1.7 Cuantificación de carotenoides y clorofila a y b en líneas de tabaco expresoras del gen <i>DcPHYA</i> , crecidas en LRL	47
3.2 Caracterización del rol de <i>DcPHYA</i> en la síntesis de carotenoides mediante silenciamiento génico en <i>D. carota</i>	50
3.2.1 Generación de un vector binario para el silenciamiento de <i>DcPHYA</i>	50
3.2.2 Transformación y obtención de zanahoria ( <i>Daucus carota</i> ) silenciadas para el gen <i>DcPHYA</i>	51
3.2.3 Perfil de expresión relativa del gen DcPAR1 en líneas de zanahoria silenciadas para el gen <i>DcPHYA</i>	54
3.2.4 Perfil de expresión relativa de genes carotenogénicos y cuantificación de carotenoides totales en líneas de zanahoria silenciadas para el gen <i>DcPHYA</i>	55
4. Discusión	58
4.1 El análisis <i>in silico</i> sugiere que <i>DcPHYA</i> de zanahoria podría codificar para una proteína funcional	58
4.2 <i>DcPHYA</i> codifica para un <i>PHYA</i> funcional que responde a la LRL, inhibiendo la elongación del hipocótilo y regulando la expresión génica de los genes <i>NtPEPCK</i> y <i>NtPAR1-like</i>	59

4.3 Líneas de tabaco expresoras de <i>DcPHYA</i> sometidas a tratamientos con LRL continua presentan una reducción en la expresión relativa de <i>NtPSY1</i> y en la expresión relativa de <i>NtPSY2</i> , sin afectar el contenido de carotenoides totales ni el de clorofila a y b	62
4.4. <i>DcPHYA</i> regula de manera positiva la expresión relativa de <i>DcPSY1</i> y <i>DcPSY2</i> y el contenido de carotenoides totales en raíces de reserva de zanahoria crecida bajo tierra	63
5. Conclusiones	67
6. Proyecciones de la tesis	68
6.1 Científicas	68
6.2 Biotecnológicas	69
7 Referencias	70

## **Lista de tablas**

Tabla I Resumen que incluye los principales resultados del objetivo 1 y las conclusiones derivadas de estos resultados	49
Tabla II Resumen que incluye los principales resultados del objetivo 2 y las conclusiones derivadas de estos resultados	57

## Lista de Figuras

Figura 1. Vía de síntesis de carotenoides simplificada	10
Figura 2. La luz media la activación de la transducción de señales involucradas en la fotomorfogénesis en plantas	15
Figura 3. Ensayo de digestión del plásmido pCR8-PhyA	38
Figura 4. PCR de colonia de <i>A. tumefaciens</i> transformadas con el vector pPhyA:GFP	38
Figura 5. Análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína DcPHYA	39
Figura 6. Proceso de cultivo in vitro y aclimatación en suelo de plantas de tabaco transformadas establemente con el vector pPhyA:GFP	41
Figura 7. Amplificación del ccDB a eGFP del VSI en las plantas transgénicas de tabaco para pDcPHYA:GFP	42
Figura 8. Nivel de expresión relativa de <i>DcPHYA</i> en líneas T1 de tabaco transformadas con pDcPHYA:GFP	42
Figura 9. Largo del hipocótilo en líneas de tabaco expresoras de <i>DcPHYA</i> sometidas a LRL	44
Figura 10. Expresión relativa de genes regulados por PHYA en plantas de tabaco expresoras de <i>DcPHYA</i> sometidas a tratamiento de LRL	46
Figura 11. Expresión relativa de genes carotenogénicos en líneas de tabaco expresoras de <i>DcPHYA</i> sometidas a tratamiento de LRL	47
Figura 12. Contenido de carotenoides totales y clorofila a y b en líneas de tabaco expresoras de <i>DcPHYA</i> sometidas a tratamiento de LRL y oscuridad	49
Figura 13. Digestión del plásmido pCR8-PHYAAs	51

Figura 14. PCR de colonia de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformadas con el vector pDcPhyA-As	51
Figura 15. Amplificación del gen NptII en líneas transformantes de zanahoria	53
Figura 16. Líneas de zanahoria transgénicas transformadas con el vector pDcPHYAas para el silenciamiento del gen <i>DcPHYA</i>	53
Figura 17. Expresión relativa del gen <i>DcPHYA</i> en raíces de reserva de líneas transformadas con el vector pDcPHYA.A.S	54
Figura 18. Expresión relativa de <i>DcPAR1</i> en raíces de reserva de líneas de zanahoria silenciadas para el gen <i>DcPHYA</i>	55
Figura 19. Expresión relativa de genes carotenogénicos en raíces de reserva de líneas de zanahoria silenciadas para el gen <i>DcPHYA</i>	56
Figura 20. Carotenoides totales en líneas transgénicas de zanahoria silenciadas para el gen <i>DcPHYA</i>	57
Figura 21. Propuesta de modelo por el cual en la raíz de reserva de zanahoria crecida bajo tierra estaría acumulando carotenoides	66

## Abreviaciones

DNA: ácido desoxirribonucleico

RNA: ácido ribonucleico.

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario.

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

RT-PCR: transcripción reversa- reacción en cadena de la polimerasa.

qRT-PCR: PCR en tiempo real con transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa.

s: segundo

min: minuto

h: hora

## RESÚMEN

La fotomorfogénesis se refiere a procesos fisiológicos que se desencadenan en presencia de luz y que permiten el desarrollo normal de una planta luego de germinar, lo que se acompaña con un aumento en la síntesis de pigmentos, como carotenoides y clorofilas, requeridos para la fotosíntesis. Mientras que la escotomorfogénesis es cuando una planta germina y crece en oscuridad presentando un fenotipo etiolado, caracterizado por un hipocótilo largo y escasa síntesis de pigmentos. A nivel molecular, cuando las plantas crecen en oscuridad los fitocromos (PHYs) están inactivos en el citoplasma, mientras, que, en el núcleo, miembros de la familia de factores de interacción del fitocromo (PIF) se unen a elementos de respuesta a luz (LRE), situados en los promotores de genes asociados a la síntesis de carotenoides, reprimiendo su expresión. Por otro lado, cuando las plantas perciben la luz blanca (LB) (proceso de de-etiolación), los PHY se activan y traslocan al núcleo de la célula, donde fosforilan a los PIF, lo que conduce a su degradación. Esto último posibilita que a los LRE se unan factores de transcripción del tipo Long Hypocotyl 5 (HY5), que contribuyen a aumentar la expresión de genes relacionados con la síntesis de carotenoides como *PSY*. Procesos similares ocurren durante la maduración de frutos que aumentan el contenido de carotenoides bajo un crecimiento en LB. Por el contrario, en la zanahoria (*Daucus carota*) que es la 7° hortaliza con mayor superficie de plantación a nivel nacional (ODEPA, 2020), se sintetizan y acumulan grandes cantidades de carotenoides en su raíz crecida bajo tierra, en donde tal como en *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), podría llegar una proporción baja de luz roja versus luz roja lejana (LR/LRL). A esto se suma el hecho que bajo LB la raíz de reserva de zanahoria no se desarrolla normalmente, presentando escaso crecimiento secundario, bajo contenido de carotenoides y disminuida expresión de genes carotenogénicos. Mediante un análisis de RNA-seq en nuestro grupo de investigación se comparó los perfiles de expresión génica entre una porción

de raíz de reserva crecida en LB versus una porción de la raíz de reserva crecida bajo tierra. Se encontraron genes asociados a la señalización mediada por luz más expresados en la porción de raíz crecida bajo tierra que la expuesta a LB, tales como *DcPHYA*, *DcPAR1*, *DcCOP1*, *DcCOP9*, *DcPIF3*, *DcPHYB-like*.

En *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), fitocromo A (PHYA) participa en la fotomorfogénesis en sombra al activarse en baja proporción de LR/LRL, donde producto de su acción reprime la excesiva elongación del hipocotilo y favorece la síntesis de carotenoides. En frutos, PHYA activa la síntesis de clorofila y carotenoides. Además, tanto en *Arabidopsis*, como en frutos de tomate, regula positivamente la expresión de *PSY*. Tomando en cuenta los antecedentes anteriormente expuestos se estudió funcionalmente el gen *DcPHYA* de zanahoria y se determinó su rol en la síntesis de carotenoides.

A partir de los resultados obtenidos se determinó que *DcPHYA* comparte un 73,19% de similitud de secuencia aminoacídica con *AtPHYA*, lo que nos indica que fitocromo A de zanahoria podría ser una proteína funcional. Como primera aproximación para estudiar funcionalmente el gen *DcPHYA*, lo expresamos de manera estable en tabaco. Seleccionamos las líneas expresoras de *DcPHYA* EL4, EL6 y EL7 y éstas fueron sometidas a tratamientos con LRL. Demostramos que *DcPHYA* en LRL actúa inhibiendo la elongación del hipocotilo por lo tanto, promoviendo la fotomorfogénesis. Además, regula negativamente la expresión relativa de los genes *NtPEPCK* y *NtPar1-like*. Aunque en este tratamiento, *DcPHYA* no regula positivamente el contenido de pigmentos como carotenoides y clorofilas ni la expresión relativa de los genes carotenogénicos *NtPSY1* y *NtPSY2*. Como segunda aproximación para estudiar funcionalmente a *DcPHYA*, silenciamos el gen en plantas de zanahoria y analizamos su efecto en la raíz de reserva crecida bajo tierra. Obtuvimos 7 líneas de zanahoria transformantes para *DcPHYA* de las cuales seleccionamos la línea ASL2, ASL5, ASL9 y ASL11, que tienen un 86%, 54%, 40% y 27% de silenciamiento del gen, respectivamente. En las 4 líneas analizadas se encontró una menor expresión relativa de *DcPSY1*, lo



que se correlacionó con el menor contenido de carotenoides totales. Mientras que en las líneas ASL2, ASL9 y ASL11 tuvieron menor expresión relativa de *DcPSY2*. Por otro lado, la expresión relativa de los genes *DcLCYB1*, *DcLCYB2* y *DcPAR1* no se vio afectada por el silenciamiento del gen *DcPHYA*. Basados en los antecedentes anteriormente expuestos, sugerimos que *DcPHYA* es activo en LRL, regulando el largo del hipocotilo y la expresión relativa de genes de manera positiva o negativa. Además, *DcPHYA* en la raíz de reserva de zanahoria crecida bajo tierra regula la síntesis de carotenoides a través del aumento en la expresión de *PSY1*.

## Abstract

Photomorphogenesis refers to physiological processes that are triggered in the presence of light and that allow the normal development of a plant after germination, which is accompanied by an increase in the synthesis of pigments, such as carotenoids and chlorophylls, necessary for photosynthesis. On the other hand, scotomorphogenesis is when a plant germinates and grows in the dark, presenting an etiolated phenotype, characterized by a long hypocotyl and poor pigment synthesis. At the molecular level, when plants grow in the dark, Phytochromes (PHYs) are inactive in the cytoplasm, while, in the nucleus, members of the Phytochrome Interacting Factor (PIF) family bind to Light Response Elements (LRE) located in the promoters of genes associated with the synthesis of carotenoids, repressing their expression. On the other hand, when plants perceive White Light (WL) (deethiolation process), PHYs are activated and translocate to the cell nucleus, where they phosphorylate PIFs, leading to their degradation. This allowed that under LREs can bind transcription factors how Long Hypocotyl 5 (HY5), which increased the expression of genes related to the synthesis of carotenoids, such as *PSY*. Similar processes occur during fruit ripening were increased carotenoid content under WL growth. On the contrary, in the carrot (*Daucus carota*), which is the 7th vegetable with the largest plantation area at the national level (ODEPA, 2020), carotenoids are both synthesized and accumulate in its taproot grown underground. In *Arabidopsis thaliana*, a low ratio of Red Light versus Far Red light (R/FR) could arrive. While, in WL taproot of carrot does not develop normally, presenting little secondary growth, both low content of carotenoids and decreased expression of carotenogenic genes. Through an RNA-seq analysis in our research group, the gene expression profiles were compared between a portion of the reserve root grown in WL versus a portion of the reserve taproot grown underground. Genes associated with light signaling were found more expressed in the root portion grown

underground that exposed to WL, such as *DcPHYA*, *DcPAR1*, *DcCOP1*, *DcCOP9*, *DcPIF3*, *DcPHYB-like*.

In *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), Phytochrome A (PHYA) participates in shadow photomorphogenesis by being activated in a low proportion of R/FR, where as a product of its action it represses the excessive elongation of the hypocotyl and favors the synthesis of carotenoids. In fruits, PHYA activates the synthesis of chlorophyll and carotenoids. In addition, both in *Arabidopsis* and in tomato fruits, it positively regulates the expression of *PSY*. Taking into account the above background, the carrot *DcPHYA* gene was functionally switched off and its role in carotenoid synthesis was prolonged.

We found that *DcPHYA* shares a 73.19% similarity of amino acid sequence with *AtPHYA*, which indicates that carrot phytochrome A could be a functional protein. As a first approach to functionally study the *DcPHYA* gene, we expressed this gene in tobacco. We selected EL4, EL6 and EL7 lines and these were subjected to FR treatments. We show that *DcPHYA* in LRL acts by inhibiting hypocotyl elongation, thus promoting photomorphogenesis. Furthermore, it negatively regulates the relative expression of the *NtPEPCK* and *NtPAR1-like* genes. Although in this treatment, *DcPHYA* does not positively regulate the content of pigments, such as both carotenoids and chlorophylls and the relative expression of the carotenogenic genes *NtPSY1* and *NtPSY2*. As a second approach to functionally study *DcPHYA*, we silenced the gene in carrot plants and analyzed its effect on taproot ground-grown. We obtained seven transgenic carrot lines. We selected the ASL2, ASL5, ASL9 and ASL11 lines, which have 86%, 54%, 40% and 27% gene silencing, respectively. In the 4 lines analyzed, a lower relative expression of *DcPSY1* and *DcPSY2* was found, which correlated with the lower content of total carotenoids. Three lines had less relative expression of *DcLCYB1* in compared with Wt line. On the other hand, the relative expression of *DcLCYB2* and *DcPAR1* genes was not affected by *DcPHYA* gene silencing. Based on the background set forth above, we suggest that *DcPHYA* is active at FR, regulating

hypocotyl length and relative gene expression in a positive or negative manner. In addition, *DcPHYA* in taproot carrot grown underground regulates carotenoid synthesis through increased expression of *DcPSY1* and *DcPSY2*.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Los fitocromos son fotoreceptores que participan en la fotomorfogénesis

Los fitocromos (PHYs) pertenecen a una familia de fotoreceptores que en plantas captan distintos tipos de luz para mediar respuestas fisiológicas. Los PHYs están formados por dos dímeros con un peso molecular de 250 kDa y tienen unido un cromóforo que detecta diferentes longitudes de onda de la luz. Esta proteína está bajo la interconversión fotoquímica entre dos isoformas dependiendo de la señal lumínica que detecte. Una isoforma inactiva (Pr) en Luz Roja Lejana (LRL) (700-800) que se encuentra en el citoplasma y una activa (Pfr) en luz roja (LR) (600-700nm) que es traslocada al núcleo (Quail, 1991). Los PHYs activos regulan la expresión de genes, de forma positiva o negativa (Wang, *et al.*, 2002; Tepperman, *et al.*, 2006; Chen, *et al.*, 2014) lo que desencadena el normal crecimiento y desarrollo de las plántulas, aumentando la síntesis de pigmentos, tales como clorofila y carotenoides, que se conoce con el nombre de fotomorfogénesis (Franklin y Quail, 2009).

En *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) se encuentra una familia de cinco genes que codifican fitocromos, el *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* y *PHYE*. Los dominios funcionales de estas proteínas, desde el N-terminal hasta el C-terminal son: un dominio Per/Arnt/Sim (PAS), un dominio ampliamente distribuido en la naturaleza, asociado a la detección y transducción de señales derivadas de estímulos físicos y químicos. Estos dominios entre sí comparten solo un 20% de identidad de secuencia aminoacídica. Pero, comparten una forma de estructura secundaria canónica que consiste en una cadena central  $\beta$ -plegada con cinco hebras A $\beta$ , B $\beta$ , G $\beta$ , H $\beta$  y I $\beta$  y algunas  $\alpha$ -helices denotadas como C $\alpha$ , D $\alpha$ , E $\alpha$  and F $\alpha$ , flanqueando la cadena (Möglich, *et al.*, 2009). Otro dominio, es el cGMP fosfodiesterasa/adenilil ciclasa/FnLA (GAF), que tiene actividad bilin liasa,

necesaria para el ensamblaje de un cromóforo tetrapirrol (fitocromobilin) que va a permitir la absorción de LR o LRL. Además, este dominio permite la interacción proteína-proteína (Cornilescu, *et al.*, 2008). Otro dominio, es el fitocromo específico (PHY), cumple la función de estabilizar el estado fotoactivado Pfr del fitocromo (Böhm, *et al.*, 2021). Dos dominios relacionados al dominio PAS (PAS-A y PAS-B) y un dominio relacionado histidina quinasa (HKRD), que posee actividad histidina quinasa (Shin, *et al.*, 2016). Los tres primeros dominios de la región N-terminal están asociados a la percepción de la señal luminosa y los últimos tres, de la región C-terminal asociados a la transducción de la señal luminosa (Lars-Oliver, *et al.*, 2008; Hoang, *et al.*, 2019).

De acuerdo con su estabilidad en la LR los fitocromos son clasificados en dos grupos: PHYA, es del grupo I por ser el más lábil en LR, por el contrario, del PHYB al PHYE, pertenecen al grupo II, por ser los más estables en LR. Los PHYs más estudiados son PHYA y PHYB. El PHYA es el más abundante en plántulas crecidas en oscuridad, aunque en esta condición esta inactivo, mientras que el más abundante en plántulas crecidas en LB es PHYB (Li, *et al.*, 2011). En tejido fotosintético, la abundancia de transcrito de *PHYB* no se modifica por efecto de la luz (Clack, *et al.*, 1994), mientras que la abundancia de transcrito de *PHYA* es más alto en el tejido que crece en oscuridad (Cantón y Quail, 1999). Por otro lado, en la raíz de *Arabidopsis* la abundancia de transcrito de *PHYA* es la misma en la raíz crecida bajo LB u oscuridad, lo que da cuenta que la expresión de *PHYA* no se regula a nivel transcripcional por el tipo de luz en la raíz de esta planta (Cantón y Quail, 1999).

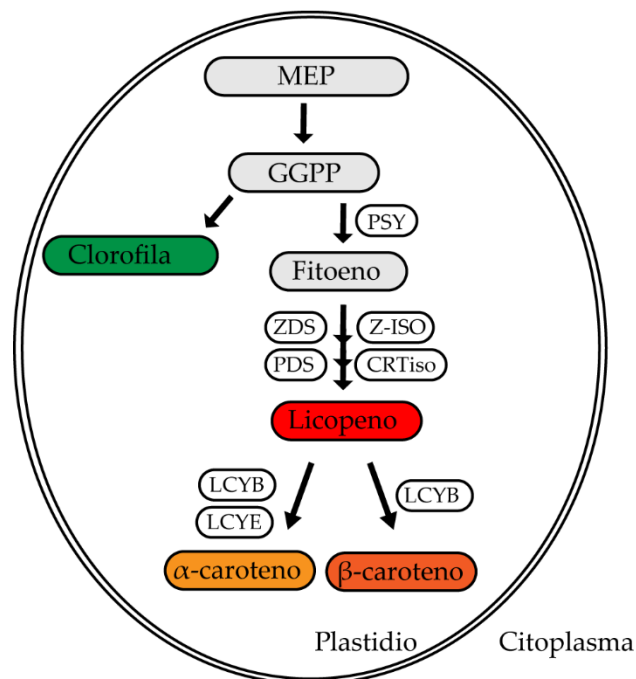
PHYA, además de activarse con poca cantidad de LR (0,1  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ), lo hace con alta cantidad de LRL (> 1000  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ), lo que le confiere la capacidad de percibir la diferencia entre la oscuridad total y las condiciones donde la luz no es suficiente para estimular otros fotoreceptores, como por ejemplo la exposición transitoria a la LB. Por otro lado, la capacidad de percibir grandes cantidades de LRL, le permite percibir la sombra (proporción de LR/LRL baja) originada por hojarasca

o doseles densos (Oka, *et al.*, 2012; Cassal, *et al.*, 2013). En esta última condición de luz se genera el síndrome de huida a la sombra (SAS por sus siglas en inglés) que son respuestas de la planta frente a la alerta de posibles competidores o la falta de LR. Entre las respuestas desencadenadas por el SAS destaca el alargamiento del hipocótilo, para así evadir crecer bajo otras plantas y alcanzar zonas con suficiente LR (Casal, 2013; Sheerin y Hiltbrunner, 2017).

## **1.2 La síntesis de los carotenoides es positivamente regulada por luz en tejido fotosintético y en frutos**

Los carotenoides son pigmentos liposolubles ampliamente distribuidos en la naturaleza, encontrándose aproximadamente 700 diferentes tipos (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Estructuralmente, están formados por cadenas de carbono de longitud variable, que pueden contener insaturaciones, lo que le confiere su poder antioxidante y cromóforo (Stahl y Sies, 2003; Fiedor y Burda, 2014). Son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos, tales como plantas, algas y por algunos no fotosintéticos, como bacterias y hongos (Nisar, *et al.*, 2015). En plantas, los carotenoides son los encargados de entregarle el color amarillo, rojo y naranja característico de flores, frutos y algunas raíces. Particularmente, en órganos fotosintéticos, como las hojas, participan en la fotosíntesis como pigmentos captadores de luz y en la fotoprotección frente al daño fotooxidativo (Hashimoto, *et al.*, 2016). Además, son precursores de hormonas, tales como el ácido abscísico y las estrigolactonas (Nisar, *et al.*, 2015). Se sintetizan y acumulan en los plastidios, como por ejemplo en los cloroplastos en las hojas o en los cromoplastos de los frutos, siendo los cromoplastos los plastidios que más acumulan carotenoides (Sun, *et al.*, 2018). Por otro lado, en los animales, los carotenoides actúan como precursores de la vitamina A y gracias a su poder antioxidante disminuyen el riesgo de enfermedades crónicas y diferentes tipos de cáncer (Nishino, *et al.*, 2000).

La síntesis de carotenoides ocurre en los plastidios de las plantas y comienza con la producción de fitoeno a partir de Geranyl Geranyl Pirofosfato (GGPP), producido en la ruta del Metil Eritrol Fosfato (MEP, por sus siglas en inglés). El GGPP es el sustrato de la enzima fitoeno sintasa (PSY). El fitoeno, luego de cuatro reacciones de isomerizaciones y desaturaciones, forma el licopeno, que es de color rojo. A continuación, la enzima Licopeno  $\beta$ -ciclase (LCYB) cicla los carbonos terminales del licopeno y lo transforma en  $\beta$ -caroteno. Por otro lado, para formar  $\alpha$ -caroteno, se requiere que por un lado de la cadena se cicla por la acción de LCYB y por el otro por la acción de la enzima Licopeno  $\epsilon$ -ciclase (LCYE) (Lang y Ghassemian, 2003) (Figura 1).



**Figura 1. Vía de síntesis de carotenoides simplificada.** Metil eritrol fosfato (MEP), conduce a la producción de Geranylgeranyl Pirofosfato (GGPP), el principal precursor de carotenoides y clorofila. Son mostradas las principales enzimas de la ruta de síntesis de carotenoides como: Fitoeno sintasa (PSY),  $\zeta$ -carotene desaturase (ZDS) phytoene desaturase (PDS)  $\zeta$ -carotene isomerase (Z-ISO) (CRTiso) lycopene  $\epsilon$ -cyclase (LCYE) lycopene  $\beta$ -cyclase (LCYB). (Modificado de Quian-Ulloa y Stange, 2021).

La regulación en la síntesis de carotenoides está dada tanto por estímulos internos de la planta, dependiendo del órgano de la planta donde se producen, como por estímulos externos, como la temperatura y la luz (Bramley, 1997; Sun,



*et al.*, 2018; Stanley y Yao-Wu, 2019). Estudios de cómo la luz regula la síntesis de carotenoides se ha enfocado principalmente en cómo se ve afectada la regulación de la expresión del gen *PSY* y la diferenciación de plastidios hacia aquellos que acumulan mayor cantidad de carotenoides, como cloroplastos y cromoplastos. Esto último facilitado por proteínas chaperonas como Orange (OR), que actúan estabilizando a *PSY* (Lu, *et al.*, 2006; Mass, *et al.*, 2009; Sun, *et al.*, 2018; Waters, *et al.*, 2018).

En tejido fotosintético, la síntesis de carotenoides se inicia durante la de-etiolación que ocurre luego de que las plantas perciben la LB después de germinar en oscuridad (Figura 2). Este proceso es mediado por diferentes fotoreceptores, tales como: PHY, criptocromos (CRY) y fototropinas. En una condición de oscuridad, los PHYs y CRYs, están inactivos en el citoplasma de la célula, mientras que, en el núcleo, miembros de la familia de factores de interacción del fitocromo 1 (PIF1) se unen a Elementos de Respuesta a Luz (ERL), ubicados en los promotores de algunos genes que codifican enzimas claves de la biosíntesis de carotenoides, tal como *PSY*, reprimiendo su expresión (Rodríguez-Villalón, *et al.*, 2009) (Figura 2 a). Sumado a lo anterior, factores de transcripción que se pueden unir a los ERL y regular de manera positiva la expresión de *PSY*, como el factor de transcripción Elongated Hypocotyl 5 (HY5) de la familia Basic leucine zipper (bZIP) (Toledo-Ortiz, *et al.*, 2010), es degradado por la acción de Constitutive Photomorphogenic 1 (COP1), que es una proteína con actividad Ubiquitin ligasa E3. Una vez que COP1 ubiquitina a HY5, lo conduce a su degradación por el proteosoma 26S (Osterlund, *et al.*, 2000; Kumar, *et al.*, 2015). A nivel fenotípico, las plantas presentan un hipocótilo alargado y acumulan escasos carotenoides (Stange y Flores, 2012). Por otro lado, cuando las plantas crecen bajo LB, la forma activa de los PHYs es traslocada al núcleo, donde fosforilan a PIF1, lo que conduce a su degradación (Smirnova, *et al.*, 2012). Sumado a lo anterior, los PHYs interaccionan con COP1, lo que disminuye su actividad Ubiquitin ligasa E3 (Lu, *et al.*, 2015). Por lo tanto, se estabilizan

factores de transcripción como HY5, que se unen a los ERL para promover la expresión de genes que codifican enzimas claves en la biosíntesis de carotenoides, como *PSY* (Oyama, *et al.*, 1997). A nivel fenotípico, las plantas presentan un hipocótilo acortado y acumulan grandes cantidades de carotenoides en comparación a la condición de crecimiento en oscuridad (Stange y Flores, 2012) (Figura 2 c). Una tercera condición de crecimiento, es cuando las plantas crecen bajo sombra. Por un lado, Phytochrome Rapidly Regulated1 (PAR1) actúa uniéndose a PIF1 e impidiendo su unión a los ERL y con ello promoviendo la expresión de genes que codifican enzimas claves en la biosíntesis de carotenoides, como *PSY* (Bou-torrent, *et al.*, 2015). PAR1 (y PAR2) pertenecen a la familia HLH de factores de transcripción que han perdido el dominio básico requerido para la unión al ADN, por lo tanto, pueden regular la expresión de genes indirectamente, a través de su interacción con factores de transcripción, como PIFs, e impidiendo la unión de este último al ADN (Roig-Villanova, *et al.*, 2007; Hao, *et al.*, 2012; Zhou, *et al.*, 2014; Bou-Torrent, *et al.*, 2015; Liu, *et al.*, 2019). Paralelamente, PHYA se transloca al núcleo de la célula (Kim, *et al.*, 2000; Kirchenbauer, *et al.*, 2016) e interacciona con COP1, lo que conduce a la disminución de su actividad Ubiquitin ligasa E3 (Saijo, *et al.*, 2008; Sheerin *et al.*, 2015), además, fosforila a PIF1, lo que produce su degradación (Shin, *et al.*, 2016). Sumado a lo anterior, a partir de estudios funcionales de PHYA, se ha determinado que en LRL, a través de un factor de transcripción, se une al promotor de *PSY* y lo regula positivamente; es decir, *PSY* es un blanco indirecto de PHYA en LRL (Linting, *et al.*, 1997; Chen, *et al.*, 2014). A nivel fenotípico el largo del hipocótilo y la concentración de carotenoides en sombra es intermedia entre oscuridad y el crecimiento en LB (Halliday, *et al.*, 1997; Robson, *et al.*, 2000; Sng, *et al.*, 2020) (Figura 2 c).

PHYA y PHYB poseen funciones antagónicas en sombra. Mientras PHYA se encuentra activo favoreciendo el acortamiento del hipocótilo y la mantención de la fotomorfogénesis, PHYB favorece el alargamiento del hipocótilo, acentuando

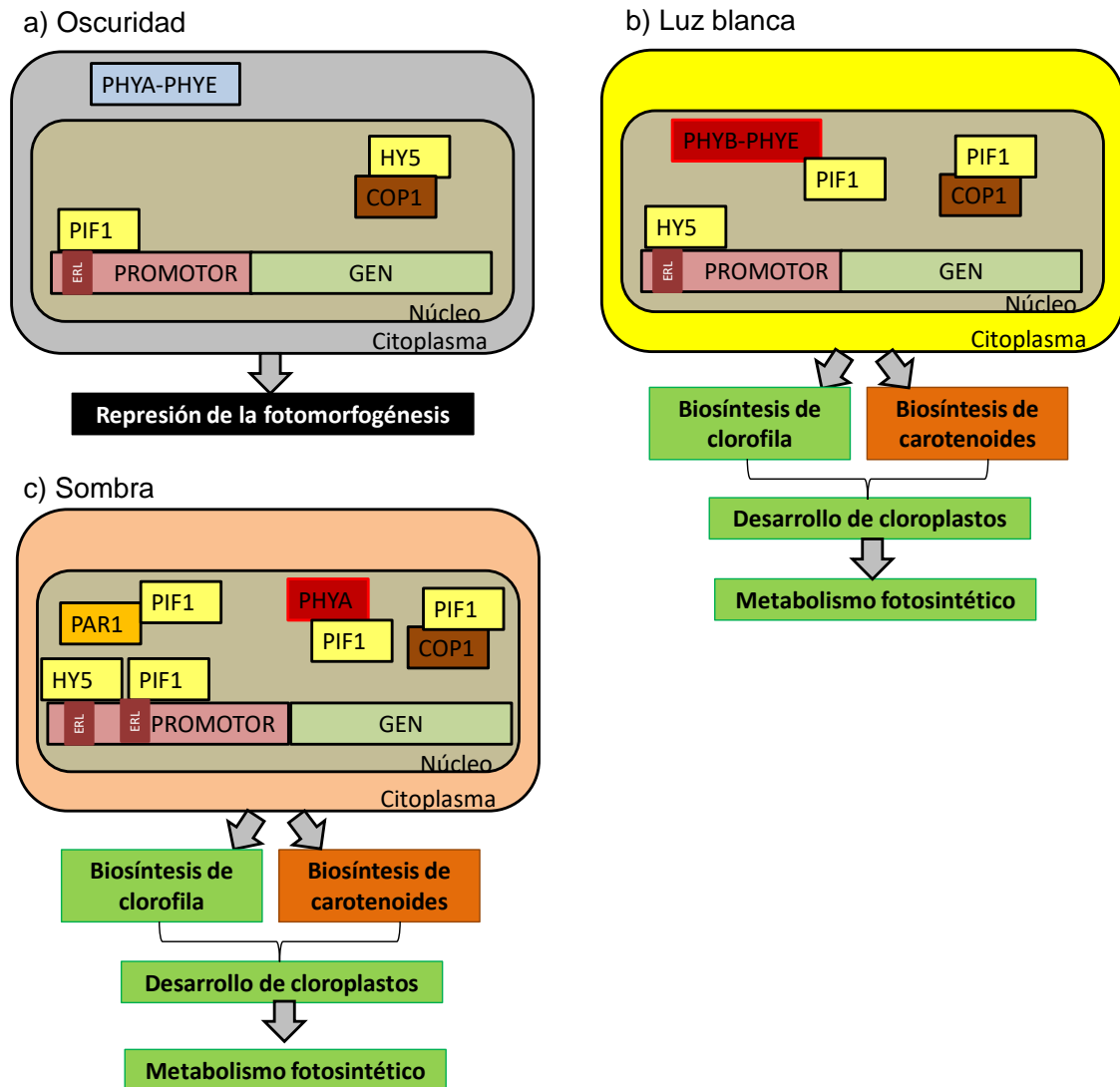
la respuesta SAS en búsqueda de LR (Johnson, *et al.*, 1994; Martínez-García, *et al.*, 2014; Sng, *et al.*, 2020;). Los PHYs regulan la expresión de genes (a través de su interacción con factores de transcripción), la estabilización de ciertas proteínas (inhibiendo su degradación) y la fosforilación de proteínas (conduciendo a su degradación) (Cassal, *et al.*, 2003; Shin, *et al.*, 2016; Hoang, *et al.*, 2019; Yang, *et al.*, 2018; Zhao, *et al.*, 2022). De manera interesante, Chen, *et al.*, (2014) reportó que en *Arabidopsis* en LRL, PHYA regulada negativamente la expresión de *AtPAR1* y a Phosphoenolpyruvate Carboxykinase [ATP]-like (*AtPEPCK*), mientras que induce la expresión de Phytoene synthase (*AtPSY*), light-harvesting chlorophyll-a/b proteins (*AtLCHB*) y Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase (*AtGGPS*)

En frutos, la síntesis de carotenoides se produce durante su maduración, donde la luz, al igual que en el tejido fotosintético, actúa regulando este proceso (Alba, *et al.*, 2000). A medida que el fruto del tomate madura bajo LB, aumenta el contenido de carotenoides y existe un aumento en la expresión relativa de *SIPSY*, con la concomitante diferenciación de cloroplastos hacia cromoplastos en todo el fruto (Ronen, *et al.*, 2000). Además, se observa un aumento en la expresión relativa de genes que codifican para fitocromos, como *SIPHYA*, *SIPHYB1*, *SIPHYB2*, *SIPHYE* y *SIPHYF*, siendo la expresión de *SIPHYA*, acentuada en el interior del fruto (Bianchetti, *et al.*, 2017). Particularmente, en la etapa de desarrollo del fruto de Verde Maduro (MG por sus siglas en inglés), en donde el fruto ha alcanzado su crecimiento final y hay una alta acumulación de cloroplastos, en el centro del fruto llega una baja proporción de LR/LRL (sombra), que proviene de la LB del exterior (Alba, *et al.*, 2000; Llorente, *et al.*, 2016).

Estudios funcionales de PHYs usando un promotor fruto específico para silenciar los genes *SIPHYB* y *SIPHYA*, resultó en una menor acumulación de carotenoides en el fruto, lo que además se correlacionó con una menor expresión relativa de *SIPSY*. A esto se suma el hecho de que en los frutos encontraron una disminución en la expresión relativa de genes que codifican reguladores negativos de la

fotomorfogenesis, como *SIPIF3*, *SICOP1* (Bianchetti, *et al.*, 2018). Por otro lado, frutos que expresan una versión mutada en Tyr252-a-His del dominio GAF de PHYB2, que produce un dominio constitutivamente activo, incrementan la abundancia de transcrito de genes asociados al desarrollo de plastidios y tienen mayor contenido de carotenoides (Alves, *et al.*, 2019). Sumado a lo anterior, plantas con genes silenciados de reguladores negativos de la fotomorfogénesis, tales como *SIDET* y *LeCOP1-like*, presentan un aumento en el contenido de carotenoides totales en el fruto, mientras que plantas silenciadas para reguladores positivos de la fotomorfogénesis, como *LeHY5*, presentan una disminución del contenido de carotenoides totales en el fruto (Cruz, *et al.*, 2018; Liu, *et al.*, 2004). Por lo tanto, las moléculas de señalización por luz están participando en la regulación de la síntesis de carotenoides en los frutos de tomate, al igual que en tejido fotosintético.

El estudio de las plantas modelos anteriormente mencionadas, indica que la luz, a través de la transducción de señales mediadas por PHYs juega un rol clave en la síntesis de carotenoides tanto en tejido vegetativo, como en frutos de la planta. Sin embargo, existen pocos antecedentes respecto de la regulación de síntesis de carotenoides en otros órganos de la planta, como las raíces, y en particular las raíces de reserva acumuladoras de pigmentos que crecen bajo tierra, como es el caso de la raíz de reserva de la zanahoria.



**Figura 2. La luz media la activación de la transducción de señales involucradas en la fotomorfogénesis en plantas.** Transición entre la condición de oscuridad (a) a la condición de luz blanca (b) o Sombra (c), que permite la activación del metabolismo fotosintético gracias al desarrollo de cloroplastos. PHY: fitocromo; HY5: factor de transcripción Long Hypocotyl 5; COP1: constitutive photomorphogenic 1; PIF1: factor de transcripción Phytochrome interacting factor 1; LRE: elementos de respuesta a luz; PAR1: Phytochrome Rapidly Regulated 1; PHYA: fitocromo A (Modificado de Stange y Flores, 2012).

### **1.3 La zanahoria (*Daucus carota*) como modelo de estudio de plantas acumuladoras de carotenoides en la raíz de reserva**

Zanahoria (*Daucus carota*) ( $2n = 2x = 18$ ) es una planta bianual originaria de Asia. A nivel mundial se cultivan 1,2 millones de hectáreas al año (FAOSTAT, 2016), mientras que, en Chile, es la 7° hortaliza con mayor superficie de plantación (ODEPA, 2020). La zanahoria acumula grandes cantidades de carotenoides en su raíz crecida bajo tierra, alcanzando hasta 1,5 mg/g de peso seco, siendo los carotenoides acumulados preferentemente  $\alpha$  y  $\beta$  caroteno (Stange, *et al.*, 2008).

Hasta el momento, no se sabe con certeza si la raíz de reserva de zanahoria que crece bajo tierra lo hace en oscuridad absoluta o si lo hace bajo algún contexto de luz. Estudios realizados por Sun, *et al.*, (2003 y 2005) en más de 30 diferentes especies de plantas y por Lee *et al.*, (2016) en *Arabidopsis*, aportan conocimiento a favor de la segunda hipótesis, ya que demostraron que la luz atraviesa los haces vasculares de las plantas, transportándose a través de ella. La LB proveniente del exterior, que tiene una alta proporción de LR/LRL, se va modificando a medida que se transporta a través de la planta, ya que la LR se va absorbiendo por pigmentos como la clorofila (Llorente, *et al.*, 2016), lo que finalmente genera que hasta las raíces llegue una baja proporción de LR/LRL (sombra), que fue capaz de activar al fotoreceptor PHYB (Lee, *et al.*, 2016). Por lo tanto, basados en estos antecedentes, podríamos hipotetizar que la raíz de zanahoria que crece bajo tierra, lo hace en un contexto de baja proporción de LR/LRL y no de oscuridad absoluta.

En la raíz de reserva de zanahoria que crece bajo tierra hay una alta abundancia de transcritos de genes carotenogénicos como *DcPSY1* y *DcPSY2* y una alta diferenciación de sus plastidios hacia cromoplastos (Ben-Shaul, *et al.*, 1965; Fuentes, *et al.*, 2012), mientras que la LB sobre la raíz de reserva de zanahoria tiene un efecto negativo, tanto en la expresión relativa de genes carotenogénicos, como *DcPSY1* y *DcPSY2*, como en la acumulación de carotenoides (Stange, *et*

*al.*, 2008; Fuentes, *et al.*, 2012). Esto último es diferente a lo que ocurre en tejido fotosintéticos y frutos (Quián-Ulloa y Stange, 2021). Dado que se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales se regula este proceso, en nuestro grupo de investigación se realizó un análisis de ARNseq para identificar genes inducidos en la raíz de reserva crecida bajo tierra y reprimidos por LB. El análisis de RNAseq arrojó que genes como *DcCOP1*, *DcCOP9*, *DcPIF3*, *DcPAR1* y el fotoreceptor *DcPHYA*, que participan en la fotomorfogénesis, se encontraban mayormente expresados en la condición de la raíz crecida bajo tierra (Arias *et al.*, 2020). Estos genes se están caracterizando en nuestro grupo de investigación. Avances realizados en la caracterización funcional de *DcPAR1* muestran que líneas de zanahoria knock-down para este gen disminuyeron drásticamente el desarrollo, la acumulación de carotenoides totales y expresión relativa de genes carotenogénicos como *DcPSY1* y *DcPSY2* en su raíz de reserva crecida bajo tierra (Arias, 2019). Por lo tanto, los genes encontrados luego del análisis de RNA-seq, podrían ser requeridos en la raíz de reserva de zanahoria para la síntesis de carotenoides y/o el desarrollo secundario. Otro gen interesante de estudiar es *DcPHYA*, por su rol en la fotomorfogénesis anteriormente mencionado y además porque la expresión de *DcPHYA* en la raíz de reserva de zanahoria es fuertemente inhibida por la LB, a diferencia de lo observado en *Arabidopsis*. Por lo tanto, en esta tesis doctoral se estudió la función de *DcPHYA* y su rol en la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva de zanahoria crecida bajo tierra.

## 1.4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis científica

El gen fitocromo A de zanahoria (*DcPHYA*) codifica una proteína funcional que promueve la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva de zanahoria (*Daucus carota*) crecida bajo tierra

### Hipótesis tecnológica

El gen fitocromo A de zanahoria (*DcPHYA*) es un buen candidato para promover la acumulación de carotenoides en órganos de plantas que crecen bajo tierra mediante ingeniería genética

### Objetivo general

Evaluar funcionalmente el gen *DcPHYA* y su participación en la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva de zanahoria (*Daucus carota*) crecida bajo tierra

### Objetivos específicos

- a) Caracterizar funcionalmente la respuesta del *DcPHYA* a luz roja lejana (LRL)
- b) Determinar el rol de *DcPHYA* en la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva de zanahoria (*Daucus carota*) crecida bajo tierra



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Medios de cultivo y materiales de biología molecular

Buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8), Buffer CTAB (Bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM y Tris 100 mM pH 8). Murashige and Skoog Basal Medium with vitamins (PhytoTechnology Laboratories®) (MS) líquido (1X, 2% Sacarosa) y sólido (MS líquido, suplementado con agar-agar al 0,7%), Medio Luria Bertani (LB) líquido (Tryptona 2% p/v, NaCl 0,8% p/v, Extracto de levadura 0,5% p/v) y sólido (LB líquido, suplementado con agar-agar 1,6%), enzimas tales como, Taq ADN polimerasa Invitrogen®, PfuUltra II Agilent®, Shappire Takara bio®, antibióticos, tales como, Kanamicina, Gentamicina, Higromicina B, Timentin, Rifampicina y Espectinomicina (PhytoTechnology Laboratories®) y solventes tales como, hexano, acetona, etanol, buffer de carga 6X (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol, 15% glicerol).

### 2.2 Materiales Biológicos

Material vegetal: Plantas silvestre de zanahoria var Nantesa (*Daucus carota*) y tabaco (*Nicotiana tabacum* Xanthi NN).

Material microbiológico: *Echerichia coli* cepa TOP10 (Invitogen™) y *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101.

### 2.3 Métodos de cultivo y transformación génica de bacterias y plantas

#### 2.3.1 Producción de células quimiocompetentes de *E. coli* cepa Top10

Se realizó un precultivo bacteriano inoculando 5 mL de medio LB líquido con 10 µL de *E. coli* cepa Top 10. Se incubó el precultivo a 37°C en agitación constante durante toda la noche. Luego, se inocularon 100 mL de medio LB líquido con 1

mL del precultivo y se incubó a 37°C en agitación constante hasta obtener una densidad óptica (DO) de 0,4-0,6 (12 h., aproximadamente). Una vez alcanzada la DO, las bacterias se incubaron en hielo durante 10 min. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 4000 g a 4°C por 10 min, el precipitado, conteniendo las bacterias, se resuspendió en 25 mL de MgCl<sub>2</sub> 0,1M frío y se dejaron en hielo durante 5 min. Luego, se centrifugaron a 4000 g a 4°C durante 10 mi. El precipitado, conteniendo las bacterias quimiocompetentes, se resuspendió cuidadosamente en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1M 85% y glicerol 15% el que fue alicuotado en 100 µL en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Las alícuotas de bacterias fueron aclimatadas a -20°C durante 20 min. y luego almacenadas a -80°C hasta su uso.

### **2.3.2 Transformación de *E. coli* cepa Top10 quimiocompetentes**

Para la transformación de las bacterias *E. coli* cepa Top10 se le agregaron 6 µL de plásmido pCR8-DcPHYAas, pCR8-DcPHYA, pPhyAas y pPhyA:GFP y pGWB5 (vector sin inserto, VSI) (Sección 2.5.5) a una alícuota de 100 µL de *E. coli* cepa TOP 10 quimiocompetentes (Sección 2.3.1) o 6 µL de agua libre de nucleasas, como control negativo. Luego, las bacterias fueron incubadas durante 22 min. en hielo. Posterior a la incubación, se realizó un shock térmico a 42°C durante 30 s. y se transfirieron a hielo. Después se le agregaron 250 µL de medio LB líquido y se incubaron a 37°C en agitación constante durante 1 h. A continuación, se tomaron 100 µL del cultivo bacteriano y se sembró en en placas con medio LB sólido. Unas de las placas usadas estaban suplementadas con un agente de selección, el antibiótico espectinomycin y otras con kanamicina, para seleccionar las colonias positivas de los vectores pCR8-DcPHYAas, pCR8-DcPHYA y pPhyAas, pPhyA:GFP, respectivamente (Anexo Tabla I). Estas placas también fueron usadas como control negativo de crecimiento bacteriano, ya que fueron sembradas las bacterias transformadas con agua libre de nucleasas. Otras de las placas usadas no estaban suplementadas con agente de selección y fueron usadas como control positivo de crecimiento bacteriano. Todas las placas fueron incubadas en una estufa a 37°C durante 16 h., tiempo en el cual

las colonias bacterias proliferaron. Se seleccionaron 10 colonias a las que se les realizó una PCR para determinar la presencia del transgén (Sección 2.5.4). Las colonias positivas para el PCR fueron inoculadas en medio LB líquido suplementado con antibiótico espectinomina o kanamicina, dependiendo del plásmido con el cual fueron transformadas, e incubadas a 37°C en agitación constante durante toda la noche. Se tomó una alícuota de las bacterias, que fueron mezcladas con glicerol 15% y almacenadas a -80°C hasta su uso.

### **2.3.3 Producción de células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* cepa GV3101**

Se siguió el protocolo de Holsters *et al.*, (1978). Brevemente, se realizó un precultivo bacteriano inoculando 5 mL de medio LB líquido con 10 µL de *A. tumefaciens* cepa GV3101 suplementado con antibiótico rifampicina (10mg/L) y gentamicina (50mg/L), que permiten la selección de ADN cromosómico y ADN del plásmido Ti, respectivamente. Se incubó el precultivo a 28°C en agitación constante durante toda la noche. Luego, se inocularon 50 mL de medio LB líquido con 500 µL del precultivo y se dejó creciendo a 28°C en agitación constante durante toda la noche. Al día siguiente, el cultivo se dejó en hielo durante 30 min. A continuación, se centrifugó a 4000 g a 4°C durante 10 min. El precipitado se resuspendió cuidadosamente en 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM y se centrifugó a 4000 g a 4°C durante 5 min. El precipitado se resuspendió en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM y fue alicuotado en 200 µL y almacenado a -80°C hasta su uso.

### **2.3.4 Transformación de células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* cepa GV3101**

Se siguió el protocolo de Holsters *et al.*, (1978). Brevemente, a un tubo conteniendo 200 µL de células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* cepa GV3101 (Sección 2.3.3) se le añadieron 500 ng de ADN de los plásmidos pPhyAas y pPhyA:GFP y pGWB5 (VSI), mientras que a otro tubo se le agregó agua libre de nucleasas, como control negativo de transformación. Los tubos se

mantuvieron en hielo durante 30 min. Luego, fueron congelados en nitrógeno líquido durante 5 min. Después se realizó un shock térmico a 37°C por 5 min. y se incubaron en hielo durante 5 min. Finalizado el tiempo de incubación, a los tubos se le añadió 1 mL de medio LB líquido y se incubaron a 28°C durante 3 h. Posteriormente, con una alícuota de 200 µL de las bacterias se realizó una siembra en césped en placas conteniendo medio LB sólido. Unas de las placas estaban suplementadas con antibiótico rifampicina (10mg/L), gentamicina (50mg/L) y con kanamicina (100 mg/L) usado como agente de selección para los vectores pPhyAas y pPhyA:GFP (Anexo Tabla I). Estas placas también fueron usadas como control negativo de crecimiento bacteriano, ya que fueron sembradas las bacterias transformadas con agua libre de nucleasas. Otras de las placas usadas solo contenían los antibióticos rifampicina (10mg/L), gentamicina (50mg/L), no así kanamicina, ya que estas placas fueron usadas control positivo de crecimiento bacteriano. Todas las placas fueron incubadas en una estufa a 28°C durante 48 h., tiempo en el cual las colonias bacterias proliferaron. Se seleccionaron 10 colonias a las que se les realizó una PCR para determinar la presencia del transgén (Sección 2.5.4). Las colonias positivas para el PCR fueron inoculadas en medio LB líquido suplementado con antibiótico rifampicina (10mg/L), gentamicina (50mg/L) y kanamicina (100 mg/L) e incubadas a 28°C en agitación constante durante toda la noche. Se tomó una alícuota de las bacterias, que fueron mezcladas con glicerol 15% y almacenadas a -80°C hasta su uso.

### **2.3.5 Preparación del cultivo bacteriano de *A. tumefaciens* cepa GV3101 para la transformación de plantas**

Se dejó creciendo un precultivo de *A. tumefaciens* GV3101 transformada previamente con el vector pPhyAas y pPhyA:GFP en 5 mL de LB líquido suplementado con Rifampicina (10 mg/L), gentamicina (50 mg/L) y Kanamicina (100 mg/L) (Sección 2.3.4) a 28°C en agitación constante durante 12 h. Luego, se tomaron 200 µL del precultivo para inocular 30 mL de medio LB líquido suplementado con los antibióticos rifampicina (10 mg/L), gentamicina (50 mg/L)

y Kanamicina (100 mg/L). El cultivo se dejó creciendo a 28°C en agitación constante durante 12 h. o hasta alcanzar una D.O.600 de 0,3-0,6. Luego, el cultivo se centrifugó a 4000 g durante 10 min. y el precipitado se resuspendió en 30 mL de medio MS líquido suplementado con acetosiringona a 200 µM.

### **2.3.6 Transformación estable de zanahoria**

Se transformaron explantes de zanahoria siguiendo el protocolo de Gonzalez-Calquín y Stange (2020). Bajo una cámara de flujo laminar, para mantener la esterilidad, semillas de zanahoria variedad Nantesa fueron esterilizadas sumergiéndolas en una solución al 2% (p/v) del fungicida captan, en agitación constante, durante 20 min. Luego, las semillas fueron enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril. Después, se sumergieron en hipoclorito de sodio (2,6%), en agitación constante, durante 60 min. Terminado el tiempo de agitación, las semillas fueron enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril. Las semillas estériles, fueron secadas sobre papel absorbente estéril y sembradas en frascos conteniendo medio MS 1X sólido. Los frascos se dejaron en fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, por un mes, hasta que las plantas llegaron a una altura de 8 cm. aproximadamente. La transformación de los explantes de zanahoria se llevó a cabo cortando trozos de tallo (epicotilos) de 1 cm aproximadamente e incubándolos durante 25 min. en una suspensión de *A. tumefaciens* cepa GV3101 previamente transformada con el vector pPhyAas (Sección 2.3.5) para el silenciamiento del gen *DcPHYA* y con pGWB5 (VSI) como control negativo. En este punto, también se dejaron explantes Wt en placas Petri con medio MS, pero sin incubar con la bacteria, como control negativo de la transformación. Terminado el periodo de incubación, los explantes transformados se secaron con papel absorbente y fueron depositados en placas con medio MS 1X sólido, que más tarde se incubaron en oscuridad durante 2 días, para que la bacteria lograra infectar las células de la planta. A continuación, los explantes fueron lavados con agua destilada estéril suplementado con timentin (300mg/) y secados con papel absorbente estéril, para ser depositados en una placa de

MS1X sólido, suplementado con el agente de selección higromicina (2 mg/L) y la hormona, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, 1mg/L) (Anexo Tabla II) para inducir la producción del tejido pre-embionario en oscuridad. Los explantes permanecieron en este medio durante 1 mes, aproximadamente. Una vez formado el tejido pre-embionario, los explantes fueron depositados en un nuevo medio MS 1X sólido suplementado con higromicina (4 mg/L) y la hormona, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, 0,5 mg/L) (Anexo Tabla II), para inducir la producción de embriones inmaduros (globulares). En este medio los explantes estuvieron entre 1 a 2 meses, refrescado el medio cada 1 mes, aproximadamente. Los embriones inmaduros producidos se traspasaron a placas con MS sólido, suplementado solo con el agente de selección higromicina (6 mg/L) (Anexo Tabla II), para inducir la maduración y diferenciación a plántulas. Los embriones permanecieron en este medio durante 3 meses aproximadamente, refrescado el medio cada 1 mes, aproximadamente hasta la diferenciación de las plántulas. Las plántulas formadas fueron transferidas a frascos con medio MS1X para su elongación. Al alcanzar 5 cm aproximadamente, fueron trasplantadas a maceteros conteniendo una mezcla de vermiculita: tierra de hoja (ANASAC) (1:1) y se aclimataron a las condiciones de humedad del invernadero durante cuatro semanas, aproximadamente. Las plantas, ya aclimatadas en el invernadero, fueron regadas con agua 2 veces por semana y fueron mantenidas hasta los 4-5 meses de edad, hasta realizar los ensayos moleculares y funcionales.

### **2.3.7 Transformación estable de tabaco**

Para la transformación de tabaco se siguió el protocolo descrito en (Horsh, *et al.*, 1985; Moreno, *et al.*, 2013). Bajo una cámara de flujo laminar, para mantener la esterilidad, fueron esterilizadas semillas de tabaco con hipoclorito de sodio (2,6%), más 3 gotas de Tween 20 en agitación constante durante 10 min. Luego, las semillas se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se sembraron en frascos con medio MS 1X sólido. Los frascos luego fueron dejados bajo

fotoperiodo 16 hrs. luz y 8 hrs. oscuridad, durante un mes aproximadamente, hasta que aparecieron las primeras hojas verdaderas. Se cortaron las hojas de las plantas y estas fueron incubadas durante 10 min. con una suspensión de *A. tumefaciens* cepa GV3101 previamente transformada con el vector pPhyA:GFP y el VSI (Sección 2.3.5). Luego, las hojas fueron secadas con papel absorbente estéril y se depositaron en placas de MS sólido, que fueron incubadas en oscuridad durante 2 días, para que la bacteria lograra infectar las células de la planta. Después, las hojas fueron lavadas con agua destilada estéril suplementada con Timentin (300mg/) y secadas con papel absorbente estéril, para ser depositados en una placa conteniendo medio MS 1X sólido, suplementado con las hormonas Ácido indolbutírico (IBA) a una concentración de 5 mg/L, 6-Benzylaminopurine (BAP), a una concentración de 1 mg/L y el agente de selección higromicina (Anexo Tabla II). Cuando en las hojas aparecieron pequeñas plántulas, estas fueron cambiadas a otra placa conteniendo medio MS sólido suplementado con el agente de selección higromicina (Anexo Tabla II), donde las plántulas comenzaron a desarrollarse. Para permitir el crecimiento y enraizamiento de las plántulas, éstas fueron cambiadas a frascos conteniendo medio MS sólido suplementado con agente de selección higromicina (Anexo Tabla II). Cuando las plántulas transformantes alcanzaron una altura de 5 cm, fueron transferidas a maceteros conteniendo una mezcla de vermiculita: tierra de hoja (ANASAC) (1:1) y se aclimataron a las condiciones de humedad del invernadero durante 3 semanas, aproximadamente. Las plantas ya aclimatadas en el invernadero fueron regadas con agua 2 veces por semana y las semillas T1 fueron recuperadas para realizar los ensayos funcionales del gen *DcPHYA*.

#### **2.4 Ensayos de funcionalidad en LRL de líneas expresas de *DcPHYA* de tabaco**

Semillas estériles de tres líneas expresas de gen *DcPHYA* de zanahoria en tabaco T1 (Sección 2.3.7) y una línea VSI fueron sembradas en placas Petri con MS sólido. A continuación, las semillas se estratificaron en oscuridad a 4°C

durante 5 días para romper la dormancia de las semillas y promover la germinación homogénea. Luego, se realizó un pulso de luz blanca durante 10 min. para promover la germinación. Para el ensayo con LRL, se dejaron germinar y crecer *in vitro* las semillas durante 7 días en LRL en carpas de interior acondicionadas con luces LED LRL (20  $\mu\text{m}/\text{ms}^2$ ). Como control negativo, las semillas se dejaron en las mismas condiciones, pero en oscuridad, para lo cual las placas fueron tapadas con papel alusa de aluminio y mantenidas dentro de la misma carpa de interior que las tratadas con LRL. Finalizado el tratamiento, se realizaron mediciones a nivel fenotípico y se recolectó tejido en nitrógeno líquido para realizar ensayos moleculares y de concentración de carotenoides en planta completa. Se sembraron 10 placas Petri con semillas de cada línea analizada, incluyendo a la línea VSI.

## **2.5 Métodos de biología molecular**

### **2.5.1 Extracción de ácido Desoxirribonucleico (ADN)**

La extracción se realizó de acuerdo con el protocolo de Doyle y Doyle, (1990). Brevemente, se molieron con nitrógeno líquido en un mortero estéril 200 mg de hoja de líneas transformantes de zanahoria, transformadas con el vector pPhyAas para el silenciamiento del gen, una línea Wt, de líneas transformantes de tabaco transformadas con el vector pPhyA:GFP para la expresión del gen *DcPHYA* y líneas transformadas con el pGWB5 (VSI). Luego, se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de buffer CTAB (Sección 2.1) suplementado con 2% de p-mercaptoetanol, previamente calentado a 60°C. La mezcla se transfirió a un tubo de 2 mL para incubarlo durante 20 min. a 60°C. Posteriormente, se adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 13.000 g por 10 min. Al sobrenadante se le añadió 1 volumen de Isopropanol frío y se dejó precipitando durante 1 hora a -20°C. Se centrifugó la muestra a 13.000 g durante 10 min. El precipitado se lavó con Etanol frío al 75% (preparado con agua libre de nucleasas) y se secó por inmersión del tubo durante 20 min. El precipitado se



re-suspendió en 40 µL de agua libre de nucleasas. La concentración del ADN se determinó en un espectrofotómetro Nanodrop (Nanovue marca™) a 260 nm. También se determinaron las razones de 260/280 y 260/230, que indican presencia de proteínas y de contaminantes en la muestra, respectivamente. Los valores debían estar lo más cerca posible de 2 para considerar las muestras adecuadas para seguir trabajando con ellas. Las muestras fueron guardadas a -20°C hasta su uso.

### **2.5.2 Extracción de ácido ribonucleico (ARN)**

La extracción de ARN se realizó según Fuentes, *et al.*, (2012), se molió con nitrógeno líquido, en un mortero previamente esterilizado, entre 50 - 100 mg de tejido tanto de raíz de zanahoria transgénica silenciada para el gen *DcPHYA* y la línea silvestre y entre 100 - 200 mg de plántulas completas de tabaco expresoras de *DcPHYA* y la línea VSI. Luego, se agregó 1 mL de buffer CTAB suplementado con 2% de p-mercaptoetanol y las muestras fueron incubadas a 65°C durante 15 min. Después, se agregó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 13000 g a 4°C durante 20 min. El sobrenadante fue recuperado. Este paso se repitió dos veces. Posteriormente, se agregó un 1/3 del volumen de LiCl 10 M y se dejó precipitando a 4°C toda la noche. Transcurrido el tiempo de precipitación, la muestra se centrifugó a 13.000 g a 4°C por 15 min. Al precipitado se le agregó 1 mL de etanol 70% (preparado en agua con DEPC) y se centrifugó a 13.000 g a 4°C por 10 min. El sobrenadante fue eliminado, mientras que el precipitado conteniendo el ARN se dejó secar por inversión durante 20 min, aproximadamente. A continuación, el precipitado fue re-suspendido en 20 µL de agua libre de nucleasas. La concentración de ARN se determinó en un espectrofotómetro Nanodrop (Nanovue marca) a 260 nm. También se determinaron las relaciones de 260/280 y 260/230, que indican presencia de proteínas y de contaminantes en la muestra, respectivamente. Los valores debían estar lo más cerca posible de 2 para considerar las muestras adecuadas para seguir trabajando con ellas. Luego, la integridad del ARN se verificó en una

electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con Gel Red® (Biotium) que fue realizada a 85 Voltios durante 30 min. Las bandas en el gel se visualizaron en luz UV en el transiluminador DarkRoom Multigenius Syngene®. Las muestras fueron guardadas a -80°C hasta su uso.

### **2.5.3 Síntesis de ADN complementario**

A partir de ARN mensajero se sintetizó la hebra complementaria de ADN (ADNc). En primer lugar, se realizó el tratamiento de DNasa I para eliminar el ADN genómico de las muestras. Para ello, a 3 µg de ARN total se le agregó 1 µL de la enzima DNasa I (Fermentas), 1 µL de Inhibidor de RNasa (Ribolock, Fermentas) y 2 µL de tampón de la DNasa I (Fermentas), y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 20 µL. Se incubó durante 40 min, a 37°C. Para detener la actividad de la enzima DNasa I, se agregó 1 µL de EDTA pH 8.0 50 mM e incubando a 65°C, durante 10 min.

Para la síntesis de cDNA, se tomaron 9 µL del ARN tratado con DNasa I, los que se mezclaron con 1,5 µL de oligo AP 10 µM (5'-CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT -3') y se incubó a 70°C durante 5 min. Luego, se le agregaron 0,5 µL de Inhibidor de RNasa (Ribolock, Fermentas), 1 µL de dNTPs 10 mM (Fermentas), 2,8 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, y 4 µL de tampón 5x de la transcriptasa reversa (RT) Improm II (Promega) y 1,2 µL de RT Improm II (Promega) e incubado, durante 60 min a 42°C para la extensión. Después, la muestra fue incubada a 70°C durante 15 min, para inactivar la enzima RT.

### **2.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se usaron 3 diferentes enzimas para las amplificaciones de ADN: 1) Taq polimerasa (Invitrogen) que corresponde a una ADN polimerasa termoestable aislada de *Thermus aquaticus*, con actividad polimerasa 5'-3', 2) PFU ultra II (Agilent), que corresponde a una ADN polimerasa de alta fidelidad, con actividad

polimerasa 5'-3' y actividad exonucleasa 3'-5' y 3) Shappire (Takara bio Inc.) una ADN polimerasa altamente procesiva, pero con baja fidelidad.

Para las reacciones de amplificación de un fragmento conservado de 516 pb del gen *DcPHYA* para producir el silenciamiento y la genotipificación de las líneas transgénicas de zanahoria y tabaco se realizó con 2,5 µL de Buffer 10X, 0,5 µL de cada uno de los partidores (10 µM), 0,5 µL de dNTPS (10 µM), 0,25 µL de Taq polimerasa, 30 ng de ADN y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 25 µL. Para amplificar el marco de lectura abierto del gen *DcPHYA* se usó 0,5 µL de la enzima PFU ultra II, 2,5 µL de Buffer 10X, 0,5 µL del partidor tanto del partidor derecho (10 µM), como el reverso (10 µM), 0,625 µL dNTPs (10 mM), 30 ng de cDNA y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 25 µL. Los partidores fueron diseñados basados en la secuencia codificante del gen *DcPHYA* de zanahoria, recuperado de la secuencia DCAR\_001880 de Phytozome V2 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Para los PCR de colonia se utilizó la enzima Shappire, en reacciones que contenían 12,5 µL de Máster mix 2X (que contiene la enzima y buffer), 0,5 µL tanto del partidor derecho (10 µM), como el reverso (10 µM), 1 µL de ADN templado y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 25 µL.

Las condiciones térmicas de amplificación de cada una de las enzimas se especifican en la Tabla IV (Anexo Tabla IV). Además, se incluye la lista de partidores usados y se especifica en qué condiciones se usó cada uno (Anexo Tabla III). Se usaron los cálculos de la temperatura de disociación ( $T_m$ ) teórica para ser usados. Todos los productos de PCR fueron visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 1,5% resueltos a 85 V por 30 min. y teñidos con bromuro de etidio. Las bandas en el gel se visualizaron en luz UV en el transiluminador DarkRoom Multigenius Syngene®.

### 2.5.5 Generación de los vectores binarios

Para clonar un fragmento de 516 pb y el marco de lectura abierto de 3387 pb del gen *DcPHYA* para el silenciamiento a través de ARN antisentido y la expresión del gen, respectivamente, se usó el vector de entrada pCR8/GW/TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) que es un vector linearizado con proyecciones simples de 3'-Timina (T), para TA Cloning<sup>®</sup>, al que se encuentra unida covalentemente la enzima topoisomerasa I. La clonación se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las amplificaciones (Sección 2.5.4), tanto del fragmento del gen de 516 pb a partir de ADN<sub>g</sub>, como del marco de lectura abierto del gen *DcPHYA* a partir de ADN<sub>c</sub> (Sección 2.5.3), se purificaron con el kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel, siguiendo las especificaciones del fabricante y se ligaron al vector de entrada pCR8/GW/TOPO<sup>®</sup> que posee los sitios de recombinación attR1 y attR2. Después, se transformaron bacterias quimiocompetentes de *E. coli* cepa TOP 10 (Sección 2.3.2). A las colonias que crecieron se les realizó un PCR de colonia para comprobar la presencia del inserto (Sección 2.5.4). Luego, las colonias que fueron PCR positivas se les extrajo el ADN plasmidial (ADN<sub>p</sub>) con el kit E.Z.N.A. <sup>®</sup> Plasmid DNA Mini Kit I (OMEGA bio-tek), siguiendo las recomendaciones del fabricante. A continuación, para comprobar la direccionalidad del inserto, los plásmidos purificados fueron digeridos con enzimas de restricción. El plásmido conteniendo el fragmento de 516 pb del gen *DcPHYA*, fue digerido con las enzimas *Bsa*I (Biolabs) y *Bst*YI (Biolabs), para ello 1 µg del ADN<sub>p</sub> se incubó con 10 U de cada una de las enzimas *Bsa*I y *Bst*YI, el tampón CutSmart<sup>®</sup> y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 25 µL. La reacción se incubó primero con la enzima *Bsa*I a 37°C durante 1 hora y luego con la enzima *Bst*YI a 60°C durante 1 hora. Cuando el inserto se encontraba en sentido se generaban productos de 1508 pb, 1416 pb, 397 pb, 11 pb, mientras que si el inserto se encontraba en antisentido se esperaban productos de 1754 pb, 1170 pb, 397 pb, 11 pb. El inserto en antisentido es el necesario para posteriormente realizar el silenciamiento a través de ARN antisentido. Por otro lado, para el plásmido que

contenía el marco de lectura abierto de 3387 pb del gen *DcPHYA*, el ADNp fue digerido con la enzima *VspI*, para lo cual 1 µg del ADNp se incubó con 10 U de la enzima *VspI*, tampón O y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 25 µL. La reacción se incubó a 37°C durante 1 hora. Cuando el inserto se encontraba en sentido se generaban productos de 3210 pb y 2935 pb y 59 pb, mientras que, si se encontraba en antisentido, se esperaban productos de 5056 pb, 1089 pb y 59 pb. Las bacterias que contenían los plasmidos con el inserto en sentido fueron usadas para la expresión del gen *DcPHYA* en tabaco. Tres colonias de los plasmidos pPhyAas y pPhyA:GFP con el patrón que se buscaba, se secuenciaron en MacroGen, USA ([www.macrogenusa.com](http://www.macrogenusa.com)) y la secuencia se comparó con la secuencia publicada en Phytozome, para verificar que no hubiera mutaciones. De esta manera se obtuvieron los vectores pCR8-PHYAas y pCR8-PHYA.

Para la obtención de los vectores binarios de expresión en plantas, se utilizó la tecnología Gateway, que está basada en recombinación homóloga, donde los vectores de entrada poseen sitios de recombinación attR1 y attR2, mientras que los vectores de expresión sitios attL1 y attL2. Los vectores de expresión en plantas usados fueron pGWB2 y pGWB5, ambos poseen un promotor del Virus del Mosaico del Tabaco (CaMV 35S) y el terminador NOS. Sumado a lo anterior, el vector pGWB5 cuenta con una secuencia que codifica para el gen reportero Green Fluorescent Protein (GFP) en el extremo C-terminal. La recombinación se realizó entre el vector pCR8\_PHYAas y vector pGWB2 y pCR8\_PHYA con el vector pGWB5 con el Kit Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix (Thermo Fisher scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, con el producto de la recombinación se transformaron bacterias quimiocompetentes de *E. coli* cepa TOP 10 (Sección 2.3.2). Después, se purificó el ADNp y se transformaron bacterias quimiocompetentes de *A. tumefaciens* cepa GV3101 (Sección 2.3.4), la que fue usada para transformar establemente explantes de zanahoria y tabaco (Sección 2.3.6 y 2.3.7). Los vectores fueron nombrados como

pPhyAas para el silenciamiento de DcPHYA en zanahoria y pPhyA:GFP para la expresión del gen *DcPHYA* en tabaco.

### **2.5.6 Determinación de la expresión relativa de genes**

Para realizar el PCR cuantitativo a partir de ADNc (Sección 2.5.4) (qRT-PCR), se utilizó el Kit Forget-Me-Not EvaGreen qPCR Master Mix 2X. Brevemente, se mezclaron entre 10-40 ng de cDNA junto con 0,2 µl, tanto del partidor Derecho (10 mM), como del Reverso (10 mM), 6,5 µl del Master mix EvaGreen (previamente mezclado con la sonda ROX (3 µL/mL)) y 2,1 µl de agua libre de nucleasas. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador Mx300PTM (Stratagene) siguiendo las condiciones térmicas específicas para la enzima (Anexo Tabla IV). La cuantificación de la expresión de los genes se llevó a cabo con tres replicas biológicas. En el caso de las líneas de zanahoria silenciadas para el gen de *DcPHYA*, se realizaron tres extracciones de RNA independientes a partir de diferentes zonas de una misma raíz de reserva de la planta. Para el caso de las líneas de tabaco expresoras del gen *DcPHYA* de zanahoria, se tomaron tres a cuatro plantas, de cada una de las tres líneas, para formar un pool de plantas, y fueron analizados 3 pool de plantas. Cada replica biológica se analizó por duplicado.

Para el cálculo de la eficiencia de los partidores y la expresión relativa de los genes estudiados se utilizaron las ecuaciones descritas por Pfaffl, *et al.*, (2001). El cálculo de la eficiencia se realizó con una dilución seriada de ADNc, la que fue amplificada mediante qRT-PCR usando partidores diseñados para amplificar un tamaño entre 100 pb a 200 pb del gen a la que se le quería medir la expresión relativa (gen blanco) usando partidores específicos para cada gen (Anexo Tabla III). A continuación, se graficaron los ciclos de amplificación (Ct) de la reacción versus la dilución de ADNc usada. Los puntos se unieron con una línea de tendencia lineal y se calculó la pendiente del gráfico, la que fue usada en la siguiente formula, donde E significa eficiencia del partidor:

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

Por otro lado, para el cálculo de los niveles de expresión relativa se usó la ecuación de Pfaffl, *et al.*, (2001). Donde E significa expresión, Ct son los ciclos de amplificación; gen blanco es el gen evaluado; gen normalizador (o *housekeeping*), es el gen cuya expresión es constante independiente del tratamiento realizado y la condición calibradora, es aquella que se usa de referencia.

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E_{\text{gen blanco}})^{\Delta Ct (Ct_{\text{gen blanco}} - Ct_{\text{calibrador}})}}{(E_{\text{gen normalizador}})^{\Delta Ct (Ct_{\text{gen normalizador}} - Ct_{\text{calibrador}})}}$$

Para analizar la expresión de los genes en las líneas transgénicas de zanahoria silenciadas para el gen *DcPHYA* se usó como gen normalizador Ubiquitina (*UBI*) y como condición calibradora, la expresión en la línea silvestre (*Wt*). En cambio, para los genes de las líneas expresoras de *DcPHYA* de tabaco, para medir la expresión del transgén *DcPHYA*, y la expresión de los genes luego del tratamiento con LRL (Sección 2.4) se usó como gen normalizador *Actina* y el Factor de elongación 1 (*ELF1*), respectivamente. Mientras que la condición calibradora, fue la expresión del VSI y la expresión en LRL en la línea VSI, respectivamente.

## **2.6 Extracción y cuantificación de carotenoides totales**

### **2.6.1 Extracción de carotenoides**

La extracción de carotenoides se realizó de acuerdo con el protocolo de Moreno, *et al.*, (2013). Brevemente, en un mortero previamente esterilizado se molieron con nitrógeno líquido 100 mg de tejido, tanto de raíz de reserva de zanahoria transgénica silenciada para el gen *DcPHYA* y la línea silvestre, como de plántulas completas de tabaco T1 expresoras de *DcPHYA*. Las extracciones de carotenoides se llevaron a cabo con tres replicas biológicas. En el caso de las

líneas silenciadas de zanahoria para el gen de *DcPHYA*, se realizaron tres extracciones de carotenoides independientes a partir de diferentes zonas de una misma raíz de reserva de la planta. Para las líneas de tabaco expresoras del gen *DcPHYA* de zanahoria, se utilizaron 3 pools de plántulas T1 formadas cada uno por tres a cuatro plantas. Luego, se agregaron 4 mL de una solución de hexano/acetona/etanol (2:1:1 v/v) y se agitó en vortex durante 2 min, manteniendo la muestra en hielo y oscuridad. Después, los tubos fueron incubados en hielo durante dos min. y se centrifugaron a 10.000 g a 4°C durante 10 min. El precipitado tenía un color blanco, que indicaba que todos los pigmentos habían sido extraídos. Luego, se recuperó toda la fase superior (donde estaban disueltos los carotenoides), fue congelada con nitrógeno líquido y secada en un liofilizador durante 4 horas aproximadamente.

## 2.6.2 Cuantificación de carotenoides

La cuantificación de los carotenoides totales se realizó mediante espectrofotómetro (JENWAY 6300) usando cubeta de cuarzo. Brevemente, los carotenoides previamente extraídos y secados (Sección 2.6.1) se re-suspendieron en 1 mL de acetona y se midió la absorbancia a 474 nm (absorción de carotenoides), 645/662 nm (absorción de las clorofilas *a* y *b*) y 520/750 nm (para determinar la turbidez de la muestra). Los datos de absorbancia se debían encontrar entre el rango lineal de 0,3 a 0,85, si no, se tenía que probar otra dilución de la muestra. La concentración de carotenoides totales se determinó utilizando las ecuaciones de Lichtenthaler y Buschmann (2001), donde *Ca*, significa clorofila *a*, *Cb*, clorofila *B* y *Ct*, carotenoides totales,  $A_{662}$ , absorbancia a 662,  $A_{645}$ , absorbancia a 645 nm y  $A_{470}$ , absorbancia a 474 nm. La concentración de cada uno de los pigmentos fue expresado en mg/g de peso seco, utilizando un factor de conversión entre peso fresco y peso seco que para la raíz de zanahoria es de 0,098 y para hoja de tabaco de 0.11

$$Ca(\mu\text{g/mL}) = 11,24 \times A_{662} - 2,04 \times A_{645}$$

Ecuación 1



$$C_b(\mu\text{g/mL}) = 20,13 \times A_{645} - 4,19 \times A_{662}$$

Ecuación 2

$$C_t(\mu\text{g/mL}) = (1000 \times A_{470} - 1,9 \times C_a - 63,14 \times C_b) / 214$$

Ecuación 3

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Análisis bioinformático y estudio funcional de DcPHYA en LRL en *Nicotiana tabacum* (tabaco)

Para estudiar bioinformaticamente y funcionalmente el gen *DcPHYA* en tabaco, se amplificó la secuencia del marco de lectura abierto (CDS) sin codón de término de 3387 pb, del gen *DcPHYA* a partir de ADNc (Sección 2.5.3 y 2.5.4) y se realizó un análisis bioinformático comparativo entre la secuencia aminoacídica de AtPHYA (Gene ID: 108202696) DcPHYA (Gene ID: 108202696).

Luego, considerando que PHYA es activado en LRL y en esa condición promueve la fotomorfogénesis, expresamos el gen *DcPHYA* de manera heteróloga en la planta modelo de tabaco para determinar si es funcional *in vivo* en LRL.

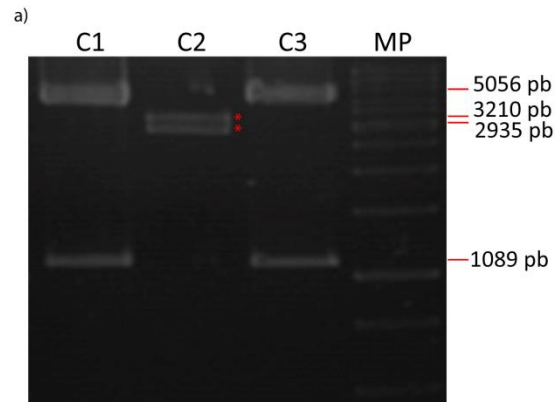
##### 3.1.1 Análisis *in silico* del gen fitocromo A de *Daucus carota*

La secuencia codificante del marco de lectura abierto (CDS) del gen *DcPHYA* sin codón de término de 3387 pb, (Sección 2.5.3 y 2.5.4) se clonó en sentido en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO para producir el vector pCR8-PHYA (Sección 2.5.5). Se digirieron los plásmidos extraídos de 3 colonias, para comprobar la direccionalidad del inserto (Sección 2.5.5) (Figura 3). El plásmido de la colonia 2 que se encontró en la dirección sentido se envió a secuenciar y se comprobó que no tuviera mutaciones. Se realizó una recombinación con el vector pGWB5 (Sección 2.5.5) y se procedió a trasformaron *A. tumefaciens* con el ADN plasmidial de esa colonia (Figura 4).

Luego se comparó la secuencia con la secuencia codificante del gen *DcPHYA* de zanahoria, que fue recuperada desde la base de datos de Phytozome V2 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), siendo su número de acceso el DCAR\_001880. Luego, se tradujo la secuencia de nucleótidos a aminoácidos

(<https://web.expasy.org/translate/>). Basado en la secuencia de aminoácidos se determinaron los dominios funcionales de la proteína en la base de datos Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Se realizó un alineamiento múltiple realizado en la plataforma Clustaw Omega entre las secuencias aminoacídicas de AtPHYA, DcPHYA y la secuencia clonada de DcPHYA (este trabajo). Las secuencias AtPHYA y DcPHYA comparten un 73,19% de identidad aminoacídica, al igual que las secuencias de AtPHYA y DcPHYA clonado, mientras que, la secuencia DcPHYA clonado con un el DcPHYA de la base de datos, comparten un 99,91%. Por lo tanto, la secuencia de DcPHYA clonada podría codificar para un PHYA. Sumado a lo anterior, en la Figura 5, destacan en colores los dominios funcionales PAS, GAF, PHY, PAS-A y PAS-B y HKRD (Sección 1.1). En blanco se destacan aminoácidos claves en cada uno de los dominios funcionales. Para los dominios PAS, PAS-A y PAS-B los aminoácidos destacados son claves para generar la estructura secundaria de acuerdo con lo reportado por Taylor y Zhulin, (1999) y Oka, *et al.*, (2008). Para el dominio GAF, PHY y HKRD, se resaltan los aminoácidos conservados de acuerdo a Karniol, *et al.*, (2005), Yeh y Lagaruas, (1998), respectivamente. En la parte N-terminal se destacan en color cerezo unas serinas, a los que se le ha atribuido la labilidad de PHYA a LR (Kneissl, *et al.*, 2008). En el dominio GAF aparece marcada de color rojo una cisteína. Este aminoácido es conservado y es en el cual se une el cromóforo. Además, solo en este dominio se encontró un polimorfismo de nucleótido simple (SNP), fue en la posición nucleotídica 733 que cambia una Guanina (G) en la secuencia de DcPHYA de la base de datos, por una Adenina (A) en el *DcPHYA* clonado. Esto cambia el codón de lectura de la secuencia, lo que genera en un cambio de aminoácido en la posición D245N (Figura 5). El SNP cambia un aminoácido cargado, que podría ser ácido aspártico (secuencia DcPHYA base de datos de zanahoria) o ácido glutámico (secuencia AtPHYA de Arabidopsis), a uno sin carga, como lo es la asparagina (secuencia DcPHYA clonada), aunque de estructura similar. Sin embargo, esta mutación no debería afectar la función de

la proteína ya que no es uno de los aminoácidos conservados del dominio GAF reportados por Karniol, *et al.*, (2005).



**Figura 3. Ensayo de digestión del plásmido pCR8-PhyA.** Los plásmidos extraídos de 3 colonias de *E. coli* (C1, C2 y C3) fueron digeridos con la enzima *VspI*. Los asteriscos indican una banda de 3210 pb, 2935 pb, que muestran el patrón de digestión cuando el inserto está en sentido. Este fue el usado para la recombinación con el vector pGBW5. Las bandas de 5056 pb y 1089 pb muestran un patrón de digestión en antisentido.



**Figura 4. PCR de colonia de *A. tumefaciens* transformadas con el vector pPhyA:GFP.** CC: control de crecimiento bacteriano, C+: vector pPhyA:GFP, C-; agua libre de nucleasas, C1-3: colonias analizadas, MP. Marcador de peso molecular de 1 Kb.



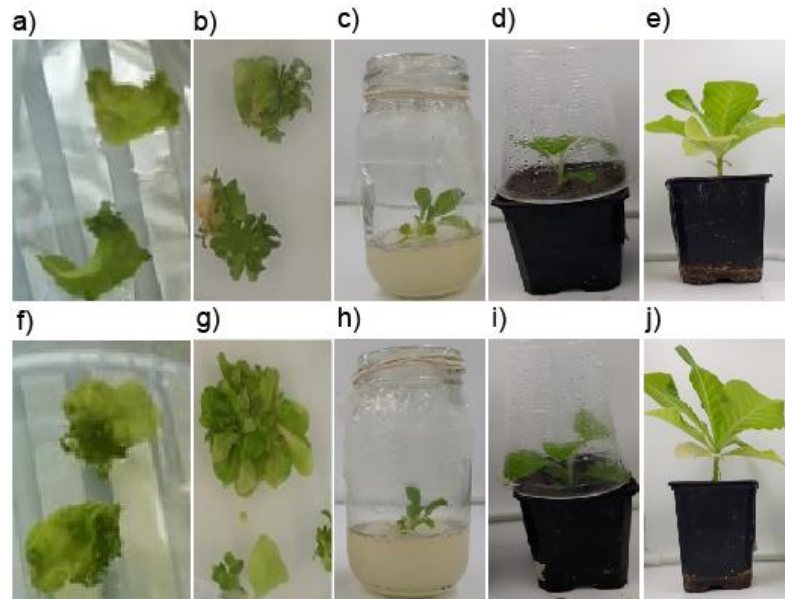
**Figura 5. Análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína DcPHYA.** En la figura se muestra el alineamiento múltiple realizado en Clustal O, entre la secuencia aminoacídica de AtPHYA (Gene ID: 837483), DcPHYA (Gene ID: 108202696) extraído de la base de datos, y el DcPHYA clonado. Los colores indican los diferentes dominios de las proteínas: en amarillo dominio PAS, en verde dominio GAF, en celeste dominio PHY, en morado dominio PAS-A, en azul Dominio PAS-B y en rojo dominio relacionado Histidina Quinasa, en color cereza son mostradas serinas del N-terminal de la proteína. Las letras blancas indican los aminoácidos conservados en cada uno de los dominios, mientras que la letra roja en el dominio GAF indica una cisteína. Se marcan con letras negras, arriba del alineamiento la estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -plegada de los dominios PAS, PAS-A y PAS-B. En el recuadro rojo se muestra un SNP en el DcPHYA clonado con respecto al DcPHYA de base datos, que produce un cambio de ácido aspártico (D) por asparagina (N).

### **3.1.2 Generación de un vector binario para la expresión de *DcPHYA* en plantas de tabaco**

Mediante la tecnología Gateway, se recombinó el vector pCR8PHYA con el vector de expresión pGWB5, para producir el vector pPhyA:GFP con el cual se transformó *A. tumefaciens* cepa GV3101 (Sección 2.3.4). En la Figura 5 se muestra un PCR donde se amplifica la secuencia clonada del gen *DcPHYA* (Sección 2.5.4) de tres colonias de *A. tumefaciens*, transformadas con el vector pPhyA:GFP mostrando el tamaño esperado de 3387 pb, que es el tamaño de la secuencia CDS sin codón de término del gen completo.

### **3.1.3 Transformación y obtención de plantas de tabaco expresoras del gen *DcPHYA***

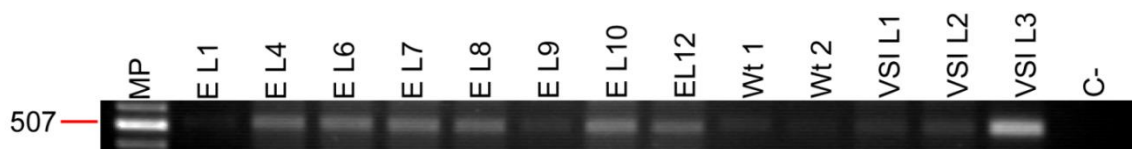
Se transformaron de manera estable explantes de hojas estériles de *N.tabacum* var Xanthi NN (tabaco) mediante *A. tumefaciens* previamente transformada con la construcción pPhyA:GFP (Figura 6, sección 2.3.7). Los explantes infectados se cultivaron *in vitro* hasta la obtención de líneas transformantes T0 mediante organogénesis somática directa que posteriormente fueron trasplantadas a tierra y aclimatadas a las condiciones de invernadero (Sección 2.3.7, Figura 6). Las líneas transformantes se auto polinizaron y se cosecharon las semillas T1. Todo este proceso se llevó a cabo en 9 meses aproximadamente. Se obtuvieron 12 líneas transformantes T1 con el vector pPhyA:GFP y 3 con pVSI:GFP, las que fueron genotipificadas (Sección 2.5.4).



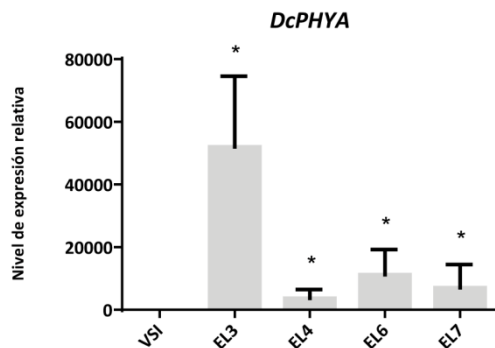
**Figura 6. Proceso de cultivo *in vitro* y aclimatación en suelo de plantas de tabaco transformadas establemente con el vector pPhyA:GFP.** El proceso y obtención de las líneas T0 se completó en 5 meses aproximadamente. a-e: líneas transformantes de pPhyA:GFP . f-j: líneas transformantes transformadas con el vector pVSI:GFP.

Durante la genotipificación las plantas de tabaco silvestre (Wt) amplificaron el gen de resistencia a kanamicina (HptII) (datos no mostrados), lo que fue totalmente inesperado e indicaría un origen transgénico de las plantas usadas para la transformación. Se comprobó que las líneas transformantes y las líneas Wt amplifican un producto de PCR de 507 pb entre el *ccdB* y *eGFP* del vector, lo que estaría indicando que las plantas fueron transformadas en un fondo de plantas vector sin inserto (VSI) (Figura 7). Considerando que el VSI no debería producir un efecto en la planta y que demora casi 9 meses en la obtención de plantas transgénicas de tabaco en T1, se tomó la decisión de considerar estas plantas como fondo VSI en vez de Wt y seguir usándolas para responder este objetivo. Para la genotipificación de las líneas transformantes, se amplificó un fragmento de 134 pb de *DcPHYA* en las líneas que tenían suficiente tejido para realizar una extracción de ADN. La línea EL1, EL4, EL6, EL7, EL8, EL9, EL10 y EL12 fueron positivas a este PCR y, por lo tanto, transgénicas (datos no mostrados). Posteriormente, fueron seleccionadas las líneas transgénicas EL3, EL4, EL6,

EL7, ya que tuvieron suficiente tejido para realizar primero una extracción de RNA con tres réplicas de distintas plántulas y luego poder realizar un análisis de qPCR (Sección 2.5.6) para realizar una extracción de ARN (Sección 2.5.2), y determinar la expresión relativa del transgen *DcPHYA* (Sección 2.5.6). De las 4 líneas analizadas, se seleccionaron las líneas EL4, EL6 y EL7 porque presentaron una expresión relativa similar entre ellas (Figura 8).



**Figura 7. Amplificación del ccDB a eGFP del VSI en las plantas transgénicas de tabaco para pDcPHYA:GFP.** El amplicón corresponde a una banda de 507 pb, que va desde el ccdB hasta eGFP. EL1, EL4, EL6, EL7, EL8, EL 9, EL10, EL12: corresponden a las líneas transformadas con el vector pDcPHYA:GFP para la expresión del gen *DcPHYA* de zanahoria. Wt1-2: plantas Wild type, VSI: plantas transformadas con el vector pPhyA:GFP, sin inserto. c-: agua libre de nucleasas.



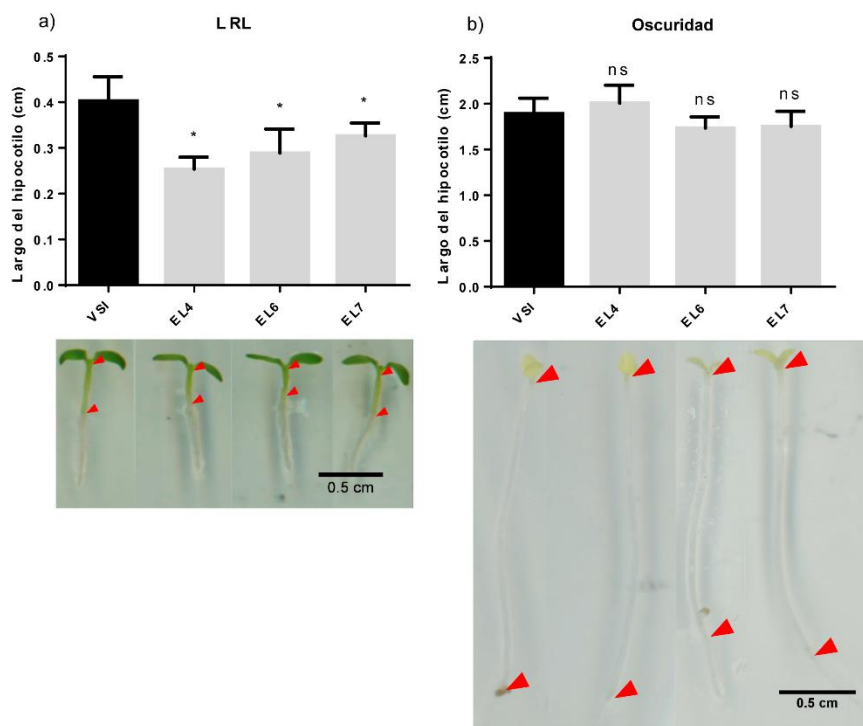
**Figura 8. Nivel de expresión relativa de *DcPHYA* en líneas T1 de tabaco transformadas con pDcPHYA:GFP.** Se usaron tres plantas en generación T1 para cada una de las líneas analizadas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas basadas en una prueba t-student entre la línea transgénica y la línea VSI,  $p < 0,05$ . Los experimentos fueron hechos en triplicado biológico. La expresión fue normalizada de acuerdo con el gen *actina*.

### 3.1.4 Funcionalidad de *DcPHYA* en líneas de tabaco

PHYA es activo, estable y presenta localización nuclear en LRL (Oka *et al.*, 2012), donde puede regular la expresión de genes de manera indirecta, los que



producen cambios a nivel fenotípico (Chen *et al.*, 2014), siendo la inhibición de la elongación del hipocótilo una de las respuestas fenotípicas más evidentes (Halliday *et al.*, 1997). Considerando lo anteriormente expuesto, se germinaron y dejaron crecer durante 7 días en LRL, semillas de la generación T1 de las líneas EL4, EL6 y EL7. Fue usado un tratamiento en oscuridad con idénticas a la condiciones de crecimiento a las líneas que crecieron en LRL, como control negativo (donde PHYA está inactivo en el citoplasma de la célula (Oka *et al.*, 2012) (Sección 2.4). Al finalizar el tratamiento se midió el largo del hipocótilo. En la condición de LRL, las tres líneas expresoras de *DcPHYA* evaluadas (EL4, EL6, EL7), tuvieron un menor largo del hipocótilo al compararlas con la línea VSI, lo que indica que las plantas fueron más sensibles a LRL (Figura 9 a). Mientras que, en la condición de oscuridad (control negativo) no existen diferencias estadísticamente significativas entre el VSI y las líneas expresoras de *DcPHYA* (Figura 9 b). Este resultado sugiere que *DcPHYA* es funcional en LRL, ya que produce un aumento de la sensibilidad de las plantas a esta condición de luz, lo que a nivel fenotípico se traduce en una disminución del largo del hipocótilo.



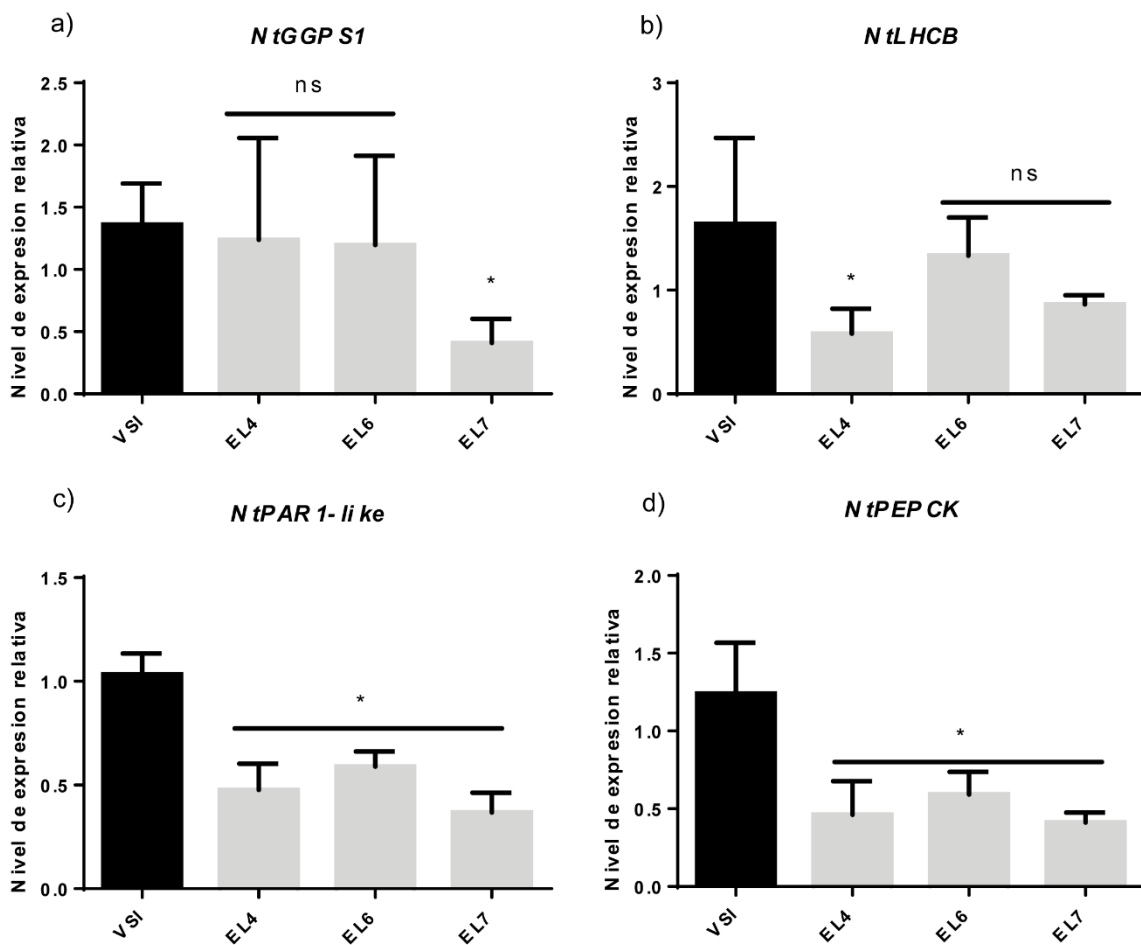
**Figura 9. Largo del hipocótilo en líneas de tabaco expresoras de *DcPHYA* sometidas a LRL.** a) Plántulas transgénicas de 7 días de crecimiento en LRL, b) Plántulas transgénicas de 7 días de crecimiento en oscuridad. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre la línea transgénica y la línea VSI derivados de un análisis estadístico T-student,  $p < 0,05$ . En cada experimento se utilizaron 10 plántulas de cada línea en generación T1. Bajo los gráficos se muestran imágenes representativas de las líneas analizadas. Las flechas rojas indican el comienzo y el final del hipocótilo.

### 3.1.5 Perfil de expresión de genes regulados por *PHYA* en líneas de tabaco que expresan *DcPHYA*, crecidas en LRL

En LRL, *PHYA* se encuentra en el núcleo de la célula donde regula la expresión de genes de manera positiva o negativa, a través de su interacción con factores de transcripción (Tepperman, *et al.*, 2006; Chen, *et al.*, 2014). Al respecto, Chen, *et al.*, (2014) determinó que *PHYA* en LRL regula la expresión de los genes *GGPS*, *LCHB* de manera positiva y los genes *PEPCK1* y *PAR1* de *Arabidopsis* de manera negativa. Sumado a lo anterior, se ha reportado que *PHYA* regula de manera negativa en sombra a *PAR1*, un gen que codifica para un cofactor transcripcional que participa en la señalización por luz (Roig-Villanova, *et al.*, 2006). Es por ello que decidimos evaluar la expresión de genes regulados por

PHYA en LRL en las líneas expresoras del gen *DcPHYA* de zanahoria en tabaco sometidas al tratamiento con LRL (Sección 2.4).

Primero, se buscaron los genes ortólogos de *GGPS1*, *LCHB*, *PEPCK* y *PAR1* en tabaco (Figura 1, 2, 3, 4, Anexo). Luego, se determinó la expresión relativa de los genes *NtGGPS1*, *NtLCHB*, *NtPEPCK-like* y *NtPAR1-like* en las líneas de tabaco expresoras del gen *DcPHYA* de zanahoria sometidas al tratamiento con LRL. El gen *NtGGPS1*, en la línea EL4 y EL6, no hay diferencias en la expresión en comparación con la línea VSI, en cambio, en la EL7 baja la expresión relativa del gen en comparación a la línea VSI (Figura 10 a). Para el gen *NtLCHB* la EL6 y EL7 no tienen diferencias en su expresión relativa con respecto a la línea VSI, mientras que para la EL4 su expresión relativa baja en comparación a la línea VSI (Figura 10 b). Por otro lado, el gen *NtPEPCK-like*, tiene una menor expresión relativa en todas las líneas expresoras evaluadas sometidas al tratamiento con LRL en comparación a la línea VSI (Figura 10 c). Para el caso del gen *NtPAR1-like* también se observa una disminución de la expresión relativa en todas las líneas expresoras de *DcPHYA* en comparación al VSI (Figura 10 d). Por lo tanto, de este ensayo podemos concluir que *DcPHYA* no regula la expresión de *NtGGPS1*, ni de *NtLCHB*. Por el contrario, *DcPHYA* puede regular de forma negativa la expresión de *NtPEPCK-like* y *NtPAR1-like* en LRL, tal como fue reportado previamente en *Arabidopsis* por Chen, *et al.*, (2014).

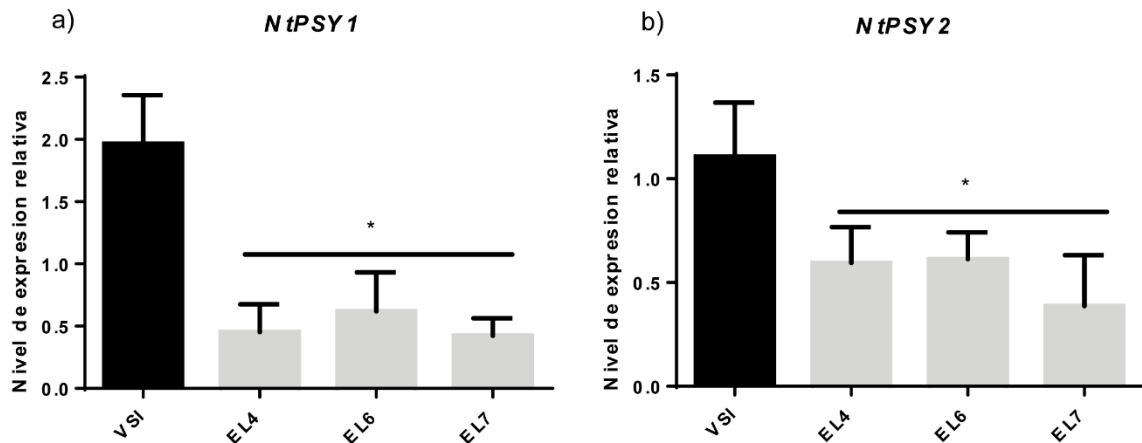


**Figura 10. Expresión relativa de genes regulados por *PHYA* en plantas de tabaco expresoras de *DcPHYA* sometidas a tratamiento de LRL** a) expresión relativa de *NtGGPS1*, b) *NtLCHB*, c) *NtPEPCK* y d) *NtPAR1-like*. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas basadas en una prueba t-student entre la línea transgénica y la línea VSI,  $p < 0,05$ . La expresión se realizó en triplicado en pool de 3 - 4 plantas cada uno. La expresión fue normalizada respecto a la expresión del gen *NtFE1a*.

### 3.1.6 Perfil de expresión de genes carotenogénicos en líneas de tabaco que expresan el gen *DcPHYA*, crecidas en LRL

Líneas mutantes de *phyA* de *Arabidopsis* tratadas con LRL tienen menor abundancia de transcrito de *PSY* en comparación a la línea Col-0 (von Lintig, *et al.*, 1997). Además, de acuerdo con análisis cruzados de RNA-seq y ChIP-seq en líneas de *Arabidopsis* mutantes para *phyA*, *col-0* y sobreexpresoras de *AtPHYA* sometidas a tratamientos con LRL, se determinó que *PSY* es un gen blanco de *PHYA*, es decir, *PHYA* regula la expresión de *PSY* de forma positiva y puede

unirse a su promotor a través de la interacción con un factor de transcripción (Chen, *et al.*, 2014). Por lo tanto, en LRL, AtPHYA de Arabidopsis regula positivamente a *AtPSY* a nivel transcripcional. Basados en estos antecedentes, la primera aproximación para dilucidar el rol de *DcPHYA* en la síntesis de carotenoides fue determinar la expresión relativa de genes carotenogénicos (*NtPSY1* y *NtPSY2*) en las líneas de tabaco expresoras del gen *DcPHYA* de zanahoria tratadas con LRL. La expresión relativa de *NtPSY1*, como de *NtPSY2*, bajan en comparación a al a la expresión en el VSI (Figura 11). Por lo tanto, se puede sugerir que *DcPHYA* regula de manera negativa la expresión relativa del gen *NtPSY1* y *NtPSY2* en 7 días de tratamiento con LRL continua.



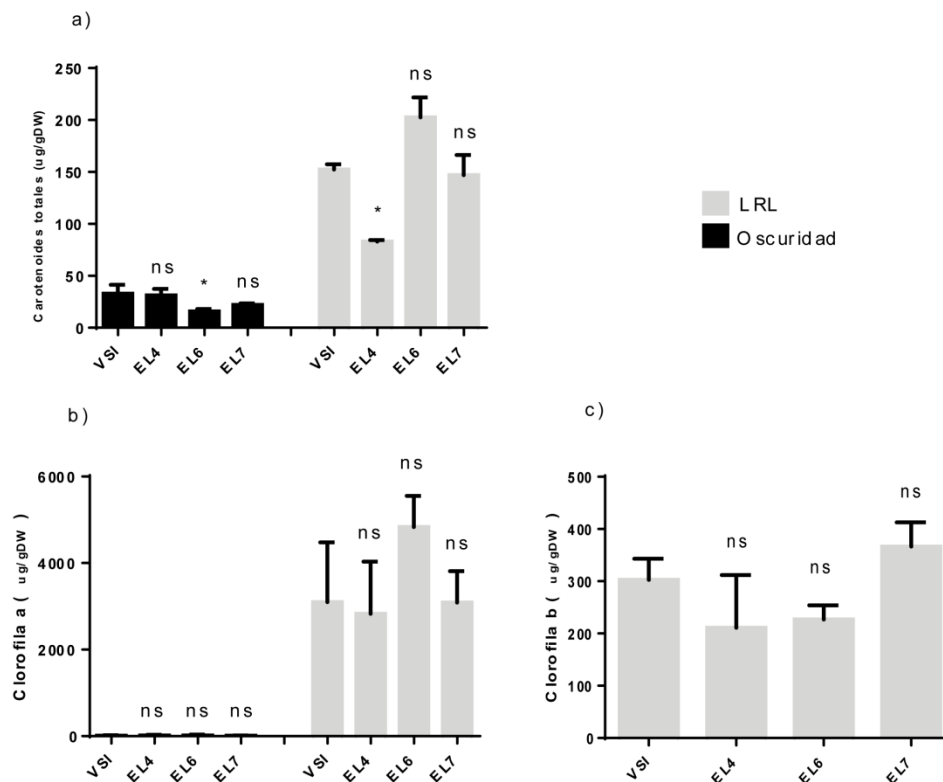
**Figura 11. Expresión relativa de genes carotenogénicos en líneas de tabaco expresoras de *DcPHYA* sometidas a tratamiento de LRL** a) expresión relativa de *NtPSY1* y b) *NtPSY2*. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas basadas en una prueba t-student entre la línea transgénica y la línea VSI,  $p < 0,05$ . Los experimentos fueron hechos en triplicado en pool de 3 - 4 plantas. La expresión fue normalizada de acuerdo con la expresión del gen *NtFE1a*.

### 3.1.7 Cuantificación de carotenoides y clorofila a y b en líneas de tabaco expresoras del gen *DcPHYA*, crecidas en LRL

Los fitocromos regulan la fotomorfogenesis, proceso que incluye la síntesis de pigmentos como carotenoides y clorofila, en tejido fotosintético (Quian-Ulloa, Stange, 2021). Particularmente, líneas mutantes para el gen *PHYA* de Arabidopsis acumulan menor contenido de carotenoides cuando son mantenidas en un tratamiento de sombra (alta proporción de LRL/LR) durante 7 días, lo que

no sucede en la línea Wt. Por lo tanto, PHYA puede regular el contenido de carotenoides en sombra (Sng, *et al.*, 2020). Por otro lado, líneas mutantes de *AtPHYA* de *Arabidopsis* que fueron tratadas con LRL por 24 h. no cambia el contenido de carotenoides al compararlas con la línea Wt (von Lintig, *et al.*, 1997). Por lo tanto, PHYA no regula el contenido de carotenoides en tratamiento de 24 horas de LRL. Basándonos en estos antecedentes, determinamos el contenido de carotenoides totales en las líneas de tabaco expresoras de *DcPHYA*, tratadas 7 días con LRL. En la condición de LRL (Figura 12 a), las líneas acumularon cerca de 200 ug/gpDW de carotenoides. La línea EL4 acumuló menor contenido de carotenoides en comparación a la línea VSI mientras que las líneas EL6 y EL7 no tuvieron diferencias estadísticamente significativas con la línea VSI. Por otro lado, en la condición de oscuridad se acumularon cerca de 40 ug/g peso seco de tejido, y la línea EL6, presenta menor contenido de carotenoides con respecto al VSI (Figura 12 a). Por lo tanto, *DcPHYA* no regula el contenido de carotenoides luego de 7 días de tratamiento con LRL.

Sumado a la determinación de los carotenoides totales, determinamos el contenido de clorofila a y b. En la condición de LRL (Figura 12), se acumuló cerca de 4000 ug/g de peso seco de clorofila a y no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las líneas expresoras de *DcPHYA* y la línea VSI. Por otro lado, en la condición de oscuridad, se acumularon cerca de 20 ug/g de peso seco y tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas entre las líneas expresoras de *DcPHYA* y la línea VSI. Respecto a clorofila b en la condición de LRL, se acumularon cerca de 300 ug/gps y no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las líneas expresoras de *DcPHYA* y la línea VSI (Figura 12 c). En la condición de oscuridad no se acumuló clorofila b, por eso no se incluye. En conclusión, *DcPHYA* no regularía el contenido de clorofilas en LRL luego de 7 días de tratamiento con LRL.



**Figura 12. Contenido de carotenoides totales y clorofila a y b en líneas de tabaco expresoras de *DcPHYA* sometidas a tratamiento de LRL y oscuridad** a) carotenoides totales, b) contenido de clorofila a, c) contenido de clorofila b. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas basadas en una prueba t-student entre la línea transgénica y la línea VSI,  $p < 0,05$ . Los experimentos fueron realizados en triplicado en pool de 3 - 4 plantas cada uno.

Tabla I. Resumen que incluye los principales resultados del objetivo 1 y las conclusiones derivadas de estos resultados

Principales resultados	Conclusión
Las secuencias AtPHYA y DcPHYA clonado comparten un 73,19% de identidad aminoacídica	La secuencia <i>DcPHYA</i> clonada podría codificar para un PHYA funcional
En la condición de LRL, las líneas de tabaco expresoras de <i>DcPHYA</i> , tuvieron un menor largo del hipocótilo al compararlas con la línea VSI	Se sugiere que <i>DcPHYA</i> es funcional en LRL
En dos de las líneas de tabaco expresoras del gen <i>DcPHYA</i> no cambia la expresión relativa del gen <i>NtGGPS1</i> ni del gen <i>NtLCHB</i> en comparación al VSI	Se sugiere que <i>DcPHYA</i> no regula la expresión de <i>NtGGPS1</i> , ni de <i>NtLCHB</i>
Las tres líneas de tabaco expresoras del gen <i>DcPHYA</i> analizadas tienen menor expresión relativa de los genes <i>NtPEPCK-like</i> y <i>NtPAR1-like</i> en comparación al VSI	Se sugiere que <i>DcPHYA</i> regula de forma negativa la

	expresión de <i>NtPEPCK-like</i> y <i>NtPAR1-like</i> en LRL
Las tres líneas de tabaco expresoras del gen <i>DcPHYA</i> analizadas tienen menor expresión relativa de los genes <i>NtPSY1</i> y <i>NtPSY2</i> en comparación al VSI	Se sugiere que <i>DcPHYA</i> regula de manera negativa la expresión de los genes <i>NtPSY1</i> y <i>NtPSY2</i> en 7 días de tratamiento con LRL
En dos de las líneas de tabaco expresoras del gen <i>DcPHYA</i> no tienen diferencias estadísticamente significativas en el contenido de carotenoides totales en comparación al VSI	Se sugiere que <i>DcPHYA</i> no regula el contenido de carotenoides luego de 7 días de tratamiento con LRL
Las tres líneas de tabaco expresoras del gen <i>DcPHYA</i> no tienen diferencias estadísticamente significativas en el contenido de clorofila a y b en comparación al VSI.	Se sugiere que <i>DcPHYA</i> no regula el contenido de clorofila a y b en LRL luego de 7 días de tratamiento con LRL

### 3.2 Caracterización del rol de *DcPHYA* en la síntesis de carotenoides mediante silenciamiento génico en *D. carota*.

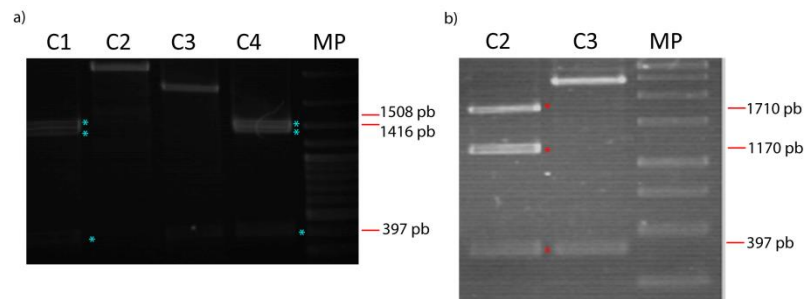
Para determinar si el gen *DcPHYA* es funcional y si posee un rol en síntesis de carotenoides en zanahoria, se silenció en plantas de zanahoria. En las líneas producidas se evaluó la expresión relativa de genes carotenogénicos y el contenido de carotenoides totales en la raíz de reserva de zanahoria crecida bajo tierra.

#### 3.2.1 Generación de un vector binario para el silenciamiento de *DcPHYA*.

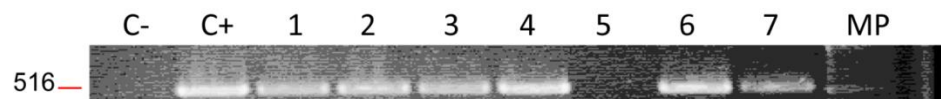
Para estudiar funcionalmente el gen *DcPHYA* en la raíz de zanahoria crecida bajo el suelo, se amplificó un fragmento de 516 pb una secuencia conservada dentro del segundo exón del gen *DcPHYA* a partir de ADN genómico (Sección 2.5.1). Luego, se clonó en antisentido el producto de PCR en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO para producir el vector pCR8-PHYAas (Sección 2.5.5). Para comprobar la direccionalidad del inserto, se digirieron los plásmidos extraídos de



diferentes colonias evidenciando que la colonia C2 presentaba la dirección antisentido (Figura 13), por lo que esta colonia se envió a secuenciar comprobando la ausencia de mutaciones. Luego, se generó el vector pPhyAas (Sección 2.5.5), con el cual se transformó *A. tumefaciens* cepa GV3101 (Sección 2.3.4). En la Figura 14, se muestra un PCR donde se amplificó satisfactoriamente el fragmento de 516 pb de *DcPHYA* clonado (Sección 2.5.4) de siete colonias de *A. tumefaciens*, transformadas con el vector pPhyAas.



**Figura 13. Digestión del plásmido pCR8-PhyAas.** Se aislaron plásmidos de 4 colonias de *E. coli* (C1, C2, C3 y 4) y fueron digeridos con las enzimas *BsaI* y *BstYI*. a) gel de agarosa los plásmidos digeridos que fueron previamente extraídos de 4 colonias en un gel de agarosa. Los asteriscos celestes indican bandas de 1508 pb, 1416 pb y 397, pb, que muestran un patrón en sentido del inserto dentro del plásmido. Los plásmidos de las colonias C2 y C3 no muestran un patrón de digestión esperado, por lo que se digirieron más tiempo. b) gel de agarosa de la digestión de los plásmidos de las colonias C2 y C3. Los asteriscos rojos en el plásmido de la C2 indican bandas 1754 pb, 1170 pb y 397 pb, que muestran un patrón en antisentido, fue el usado para la recombinación con el vector pGBW2. El plásmido C3 dio un patrón de digestión inesperado.



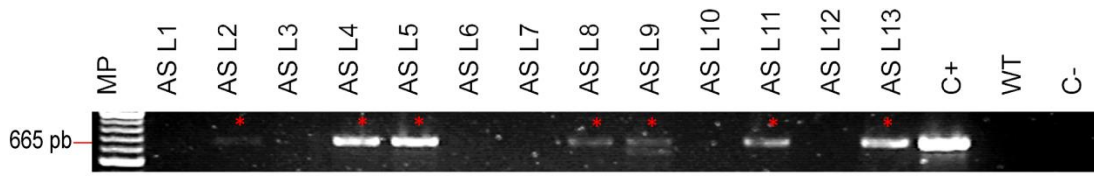
**Figura 14. PCR de colonia de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con el vector pDcPhyAas** C-; agua libre de nucleasas, C+: vector pDcPhyaAs., C1-7: colonias analizadas, MP. Marcador de peso molecular de 100 pb.

### 3.2.2 Transformación y obtención de zanahoria (*Daucus carota*) silenciadas para el gen *DcPHYA*

Se transformaron de manera estable explantes de epicotilos de plántulas de zanahoria estériles que fueron infectados por *A. tumefaciens* previamente transformada con la construcción pPhyAas y con pVSI. Además, se regeneraron

líneas Wt sin transformar (Sección 2.3.6). Los explantes infectados se cultivaron *in vitro* hasta la obtención de líneas transformantes mediante embriogénesis somática. Las líneas transformantes fueron trasplantadas a tierra y aclimatadas a las condiciones de invernadero (Sección 2.3.6). Este proceso se llevó a cabo en 9 meses aproximadamente. Se obtuvieron 13 líneas transformantes T0 con el vector pDcPhyAas y 1 con línea Wt, las que fueron genotipificadas. Las líneas pVSI no sobrevivieron, por lo que fue usada una línea Wt como control negativo de la función del gen.

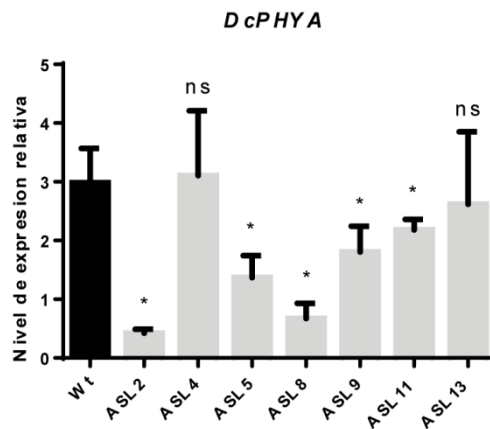
Para genotipificar las líneas transformantes se realizó un PCR del gen *HptII* cuando éstas tuvieron entre 4 a 5 meses de edad, aproximadamente (Sección 2.5.4). Las líneas ASL2, ASL4, ASL5, ASL8, ASL9, ASL11, ASL13 fueron positivas para el PCR y por lo tanto, transgénicas (Figura 15). Al analizar el fenotipo de las líneas obtenidas, se observa que las líneas ASL4, ASL5, ASL8, ASL9, ASL11, ASL13, presentan una coloración más tenue en su raíz de reserva en comparación a la línea Wt (Figura 16), lo que nos podría sugerir que presentan un menor contenido de carotenoides totales. A las líneas transgénicas seleccionadas se le determinó la expresión relativa de *DcPHYA* en su raíz crecida bajo el suelo, para cuantificar el grado de silenciamiento del gen. Las líneas presentaron entre un 27% hasta un 86% de silenciamiento del gen *DcPHYA* en su raíz de reserva crecida bajo el suelo, sin embargo, la L4 y L13 no mostraron diferencias significativas en la expresión relativa del gen *DcPHYA* en comparación a la línea Wt (Figura 17). Por tanto, para los siguientes análisis se seleccionaron las líneas ASL2, ASL5, ASL9 y ASL11, que tienen un 86%, 54%, 40% y 27% de silenciamiento de *DcPHYA*, respectivamente. La línea ASL8 se descartó por presentar un fenotipo demasiado drástico, con una raíz muy delgada y blanca en comparación a las demás líneas seleccionadas.



**Figura 15. Amplificación del gen *NptII* en líneas transformantes de zanahoria.** Los asteriscos rojos indican la amplificación del fragmento esperado de 665 pb. Control +: ADN plasmidial del vector pDcPhyAas Control -: agua libre de nucleasas.



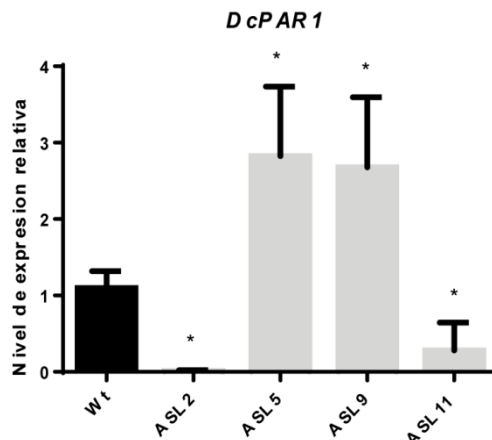
**Figura 16. Líneas de zanahoria transgénicas transformadas con el vector pDcPHYAas para el silenciamiento del gen *DcPHYA*.** Las líneas ASL2, ASL4, ASL5, ASL8, ASL9, ASL11, ASL13 resultaron positivas para el PCR de *HptII*. Las líneas tienen entre 4-5 meses de edad. El tejido fue recolectado de ASL2, ASL5, ASL9 y ASL11 para los posteriores análisis. Las imágenes de las raíces son solo referenciales, no están a escala.



**Figura 17. Expresión relativa del gen *DcPHYA* en raíces de reserva de líneas transformadas con el vector pDcPHYA.A.S.** Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas basadas en una prueba t-student entre la línea transgénica y la línea Wt,  $p < 0,05$ . Los experimentos fueron hechos en triplicado. La expresión fue normalizada de acuerdo con el gen Ubiquitina.

### 3.2.3 Perfil de expresión relativa del gen *DcPAR1* en líneas de zanahoria silenciadas para el gen *DcPHYA*

Tal como se indicó en la Sección 3.1.5, *DcPHYA* regula de forma negativa la expresión de *NtPAR1*. Además, este gen es funcional en la raíz de zanahoria, regulando la síntesis de carotenoides (Arias *et al.*, 2022). Por lo anteriormente expuesto, se determinó la expresión relativa de *DcPAR1* en la raíz de reserva crecida bajo el suelo de las líneas silenciadas para el gen *DcPHYA* de zanahoria. Las líneas ASL5 y ASL9 tienen una mayor expresión relativa de *DcPAR1* en comparación con la línea Wt, mientras que las líneas ASL2 y ASL11, una menor expresión relativa con respecto a la planta Wt (Figura 18). Dado estos resultados tan contradictorios, no podemos asegurar que *DcPHYA* esté regulando la expresión de *DcPAR1*.

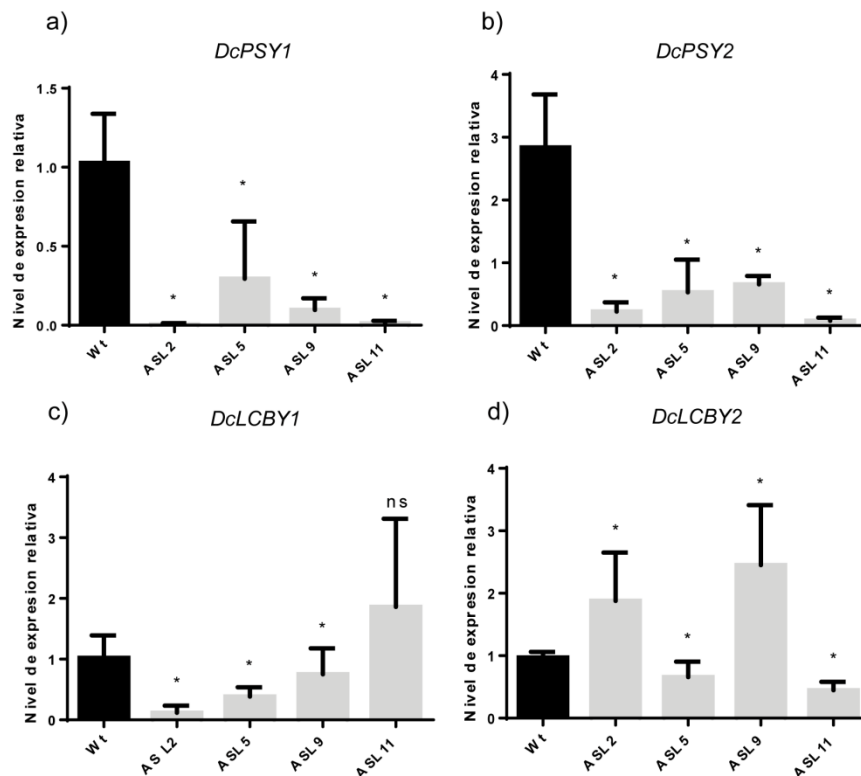


**Figura 18. Expresión relativa de *DcPAR1* en raíces de reserva de líneas de zanahoria silenciadas para el gen *DcPHYA*.** Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas basadas en una prueba t-student entre la línea transgénica y la línea Wt,  $p < 0,05$ . Los experimentos fueron hechos en triplicado. La expresión fue normalizada de acuerdo con el gen *Ubiquitina*.

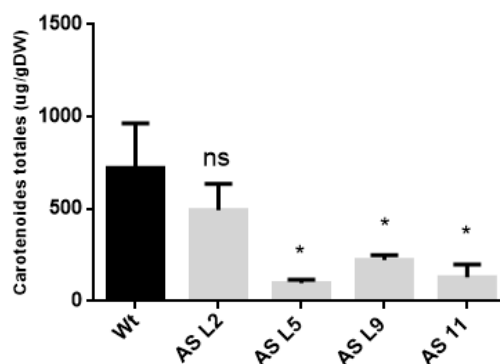
### **3.2.4 Perfil de expresión relativa de genes carotenogénicos y cuantificación de carotenoides totales en líneas de zanahoria silenciadas para el gen *DcPHYA***

Posteriormente, determinamos la expresión relativa de genes de síntesis de carotenoides y el contenido de carotenoides como actividades claves para responder la hipótesis científica planteada. Los genes *DcPSY1* y *DcPSY2* presenta una disminución en su expresión relativa en todas las líneas analizadas en comparación a la línea Wt (Figura 19 a y b). También se determinó la expresión relativa de los genes *DcLCYB1*, *DcLCYB2*, que codifican para una enzima que participa en la síntesis del  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -caroteno (Figura 1). El gen *DcLCYB1* disminuye en su expresión relativa en las líneas ASL2, ASL5 y ASL9, en comparación con la línea Wt y la ASL11 tiene tendencia a tener mayor expresión relativa, pero la dispersión de los datos es muy alta (Figura 19 c). Por otro lado, para el gen *DcLCYB2*, en las líneas ASL5 y ASL11 y se observa una disminución en su expresión relativa, por el contrario, en las líneas ASL2 y ASL9 se observa un aumento en su expresión relativa (Figura 19 d). Considerando estos resultados, *DcPHYA* en la raíz de zanahoria regula positivamente la expresión de *DcPsy1*, *DcPSY2* y *DcLCYB1*, pero no la de *DcLCYB2*.

Finalmente, se determinó la concentración de carotenoides totales en la raíz de reserva de líneas silenciadas para el gen *DcPHYA* de zanahoria. Esto con el fin de determinar si la reducción de la expresión relativa de los genes carotenogénicos afectó la producción de carotenoides. Las líneas ASL5, ASL9 y ASL11, tienen entre 1,4 y a 2,6 veces menos contenido de carotenoides totales en su raíz de reserva crecida bajo el suelo en comparación con la línea Wt. Por otro lado, la línea ASL2 tiene una tendencia a acumular menor contenido de carotenoides, aunque no es estadísticamente significativo. Por lo tanto, *DcPHYA* es necesario para la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva zanahoria crecida bajo el suelo.



**Figura 19. Expresión relativa de genes carotenogénicos en raíces de reserva de líneas de zanahoria silenciadas para el gen *DcPHYA*.** a) expresión relativa de *DcPSY1*, b) expresión relativa de *DcPSY2*, c) expresión relativa de *DcLCYB1*, d) expresión relativa de *DcLCYB2*. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas basadas en una prueba t-student entre la línea transgénica y la línea Wt,  $p < 0,05$ . Los experimentos fueron hechos en triplicado biológico de cada T0 en plantas de x meses de edad. La expresión fue normalizada de acuerdo con el gen Ubiquitina



**Figura 20. Carotenoides totales en líneas transgénicas de zanahoria silenciadas para el gen *DcPHYA*.** Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas basadas en una prueba t-student entre la línea transgénica y la línea Wt,  $p < 0,05$ . Los experimentos fueron realizados en triplicado.

Tabla II. Resumen que incluye los principales resultados del objetivo 2 y las conclusiones derivadas de estos resultados

Principales resultados	Conclusión
La raíz de reserva de dos líneas de zanahoria silenciadas del gen <i>DcPHYA</i> tienen menor expresión relativa del gen <i>DcPAR1</i> en comparación a la línea Wt y dos líneas tienen mayor expresión relativa en comparación a la línea Wt.	Resultado contradictorio a lo reportado previamente en la literatura para <i>Arabidopsis</i> y tabaco (este trabajo)
La raíz de reserva de cuatro líneas de zanahoria silenciadas para el gen <i>DcPHYA</i> tienen menor expresión relativa de los genes <i>DcPSY1</i> y <i>DcPSY2</i> en comparación a la línea Wt. Mientras que tres líneas tienen menor expresión relativa del gen <i>DcLCYB1</i> en comparación a la línea Wt. Además, dos líneas tienen mayor expresión relativa del gen <i>DcLCYB2</i> y dos líneas menor expresión en comparación a la línea Wt.	Se sugiere que en la raíz de reserva de zanahoria <i>DcPHYA</i> regula de forma positiva la expresión de <i>DcPSY1</i> , <i>DcPSY2</i> y <i>DcLCYB1</i> , pero no la de <i>DcLCYB2</i>
La raíz de reserva de tres líneas de zanahoria silenciadas para el gen <i>DcPHYA</i> tienen significativamente menor contenido de carotenoides totales en comparación a la línea Wt.	Se sugiere que en la raíz de reserva de zanahoria <i>DcPHYA</i> regula de forma positiva el contenido de carotenoides totales

## 4 DISCUSIÓN

### **4.1 El análisis *in silico* sugiere que *DcPHYA* de zanahoria podría codificar para una proteína funcional**

Con el fin de aportar evidencias al mecanismo de cómo la zanahoria produce carotenoides creciendo bajo tierra, se hizo un análisis de RNA seq entre la raíz de reserva crecida bajo tierra y la raíz crecida bajo LB, encontrando varios genes regulados por luz, entre los cuales *DcPHYA* presentó 1135 más veces de cambio en la raíz crecida bajo tierra respecto a la raíz crecida en luz (Arias, *et al.*, 2020). Esto último es opuesto a lo que sucede en *Arabidopsis*, donde la expresión de *PHYA* en la raíz es independiente de si esta crece bajo LB o en oscuridad (Canton y Quail, 1999). Además, sabiendo que *PHYA* promueve la fotomorfogénesis y la síntesis de pigmentos como los carotenoides cuando la planta esta en sombra (baja proporción de LR/LRL) (Martinez-Garcia, *et al.*, 2014; Sng *et al.*, 2020), nos pareció interesante determinar su rol en la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva de zanahoria crecida bajo tierra.

Al analizar *in silico* la secuencia aminoacídica de *DcPHYA* de zanahoria con *AtPHYA* de *Arabidopsis*, advertimos el alto porcentaje (73,19%) de identidad de secuencia aminoacídica, similar a lo reportado entre secuencias aminoacídicas de *PHYA* de distintas especies (Hauser, *et al.*, 1995; Trakulnaleamsai, *et al.*, 2005). Los dominios mínimos canónicos PAS, GAF y PHY de *PHYA*, son compartidos entre procariotas y eucariotas (Björling, *et al.*, 2016) e indispensables para que *PHYA* cumpla su función y que están presentes en *DcPHYA* (Figura 3). Estos antecedentes nos sugirieron que *DcPHYA* podía ser funcional.

Un SNP, fue encontrado en la posición nucleotídica 733 que cambia una Guanina (G) en la secuencia de *DcPHYA* de la base de datos, por una Adenina (A) en el *DcPHYA* clonado. El SNP se traduce en un cambio de aminoácido en la posición D245N, pero que no es conservado en el dominio, por lo tanto, no debería afectar



la función del dominio ni de la proteína (Figura 3). Este SNP puede ser explicado por la alta heterogeneidad entre las variedades cultivadas de zanahoria, encontrándose una alta cantidad de SNP entre ellas (Iorizzo, *et al.*, 2011; Rong *et al.*, 2014; Stelmach, *et al.*, 2021). Además, considerando que la variedad Nantesa usada para este trabajo no es la misma variedad Nantes-type carrot (DH1) que fue usada para secuenciar el genoma publicado por Iorizzo, *et al.*, (2016), era esperable encontrar algún polimorfismo.

#### **4.2 *DcPHYA* codifica para un PHYA funcional que responde a la LRL, inhibiendo la elongación del hipocótilo y regulando la expresión génica de los genes *NtPEPCK* y *NtPAR1-like***

Se ha estudiado la función de PHYA en LRL de distintas especies usando modelos heterólogos como *Arabidopsis* y tabaco (Rodson, *et al.*, 1996; Halliday, *et al.*, 1997). PHYA promueve la fotomorfogénesis en LRL, esto incluye la inhibición del crecimiento del hipocótilo y la síntesis de pigmentos, como carotenoides y clorofila (Martínez-García, *et al.*, 2014; Sng, *et al.*, 2020). En este trabajo se realizó una caracterización funcional de *DcPHYA* en 3 líneas expresoras en tabaco, en la generación T1 (Sección 3.1.5). La generación T1 en tabaco es utilizada ampliamente para estudiar funcionalmente genes, como en el caso de los trabajos de Zhang, *et al.*, (2001), quienes estudiaron la función del gen *NTHK2*, que codifica para un receptor de etileno y Petruccelli, *et al.*, (2001), quienes estudiaron el factor de transcripción RF2a y sus interacciones funcionales con el promotor del gen rice tungro bacilliform badnavirus (RTBV). Las líneas EL4, EL6, EL7 de tabaco expresoras de *DcPHYA* presentaron una abundancia de transcrito del transgén similar entre ellas, lo que produjo fenotipos más homogéneos en su respuesta ante LRL, lo que se correlaciona con lo reportado por Keller, *et al.*, (1989) que caracterizó líneas de tabaco expresoras de *PHYA* con distintos niveles de expresión del transgén. Las líneas que tuvieron mayor expresión tuvieron un comportamiento mucho más dramático en comparación a las de expresión similar. Las líneas sometidas a tratamientos con

LRL tuvieron una inhibición en la elongación del hipocótilo en comparación a la línea VSI, pero no en la condición de oscuridad (Sección 3.1.4), tal como ha sido reportado para PHYA en tabaco y Arabidopsis (Rodson, *et al.*, 1996; Halliday, *et al.*, 1997). Este resultado sugiere fuertemente que *DcPHYA* es funcional en LRL y actúa promoviendo el acortamiento del hipocótilo.

De forma paralela, PHYA activo es capaz de regular la expresión de genes de manera positiva o negativa, a través de su unión a factores de transcripción (Wang, *et al.*, 2002; Tepperman, *et al.*, 2006; Chen, *et al.*, 2014). De manera interesante Chen, *et al.*, (2014) reportó que el gen *AtGGPS* y *AtLCHB* es regulado positivamente por PHYA en LRL, mientras que los genes *AtPEPCK* y *AtPAR1* son regulados de manera negativa en LRL. El gen *GGPS* codifica una enzima que cataliza la biosíntesis de GGPP precursor de la biosíntesis de isoprenoides, los cuales son metabolitos precursores de los carotenoides (Okada, *et al.*, 2000). Determinamos que 2 de las líneas de tabaco expresoras de *DcPHYA* tratadas con LRL no cambian la expresión relativa de *NtGGPS* en comparación a la línea VSI, mientras que la línea EL7 baja su expresión (Sección 3.1.6). Esto es contrario a lo reportado por Chen, *et al.*, (2014). Además, es contrario al hecho de que *PHYA* podría estar regulando de forma positiva varios genes de la ruta MEP, tal como 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) (Meier, *et al.*, 2011; Pu, *et al.*, 2021). Para el gen *LCHB*, que codifica una proteína que se encuentra en el complejo de antena de luz del fotosistema II (Jansson, 1994, y Jansson, 1999), determinamos que 2 de las líneas de tabaco expresoras de *DcPHYA* tratadas con LRL no cambian su expresión relativa en comparación a la línea VSI, mientras que la línea EL4 baja su expresión. Esto tampoco concuerda a lo reportado por Chen, *et al.*, 2014. Posiblemente la diferencia radica en que Chen, *et al.*, 2014, cuantificó la expresión relativa luego de 3 horas de radiación con LRL, mientras que nosotros realizamos el análisis luego de 7 días en LRL. Por tanto, es posible que estos genes se regulen de manera positiva por acción de *DcPHYA* en un periodo corto de exposición a LRL pero a tiempos más

largos este efecto se pierda. Además, el gen *LCHB* se expresa dependiendo del reloj circadiano (Piechulla, *et al.*, 1998; Christensen y Silverthorne, 2001), lo que sugiere que este gen necesita un contexto génico para expresarse y que, posiblemente, *PHYA* por sí solo no es capaz de regular su expresión. Por lo tanto, se podría analizar la expresión de *NtGGPS* y *NtLCHB* en periodos de tiempo más cortos tratando las plantas con LRL o incluir fotoperiodo el tratamiento. Para el gen *PEPCK* que codifica una quinasa que cataliza el primer paso de la gluconeogénesis (Huag, *et al.*, 2015), observamos que las líneas expresoras de *DcPHYA* de tabaco tratadas con LRL, tienen una menor expresión relativa de este gen en comparación a la línea VSI en oscuridad, lo cual coincide con lo reportado por Chen, *et al.*, (2014). Además, esto es apoyado por Carlson, *et al.*, (2019) quienes determinaron en tejido vegetativo de líneas de tomate mutantes para el gen *SIPHYA* que hay una mayor expresión relativa de *SIPPEPCK* en comparación a la línea Wt. Del mismo modo, Bianchetti, *et al.*, (2018), quienes analizaron frutos de tomates con un silenciamiento fruto específico para el gen *SIPHYA* y determinaron que *PHYA* estaría regulando de manera negativa la biosíntesis de almidón y, por lo tanto, favoreciendo la glicolisis. Para el gen *PAR1*, que es un gen que codifica para un cofactor transcripcional que participa en la señalización por luz, promoviendo la fotomorfogénesis en sombra (Roig-Villanova, *et al.*, 2006; Bou-Torrent, *et al.*, 2015). Determinamos que las líneas expresoras de *DcPHYA* de tabaco tratadas con LRL, tienen una menor expresión relativa de este gen en comparación a la línea VSI, lo cual coincide con lo reportado por Chen, *et al.*, (2014) a las 3 h. de luz LRL. En este mismo sentido, la expresión de *AtPAR1* es regulada de manera negativa en líneas de Arabidopsis sobreexpresoras de *AtPHYA* al comparadas con líneas Wt sometidas a tratamientos con sombra simulada (Roig-Villanova, *et al.*, 2006). Además, en líneas de Arabidopsis mutantes para el gen *AtPHYA* tratadas con LB, aumenta la expresión relativa de *AtPAR1* en comparación a la línea Wt (Swain, *et al.*, 2017). Por lo tanto, *PHYA* regula de forma negativa la expresión de *PAR1* en LB, en sombra simulada y LRL (este trabajo). Es así como podemos concluir que

*DcPHYA* regula la expresión de genes endógenos claves en metabolismo de azúcares, como *NtPEPCK* y fotomorfogénesis, como *NtPAR1-like*.

#### **4.3 Líneas de tabaco expresoras de *DcPHYA* sometidas a tratamientos con LRL continua presentan una reducción en la expresión de *NtPSY1* y *NtPSY2*, sin afectar el contenido de carotenoides totales ni el de clorofila a y b**

*PSY* es regulado de forma positiva por *PHYA* en tratamientos con LRL (von Lingtin, *et al.*, 1997; Chen, *et al.*, 2014). Además, *PHYA* promueve un aumento del contenido de pigmentos, como carotenoides, a través de la expresión de *PSY* en líneas de *Arabidopsis* tratadas con sombra simulada, y de clorofilas (Zhao, *et al.*, 2013; Sng, *et al.*, 2020). Sin embargo, nuestros resultados muestran que tanto la expresión de *NtPSY1* y *NtPSY2* es reducida por acción de *DcPHYA* en tratamientos con LRL (Sección 3.1.6) aunque esto no afectó el contenido de carotenoides totales ni de clorofila a y b en las líneas tratadas durante 7 días con LRL, salvo que la línea EL4 tuvo un menor contenido de carotenoides totales en comparación a la línea Wt. Esto es contrario a lo que ocurre en modelos como la raíz de reserva de zanahoria y frutos de tomate (Ronen, *et al.*, 1999; Fuentes, *et al.*, 2012) donde se correlaciona el nivel de expresión de *PSY*, con el contenido de carotenoides. Aunque, en tejido fotosintético, en el trabajo de von Lingtin, *et al.*, (1997) no encontraron diferencias en el contenido de carotenoides luego de 24 horas de irradiar plantas con LRL al comparar una línea mutante para *PHYA* con la línea Wt, a pesar de que sí se observó una disminución en la expresión de *PSY*. Por lo tanto, tal como lo encontramos en nuestro trabajo, en tejido vegetativo no siempre se correlaciona directamente el contenido carotenoides con la expresión de *PSY*.

Con nuestro resultado sugerimos que *DcPHYA* regularía negativamente la expresión de los genes *NtPSY1* y *NtPSY2* en plantas de 7 días en LRL. Pero, sería interesante determinar el efecto que tiene *DcPHYA* en otro tipo de

tratamiento de luz, como, por ejemplo, sombra. Esto se apoya en que la acumulación de carotenoides está determinada por un equilibrio entre la producción (aumento en la expresión de genes carotenogénicos) (Maass, *et al.*, 2009; Stanley, *et al.*, 2019), acumulación (desarrollo y producción de plastidios que acumulan mayor contenido de carotenoides) (Sun, *et al.*, 2018; Choi, *et al.*, 2021; Llorente, *et al.*, 2020) y degradación (Ohmiya, *et al.*, 2016), lo que pudo verse afectado por la presión del tratamiento en LRL continua, que imposibilita la expresión de genes asociados al ritmo circadiano, por ejemplo (Venkat y Muneer, 2022).

Por otra parte, un fenómeno que nos llamó la atención fue que se acumulara clorofila a en la condición de oscuridad. Esto puede deberse al pulso de 10 min. en LB para inducir la germinación de las semillas, ya que Thorne, *et al.*, (1971) reportan que desde los 10 min. de exposición de las plantas a LB se puede cuantificar el contenido de clorofila.

#### **4.4. *DcPHYA* regula de manera positiva la expresión relativa de *DcPSY1* y *DcPSY2* y el contenido de carotenoides totales en la raíz de reserva de zanahoria crecida bajo tierra**

En zanahoria se han caracterizado ampliamente los genes que codifican para las enzimas claves de la ruta de síntesis de carotenoides como *PSY1*, *PSY2*, *LCYB1*, *LCYB2*, *ZDS1*, *ZDS2* (Stange, *et al.*, 2008, Clotault, *et al.*, 2008; Fuentes, *et al.*, 2012; Moreno, *et al.*, 2016; Moreno, *et al.*, 2022). Sin embargo, se ha estudiado poco los factores ambientales que regulan su síntesis, contrario a modelos como *Arabidopsis* o tomate, donde es conocido que factores, como la temperatura y la luz regulan la síntesis de carotenoides (Stanley, *et al.*, 2019). Algunos avances en el entendimiento sobre factores ambientales en la regulación de la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva de zanahoria indican que el estrés por sal aumenta la expresión de *DcPSY1* y *DcPSY2*, lo que podría aumentar el contenido de carotenoides (Simpson, *et al.*, 2018). Además, como se mencionó

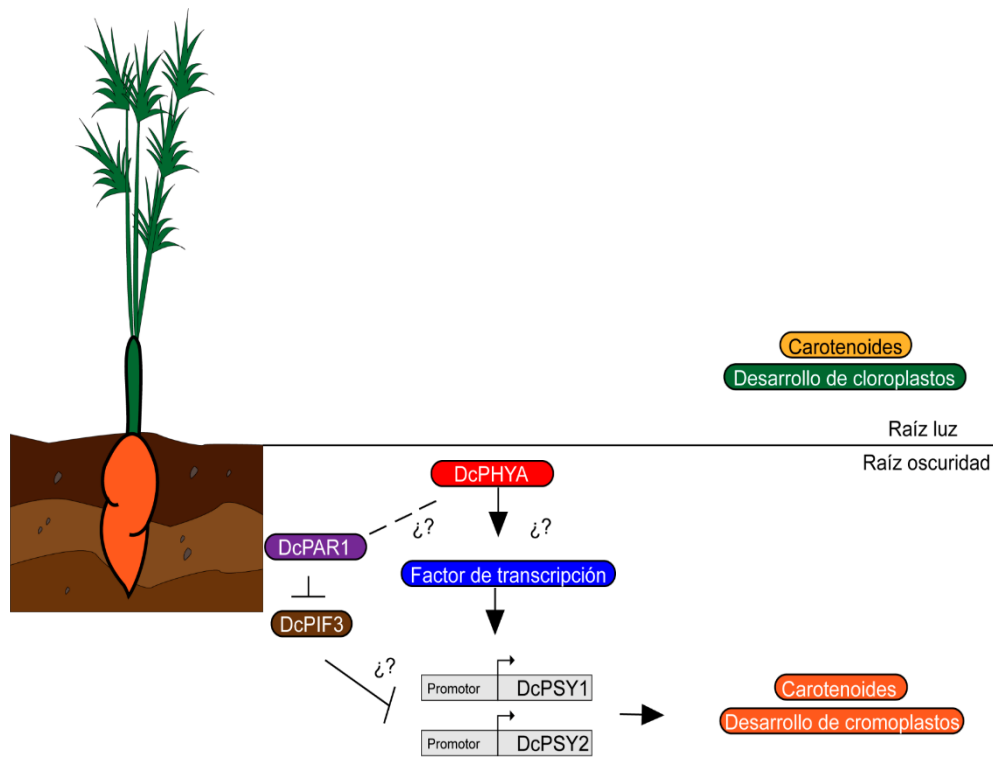
anteriormente, la LB inhibe la expresión de genes carotenogénicos y reduce el contenido de carotenoides en raíz reserva de zanahoria (Fuentes, *et al.*, 2012). Profundizando en esta última idea, en nuestro grupo de investigación se ha hipotetizado que moléculas de señalización por luz podrían estar regulando la síntesis o acumulación de carotenoides en la raíz de reserva de zanahoria crecida bajo tierra. Estas moléculas incluyen a *DcPAR1* y *DcPHYA*. Estudios funcionales de *DcPAR1* mediante la generación de zanahorias silenciadas para *DcPAR1* mostraron que este gen es necesario para la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva de zanahoria (Arias, *et al.*, 2020; Arias, *et al.*, 2022).

En modelos vegetales como *Arabidopsis* y tomate, PHYA estaría regulando el número de raíces laterales (Salisbury, *et al.*, 2007), la densidad de raíces en plantas sometidas a tratamientos de sombra simulada (van Gelderen, *et al.*, 2018), desarrollo de pelos radiculares en LRL (de Simone, *et al.*, 2000) y el desarrollo de cloroplastos, en raíces que son expuestas a LB (Koyasaki, *et al.*, 2012). Con respecto al contenido de pigmentos en raíces, no se sabe el rol que juega PHYA, considerando que las raíces creciendo bajo tierra no son pigmentadas. Estos antecedentes apoyaron la idea de estudiar funcionalmente a *DcPHYA* en zanahoria.

En este trabajo obtuvimos 7 líneas transgénicas que amplificaron el gen de resistencia a kanamicina (Sección 3.2.2), aunque solo 5 presentaron silenciamiento de *DcPHYA*. Esto, posiblemente, debido al contexto genómico donde se insertó el transgén (Sanford, 2000; El-Sappah *et al.*, 2021). Así como en las líneas de tabaco que expresan el gen *DcPHYA*, cuantificamos la expresión relativa de *DcPAR1* en las líneas silenciadas para el gen *DcPHYA* de zanahoria. Esto lo realizamos, además, porque ya se había determinado que *DcPAR1* es requerido para la síntesis de carotenoides en la raíz de zanahoria crecida bajo tierra (Arias, *et al.*, 2022). Nuestros resultados no mostraron una tendencia clara, ya que dos líneas muestran una mayor expresión relativa mientras las otras dos, muestran menos expresión relativa en comparación a la línea Wt. Esto se puede

explicar ya que la expresión de *PAR1* es regulada por FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL3 (*FHY3*) y FAR-RED-IMPAIRED RESPONSE1 (*FAR1*), dos moléculas que participan en la vía de señalización por *PHYA* (Liu, *et al.*, 2019), que puede verse afectada en líneas con una menor expresión de *PHYA*. Para poder explicarlo más claramente habría que determinar la abundancia de transcritos de *FHY3* y *FAR1* en las líneas silenciadas. Además, quizás el órgano de la planta en el cual estamos estudiando *PAR1*, presente una regulación diferente al tejido fotosintético.

Con respecto a los genes carotenogénicos, la expresión relativa de los genes *DcPSY1*, *DcPSY2* se vio dramáticamente disminuida en comparación a la línea Wt (Sección 3.2.4), lo que concuerda con los antecedentes reportados en frutos de tomate silenciados para *SIPHYA* y para el tejido vegetativo en *Arabidopsis* Bianchetti, *et al.*, (2018) y von Lingtin, *et al.*, (1997). Respecto a los genes *DcLCYB1* y *DcLCYB2* que están río debajo de *PSY*, solo *DcLCYB1* presentó una reducción en la expresión relativa. Esto es contrario a lo que ocurrió en Arias, *et al.*, (2022) con el silenciamiento *DcPAR1* en líneas de zanahoria, donde la expresión relativa de *DcLCYB2*, disminuye significativamente en todas las líneas analizadas. Sin embargo, el contenido de carotenoides totales en las líneas de zanahoria silenciadas para el gen *DcPHYA* fue significativamente menor (Figura 20). Por tanto, concluimos que se *DcPHYA* es necesario para la síntesis de carotenoides, posiblemente a través del aumento en la expresión relativa de *DcPSY1* y *DcPSY2*. Además, mostramos el primer antecedente del rol de un fotoreceptor en la raíz de reserva de zanahoria.



**Figura 21. Propuesta de modelo por el cual en la raíz de reserva de zanahoria crecida bajo tierra estaría acumulando carotenoides.** El modelo incluye resultados de Fuentes *et al.*, (2012) Arias, *et al.*, (2020), Arias, *et al.*, (2022), Durán, 2019 y este trabajo. De acuerdo a Fuentes *et al.*, (2012), cuando la raíz de reserva de zanahoria crece bajo LB, desarrolla cloroplastos y acumula carotenoides, como luteína. Por el contrario, cuando crece bajo tierra, desarrolla cromoplastos y alta cantidad de carotenoides, como  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno. A nivel molecular hemos determinado que *DcPHYA* regula de manera positiva la expresión de *DcPSY1* y *DcPSY2*, esto pensamos lo hace a través de un factor de transcripción (este trabajo). Además, *DcPAR1*, regula de manera positiva en contenido de carotenoides e interacciona con *DcPIF3*, posiblemente impidiendo su unión a los promotores de genes carotenogénicos (Arias, *et al.*, 2020, Arias, *et al.*, 2022, Durán, 2019). Flecha indica regulación positiva. Flecha achurada indica falta de información. Flecha sin punta, indica regulación negativa



## 5 CONCLUSIONES

Considerando que:

- El gen *DcPHYA* de zanahoria, cuyos niveles expresión son regulados positivamente en la porción de raíz de zanahoria crecida bajo tierra y negativamente en la porción de raíz crecida bajo LB, codificaría una proteína con 73,19% de similitud de secuencia aminoacídica con *AtPHYA* de *Arabidopsis*.
- *DcPHYA* es activo en LRL ya que inhibe la elongación del hipocótilo y regula la expresión de genes de manera negativa (*NtPEPCK* y *NtPAR1-like*) en plantas de tabaco.
- *DcPHYA* en LRL induce una disminución de la expresión de *NtPSY1* y *NtPSY2* sin un cambio en el contenido de carotenoides totales y de clorofilas en plantas de tabaco.
- Líneas de zanahoria silenciadas para el gen *DcPHYA*, presentan una disminución dramática en la expresión relativa de genes carotenogénicos, como *DcPSY1*, *DcPSY2* y *DcLCYB1* en su raíz de reserva crecida bajo tierra y una reducción significativa del contenido de carotenoides totales.

Los resultados obtenidos en esta tesis confirman la hipótesis científica, y nos permiten concluir que *DcPHYA* codifica un PHYA funcional en LRL y que en zanahoria induce la expresión de *DcPSY1* y *DcPSY2* promoviendo la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva de esta planta crecida bajo tierra.

Así mismo se confirma la hipótesis tecnológica, donde la expresión de PHYA podría aumentar el contenido de carotenoides al ser expresado en un órgano que crece bajo tierra.

## 6. Proyecciones de la tesis

### 6.1 Científicas

Proponemos algunos experimentos para decifrar el mecanismo por el cual *DcPHYA* estaría actuando en tejido fotosintético y en la raíz de reserva de zanahoria.

Como primera aproximación, en tabaco, proponemos hacer un nuevo tratamiento de luz en las líneas expresas de *DcPHYA* para determinar si este fotoreceptor pudiese estar regulando la síntesis de carotenoides en tejido fotosintético. El tratamiento propuesto será basándonos en lo reportado por Sng, *et al.*, (2021), quienes demostraron que en sombra (baja proporción de LR/LRL) PHYA estaría regulando la síntesis de carotenoides. Además, ellos utilizaron plantas de aproximadamente un mes de edad y con fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Pensamos que es posible que los tres componentes anteriormente mencionados ayuden a determinar el real efecto de *DcPHYA* en la síntesis de carotenoides en tejido fotosintético. En este ensayo proponemos medir la abundancia de distintas proteínas, como PHYA, para saber la cantidad de proteína que tiene las líneas analizadas. De HY5, que es un factor de transcripción candidato que regula de manera positiva la expresión de *PSY* en *Arabidopsis* y que debería estar más estable en las líneas expresas de *DcPHYA* en comparación a la línea VSI. De PIF, que se ha descrito como regulador negativo de la expresión de *PSY* y además es regulada de manera negativa por PHYA, por lo tanto, debería haber menos en las líneas expresas de *DcPHYA* en comparación a la línea VSI.

Para zanahoria, a pesar de que establecimos las condiciones para realizar un Western blot para PHYA, *PSY* y actina, tuvimos problemas realizando la técnica

en las raíces de las líneas silenciadas para el gen *DcPHYA*. Esto, posiblemente, debido a que estas líneas tenían más de un año de edad cuando fue recolectado el tejido y quizás la muestra de la raíz tenía muchos metabolitos como carotenoides y azúcares, que afectaron el reconocimiento de la proteína por parte de los anticuerpos. Es por esto por lo que pensamos que los Western blot en esta planta se deberían hacer en estadios de desarrollo más tempranos, como lo hizo Maass et al., (2009) y Flores-Ortiz et al., (2020). Basados en los límites que tenemos por la muestra utilizada, proponemos profundizar en la relación que tiene *DcPHYA* y *DcPAR1* en la raíz de reserva de las líneas silenciadas para el gen *DcPHYA*. En *Arabidopsis* las moléculas *FHY3* y *FAR1* participan en la señalización por luz y además regulan la expresión de *PAR1*. Por ello, determinaremos la expresión relativa de *FHY3* y *FAR1* en la raíz de reserva de las líneas silenciadas para el gen *DcPHYA* de zanahoria, por lo que deberemos buscar los genes ortólogos en zanahoria.

## 6.2 Biotecnológicas

Al igual que en zanahoria, plantas como papa dulce (*Ipomoea batatas*) y Cassava (*Manihot esculenta*), acumulan carotenoides en un órgano crecido bajo tierra mientras que los niveles en la papa (*Solanum tuberosum*) son muy bajos. Los cultivos de papa dulce y cassava son importantes en América Latina, África y Asia, cuya producción llega a ser de 85 y 270 millones de toneladas anuales, respectivamente (FAOSTAT, 2018). Por lo tanto, entender cómo se regula la síntesis de carotenoides en un órgano crecido bajo tierra, tomando como modelo zanahoria, nos aportaría en conocimiento de cómo se podría regular la síntesis de carotenoides en órganos crecidos en estas condiciones. Este conocimiento podría aplicarse para biofortificar cultivos que son normalmente consumidos por población de riesgo en déficit de vitamina A.

Considerando que la deficiencia de vitamina A afecta principalmente a personas en África y Asia oriental, según datos de la OMS (Organización Mundial de la

Salud), ha motivado el desarrollo de alimentos biofortificados en carotenoides, tal como arroz, tomate, yuca y papa (Alos, *et al.*, 2016; Quiroz-Iturra, *et al.*, 2017). En la mayoría de las aproximaciones para aumentar los carotenoides en plantas, se han expresado genes que codifican para enzimas claves en la ruta de síntesis de carotenoides, como *PSY* (Maass, *et al.*, 2009; Welsh, *et al.*, 2010; Alos, *et al.*, 2016). Además, se ha determinado que la modificación en la acumulación de carotenoides está acompañada por una modificación en la expresión de genes de señalización por luz (Liu, *et al.*, 2004; Giliberto, *et al.*, 2005; Alos, *et al.*, 2016; Cruz, *et al.*, 2018). Considerando nuestros resultados, proponemos expresar a *DcPHYA* bajo un promotor raíz o tubérculo específico (Failla, *et al.*, 2012) para promover la síntesis de carotenoides en plantas de interés comercial, como papa dulce y cassava.

## 7. REFERENCIAS

Alba R, Cordonnier-Pratt, MM., Pratt LH. (2000). Fruit-localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. *Plant Physiology*. 123: 363–370.

Alós E., Rodrigo M.J., Zacarias L. (2016). Manipulation of Carotenoid Content in Plants to Improve Human Health. In: Stange C. (eds) *Carotenoids in Nature. Subcellular Biochemistry*. Springer.

Alves, F., Lira, B., Pikart, F., Monteiro, S., Furlan, C., Purgatto, E., Pascoal, G., B., Andrade, S., Demarco, D., Rossi, M., Freschi, L., (2019). Beyond the limits of photoperception: constitutively active PHYTOCHROME B2 overexpression as a means of improving fruit nutritional quality in tomato. *Plant Biotechnology Journal*. 18(10):2017-2041.

Arias D, Maldonado J, Silva H, Stange C. (2020). A *de novo* transcriptome analysis revealed that photomorphogenic genes are required for carotenoid synthesis in the dark- grown carrot taproot. *Molecular Genetics and Genomics*. 295:1379–1392.

Arias, D., Ortega, A., González-Calquin, C., Quiroz, L-F., Moreno-Romero, J., Martínez-García, J., Stange, C. (2022). Development and carotenoid synthesis in dark-grown carrot taproots require PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED1. *Plant Physiology*. 189(3):1450–1465.

Ben-Shaul Y, Klein S (1965). Development and structure of carotene bodies in carrot roots. *Botanical Gazette*. 126: 79–85.

Bianchetti RE, Cruz AB, Oliveira BS, Demarco D, Purgatto E, Peres LEP, Rossi M, Freschi L. (2017). Phytochromobilin deficiency impairs sugar metabolism

through the regulation of cytokinin and auxin signaling in tomato fruits. *Scientific Reports*. 7:7822.

Bianchetti, B., Santos, S., Demarco, D., Purgatto, E., Rothan, C., Rossi, M., Fresch, L. (2018). Fruit-localized phytochromes regulate plastid biogenesis, starch synthesis, and carotenoid metabolism in tomato. *Journal of Experimental Botany*. 69(15):3573–3586.

Björling, A., Berntsson, O., Lehtivuori, H., Takala, H., Hughes, A., Panman, M., Hoernke, M., Niebling, S., Henry, L., Henning, R., Kosheleva, I., Chukharev, V., Tkachenko, N., Menzel, A., Newby, G., Khakhulin, D., Wulff, M., Ihalainen, J., Westenhoff, S. (2016). Structural photoactivation of a full-length bacterial phytochrome. *Science Advances*. 2(8):E1600920.

Böhm, C., Todorovic, N., Balasso, M., Gourinchas, G., Winkler, A. (2021). The PHY Domain Dimer Interface of Bacteriophytochromes Mediates Cross-talk between Photosensory Modules and Output Domains. *Journal of Molecular Biology*. 433:167092.

Bou-Torrent, j., G. Toledo-Ortiz, M. Orteiz- Alcaide, N. Cifuentes- Esquivel, K. J. Halliday, J.F. Martinez-Garcia and Rodriguez-Concepcion, M (2015). “Regulation of carotenoid biosynthesis by shade relies on specific subsets of antagonistic transcription factors and co-factors. *Plant Physiology*. 169(3):1584-1594.

Bramley, P. (1997). “Isoprenoid metabolism”. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (eds) *Plant Biochemistry*. Academic Press. 417-437. Academic Press.

Bush, M., Seuter, A., Hain, R. (2022). Functional Analysis of the Early Steps of Carotenoid Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiology*. 128:439-453.

Cantón FR, Quail PH. (1999). Both phyA and phyB mediate light-imposed repression of *PHYA* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 121(4):1207-16.

Carlson, K., Bhogale, S., Tomanek, L., Madlung, A. (2019). Phytochrome A regulates carbon flux in dark grown tomato seedling. *Frontiers in Plant Science*. 10:152.

Casal, J. (2013). Photoreceptor Signaling Networks in Plant Responses to Shade. *The Annual Review of Plant Biology*. 64:403-427.

Casal, J., Candia, A., Sellaro, R. (2013). Light perception and signaling by phytochrome A. *Journal of Experimental Botany*. 65(11): 2835-2845.

Casal, J., Luccioni, L., Oliverio, K., Boccalandro, H. (2003). Light, phytochrome signalling and photomorphogenesis in *Arabidopsis*, *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2:625–636.

Chen, F., Li, B., Li, G., Charron, J.B., Dai, M., Shi, X., Wang, X., (2014). *Arabidopsis* Phytochrome A Directly Targets Numerous Promoters for Individualized Modulation of Genes in a Wide Range of Pathways. *The Plant Cell*. 26:1949-1966.

Choi, H., Yi, T., Ha, SH. (2021). Diversity of Plastid Types and Their Interconversions. *Front Plant Science*. 12:692024.

Christensen, S., Silverthorne, J. (2001). Origins of phytochrome-modulated *Lhcb* mRNA expression in seed plants. *Plant Physiology*. 126(4):1609-18.

Clack, T., Mathews, S., Sharroc, R. (1994). The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Molecular Biology*. 25: 413-427.

Clotault, J., D. Peltier, R. Berruyer, M. Thomas, M. Briard and E. Geoffriau (2008). Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *Journal Experimental Botany*. 13: 3563-3573

Cornilescu, G., Ulijasz, A., Cornilescu, C., Markley, J., Vierstra, R. (2008). Solution Structure of a Cyanobacterial Phytochrome GAF Domain in the Red-Light-Absorbing Ground State. *Journal of Molecular Biology*. 383:403-413.

Cruz AB, Bianchetti RE, Alves FRR, Purgatto E, Peres LEP, Rossi M., Freschi L (2018) Light, Ethylene and Auxin Signaling Interaction Regulates Carotenoid Biosynthesis During Tomato Fruit Ripening. *Frontier in Plant Science*. 9:1370.

de Simone, S., Oka, Y., Nishioka, N., Tadano, S., Inoue, Y. (2000). Evidence of Phytochrome Mediation in the Low-pH-Induced Root Hair Formation Process in Lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids) Seedlings. *Journal of Plant Research*. 113:45–53.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry*. 19:11-15.

Durán, F. (2019). Estudio de la expresión de *PIF3* en el desarrollo de *Daucus carota* y su interacción con *DcPAR1*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

El-Sappah, A., Yan, K., Huang, Q., Islam, M., Li, Q., Wang, Y., Sarwar, M., Zhao, X., Roulf, R., Li, L., El-Tarabily, K., Abbas, M. (2021). Comprehensive mechanism of gene silencing and its role in plant growth and development. *Frontiers in Plant Science*. 12:705249.

Essen, L-O., Mailliet, J., Hughes, J. (2008). The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(38):14709-14714.

Failla, M., Chitchumroonchokchai, C., Siritunga, D., Moura, F., Fregene, M., Manary, M., Sayre, R. (2012). Retention during processing and bioaccessibility of  $\beta$ -Carotene in High  $\beta$ -Carotene Transgenic Cassava Root. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 3861- 3866.



Fiedor, J., Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*. 6(2):466-488.

Franklin & Quail. (2009). Phytochrome functions in Arabidopsis development. *Journal of Experimental Botany*. 61(1):11-24.

Fuentes, P., L. Pizarro, J. C. Moreno, M. Handford, M. Rodriguez-Concepcion and C. Stange (2012). Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Molecular Biology*. 79:47-59.

Fuentes, P., Pizarro, L., Moreno, J., Handford, M., Rodriguez-Concepción, M., Stange, C. (2012). Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Molecular Biology*. 79:47-59.

Giliberto, L., Perrotta, G., Pallara, P., Weller, J., Fraser, P., Bramley, P., Fiore, A., Tavazza, M., Giuliano, G. (2005). Manipulation of the Blue Light Photoreceptor Cryptochrome 2 in Tomato Affects Vegetative Development, Flowering Time, and Fruit Antioxidant Content. *Plant Physiology*. 137:200-208.

Gonzalez-Calquin, C., Stange, C. (2020). Agrobacterium tumefaciens-Mediated Stable Transformation of *Daucus carota*. In: Rodríguez-Concepción, M., Welsch, R. (eds) *Plant and Food Carotenoids*. *Methods in Molecular Biology*, vol 2083. Humana, New York, NY.

Halliday, K., Thomas, B., Whitelam, G. (1997). Expression of heterologous phytochromes A, B or C in transgenic tobacco plants alters vegetative development and flowering time. *The Plant journal*. 12(5):1079-1090.

Hao, Y., Oh, E., Choi, G., Liang, Z. and Wang, Z-Y. (2012). Interactions between HLH and bHLH factors modulate light-regulated plant development. *Molecular Plant*. 5:688-697

Hashimoto H., Uragami C., Cogdell R.J. (2016). Carotenoids and Photosynthesis. In: Stange C. (eds) Carotenoids in Nature. Subcellular Biochemistry, vol 79. Springer, Cham.

Hauser, B., Cordonnier-Pratt, M-M., Daniel-Vedele, F., Pratt, L. (1995). The phytochrome gene family in tomato includes a novel subfamily. *Plant Molecular Biology*. 29:1143-1155.

Hennig, L., Büche, C., Eichenberg, K., Schäfer, E. (1999). Dynamic properties of endogenous phytochrome A in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*. 121(2):571-7.

Hoang, Q., Han, Y. J., & Kim, J. I. (2019). Plant Phytochromes and their Phosphorylation. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(14):3450.

Hoang, Q., Han, Y-J., Kim, J. (2015). Plant Phytochromes and their Phosphorylation. *Internacional Journal of Molecular Sciences*. 20:3450.

Holsters M, de Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M, Schell J. (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics*.163(2):181-7.

Horsch R, Fry J, Hoffmann N, Eichholtz D, Rogers S, Fraley R. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*. 227:1229–1231.

Huang, Y-X., Yin, Y-G., Sanuki, A., Fukuda, N., Ezura, H., Matsukura, C. (2015). Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) deficiency affects the germination, growth and fruit sugar content in tomato (*Solanum lycopersicum L.*). *Plant Physiology and Biochemistry*. 96:417-425.

Iorizzo, M., D. A. Senalik, D. Grzebelus, M. Bowman, P. F. Cavagnaro, M. Matvienko, H. Ashrafi, A. Van Deynze and P. W. Simon (2011). *De novo* assembly and characterization of the carrot transcriptome reveals novel genes, new markers, and genetic diversity. *BMC Genomics* 12:389

Iorizzo, M., Ellison, S., Senalik, D., Zeng, P., Satapoomin, P., Huang, J., Bowman, M., Iovene, M., Sanseverino, W., Cavagnaro, P., Yildiz, M., Macko-Podgórní, A., Moranska, E., Grzebelus, D., Ashrafi, H., Zheng, Z., Cheng, S., Spooner, D., Van Deynze, A. and Simon, P. (2016). A high-quality carrot genome assembly provides new insights into carotenoid accumulation and asterid genome evolution. *Nature Genetics*. 48:657-666

Jansson, S. (1994). The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. *Biochemical Biophys Acta*. 1184(1):1-19.

Jansson, S. (1999). A guide to the LHC genes and their relatives in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*. 4(6):236-240.

Jha, B., Sharma, A., Mishra, A. (2011). Expression of SbGSTU (tau class glutathione S-transferase) gene isolated from *Salicornia brachiata* in tobacco for salt tolerance. *Molecular Biology. Reports*. 38:4823-4832.

Johnson, E., Bradley, M., Harberd, NP., Whitelam, GC. (1994). Photoresponses of Light-Grown phyA Mutants of Arabidopsis (Phytochrome A Is Required for the Perception of Daylength Extensions). *Plant Physiology*. 105(1):141-149.

Karniol, B., Wagner, JR., Walker, JM., Vierstra, RD. (2005). Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochemical Journal*. 392(1):103-16.

Keller, JM., Shanklin, J., Vierstra, RD., Hershey, HP. (1989). Expression of a functional monocotyledonous phytochrome in transgenic tobacco. *EMBO Journal*. 8(4):1005-12.

Kim, L., Kircher, S., Toth, R., Adam, E., Schäfer, E., Nagy, F. (2000). Light-induced nuclear import of phytochrome-A:GFP fusion proteins is differentially regulated in transgenic tobacco and Arabidopsis. *The Plant Journal*. 22(2):125-133.

Kirchenbauer, D., Viczián, A., Ádám, E., Hegedus, Z., Klose, C., Leppert, M., Hiltbrunner, A., Kircher, S., Schäfer, E., Nagy, F. (2016). Characterization of photomorphogenic responses and signaling cascades controlled by phytochrome-A expressed in different tissues. *New Phytologist*. 211(2):584-598.

Kneissl, J., Shinomura, T., Furuya, M., Bolle, C. (2008). A rice phytochrome A in *Arabidopsis*: The Role of the N-terminus under red and far-red light. *Molecular Plant*. 1(1):84-102.

Kobayashi, K.; Obayashi, T.; Masuda, T. (2012). Role of the G-box element in regulation of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Signal. Behavior*. 7:922–926.

Kumar, A., Senapati, D., Srivastava, A., Chakraborty, M., Gangappa, S., Chattopadhyay, S. (2015). Short Hypocotyl in White Light1 Interacts with Elongated Hypocotyl5 (HY5) and Constitutive Photomorphogenic1 (COP1) and Promotes COP1-Mediated Degradation of HY5 during *Arabidopsis* Seedling Development. *Plant Physiology*. 169:2922-2934.

Lange, BM., Ghassemian, M. (2003). Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Molecular Biology*. 51(6):925-938

Lee, H., Ha, J., Kim, S.-G., Choi, H.-K., Kim, Z. H., Han, Y.-J., Kim, J.-I., Oh, Y., Fragoso, V., Shin, K., Hyeon, T., Choi, H.-G., Oh, K.-H., Baldwin, I., Park, C.-M. (2016). Stem-piped light activates phytochrome B to trigger light responses in *Arabidopsis thaliana* roots. *Science. Signal*. 9: ra106

Li, J., Li, G., Wang, H., Wang, X. (2011). Phytochrome signaling mechanisms. *Arabidopsis Book* 9:e0148.

Lichtenthaler, H.K. and Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols Food Analytical Chemistry*. F4.3-F4.3.8

Liu, Y., Roof, S., Ye, Z., Barry, C., van Tuinen, A., Vrebalov, J., Bowler, C., & Giovannoni, J. (2004). Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences a*. 101(26):9897–9902.

Liu, Y., Wei, H., Ma, M., Li, Q., Kong, D., Sun, J., Ma, X., Wang, B., Chen, C., Xie, Y., Wang, H. (2019). Arabidopsis FHY3 and FAR1 Regulate the Balance between Growth and Defense Responses under Shade Conditions. *The Plant Cell*. 31:2089-2106.

Llorente B, D'Andrea L, Ruiz-Sola MA, Botterweg E, Pulido P, Andilla J, Loza-Alvarez P, Rodriguez-Concepcion M. (2016). Tomato fruit carotenoid biosynthesis is adjusted to actual ripening progression by a lightdependent mechanism. *The Plant Journal*. 85:107–119.

Llorente B, Torres-Montilla S, Morelli L, Florez-Sarasa I, Matus JT, Ezquerro M, D'Andrea L, Houhou F, Majer E, Picó B, Cebolla J, Troncoso A, Fernie AR, Daròs JA, (2020). Rodriguez-Concepcion M. Synthetic conversion of leaf chloroplasts into carotenoid-rich plastids reveals mechanistic basis of natural chromoplast development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 117(35):21796-21803.

Lu, S., Van Eck, J., Zhou, X., Lopez, A. B., O'Halloran, D. M., Cosman, K. M., Conlin, B. J., Paolillo, D. J., Garvin, D. F., Vrebalov, J., Kochian, L. V., Küpper, H., Earle, E. D., Cao, J., & Li, L. (2006). The cauliflower Or gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of beta-carotene accumulation. *The Plant cell*. 18(12):3594–3605.

Lu, X-D., Zhou, C-M., X, P-B., Lou, Q., Lian, H-L., Yang, H-Q. (2015). Red-Light-Dependent Interaction of phyB with SPA1 Promotes COP1–SPA1 Dissociation and Photomorphogenic Development in Arabidopsis. *Molecular Plant*. 8:467-478.

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

Martínez-García, J., Gallemí, M., Molina-Contreras, M.J., Llorente, B., Bevilaqua, M., Quail. P. (2014). The Shade Avoidance Syndrome in Arabidopsis: The Antagonistic Role of Phytochrome A and B Differentiates Vegetation Proximity and Canopy Shade *Plos ONE*. 9(10):e109275.

Meier, S., Tzfadia, O., Vallabhaneni, R., Gehring, C. and Wurtzel, E.T. (2011). A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Systems. Biology*.5:77.

Möglich, A., Ayers, R., Moffat, K. (2009). Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. *Structure*. 17(10):1282-1294.

Moreno, J.C., Cerda, A., Simpson, K., Lopez-Diaz, I., Carrera, E., Handford, M. and Stange, C. (2016). Increased *Nicotiana tabacum* fitness through positive regulation of carotenoid, gibberellin and chlorophyll pathways promoted by *Daucus carota* lycopene beta-cyclase (*Dclcyb1*) expression. *Journal. Experimental. Botany*.67: 2325–2338.

Moreno, J.C., 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(3):e58144.

Moreno, J.C., Mi, J., Agrawal, S., Kössler, S., Tureckova, V., Tarkowska, Thiele, W., Al-Babili, S., Bock, R., Schottler, M.A. (2020). Expression of a carotenogenic

gene allows faster biomass production by redesigning plant architecture and improving photosynthetic efficiency in tobacco. *The Plant Journal*. 103:1967-1984.

Moreno, J.C., 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(3):e58144.

Nisar, N., Li, L., Lu, S., Chi, N., Pogson, B. (2015). Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant*. 8(1):68-82.

Nishino, H., Tokuda, H., Murakoshi, M., Satomi, Y., Masuda, M., Onozuka, M., Yamaguchi, S., Takayasu, J., Tsuruta, J., Okuda, M., Khachik, F., Narisawa, T., Takasuba, N., Yano, M. (2000). Cancer prevention by natural carotenoids. *Biofactors*. 13:89-94.

Ohmiya, A. (2009). Carotenoid cleavage dioxygenases and their apocarotenoid products in plants. *Plant Biotechnology*. 26:351-358.

Oka Y., Matsushita T., Mochizuki N., Quail P.H., Nagatani A. (2008). Mutant screen distinguishes between residues necessary for light-signal perception and signal transfer by phytochrome B. *PLOS Genetics*. 4:e1000158.

Oka, Y., Ono, Y., Toledo-Ortiz, G., Kokaji, K., Matsui, M., Mochizuki, Nagatani, A. (2012). *Arabidopsis* Phytochrome A Is modularly Structured to Integrate the Multiple Features That Are Required for a Highly Sensitized Phytochrome. *The Plant Cell*. 24:2949-2962.

Okada, K., Saito, T., Nakagawa, T., Kawamukai, M., Kamiya, Y. (2000). Five Geranylgeranyl Diphosphate Synthases Expressed in Different Organs Are Localized into Three Subcellular Compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 122:1045-1056.

Osterlund, M., Wei, N., Xing, X. (2000). The Roles of Photoreceptor Systems and the COP1- Targeted Destabilization of HY5 in Light Control of Arabidopsis Seedling Development. *Plant Physiology*. 124:1520-1524.

Oyama, T., Shimura, Y., Okada, K. (1997). The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes & Development*. 11:2983-2995.

Petrucelli, S., Dai, S., Carcamo, R., Yin, Y., Chen, S., Beachy, R. (2001). Transcription factor RF2a alters expression of the rice tungro bacilliform virus promoter in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(13):7635-7640.

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

Piechulla, B. (1999). Circadian expression of the light-harvesting complex protein genes in plants. *Chronobiology International*. 16(2):115-28.

Pu, X., Dong, X., Li, Q., Chen, Z., Liu, L. (2021). An update on the function and regulation of methylerythritol phosphate and mevalonate pathways and their evolutionary dynamics. *Journal of Integrative Plant Biology*. 63(7):1211-1226.

Quail, P. (1991). PHYTOCHROME: A light-activated molecular switch that regulates plant gene expression. *Annual Review of Genetics*. 25:389-409.

Quian-Ulloa R, Stange C. (2021). Carotenoid Biosynthesis and Plastid Development in Plants: The Role of Light. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(3):1184.

Quiroz-Iturra, L; Rosas-Saavedra, C and Stange C (2017) "Functional fruits through metabolic engineering" in "Superfood and Functional Food- the development of superfoods and their roles in medicine", Eds Naofumi Shiomi and Viduranga Waisundra INTECH, Croatia, Rijeka.



Rodríguez-Villalón, A., Gas, E., Rodríguez-Concepción, M. (2009). Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings *The Plant Journal*. 60:424–435.

Rodson, P. and Smith, H. (1996). Genetic and Transgenic Evidence That Phytochromes A and B Act to Modulate the Gravitropic Orientation of *Arabidopsis thaliana* Hypocotyls. *Plant Physiology*. 110:211-216.

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

Roig-Villanova, I., Bou-Torrent, J., Galstyan, A., Carretero-Paulet, L., Portolés, S., Rodríguez-Concepción, M. and Martínez-García, J.F. (2007). Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. *EMBO Journal*. 26:4756-4767.

Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J. (2000). An alternative pathway to  $\beta$ -carotene formation in plant chromoplast discovered by map-based cloning of  $\beta$  and old-gold color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97: 11102-11107.

Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D., Hirschberg, J. (2000). An alternative pathway to  $\beta$ -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of  $\beta$  and old-gold color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(20):11102-7.

Rong, J., Lammers, Y., Strasburg, J. L., Schidlo, N. S., Ariyurek, Y., de Yong, T. J., Klinkhamer, P. G. L., Smulders, M. J. M., and Vrieling, K. (2014). New insights into domestication of carrot from root transcriptome analyses. *BMC Genomics* 15:895

Ruiz-Sola, M. Á., & Rodríguez-Concepción, M. (2012). Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. *The arabidopsis book*. 10:e0158.

Saijo, Y., Zhu, D., Li, J., Rubio, V., Zhou, Z., Shen, Y., Hoecker, U., Wang, H., Wang, X. (2008). Arabidopsis COP1/SPA1 complex and phytochrome A signaling intermediates associate with distinct phosphorylated forms of phytochrome A in balancing signal propagation and attenuation. *Molecular Cell*. 31(4):607-613.

Salisbury, F.J., Hall, A., Grierson, C.S. and Halliday, K.J. (2007). Phytochrome coordinates Arabidopsis shoot and root development. *Plant Journal*. 50:429-438.

Sanford, J. (2000). The development of the biolistic process. *In Vitro Cell developmental. Biology-Plant*. 36(5):303-308.

Sheerin DJ, Menon C, zur Oven-Krockhaus S, Enderle B, Zhu L, Johnen P, Schleifenbaum F, Stierhof YD, Huq E, Hiltbrunner A. (2015). Light-activated phytochrome A and B interact with members of the SPA family to promote photomorphogenesis in Arabidopsis by reorganizing the COP1/SPA complex. *Plant Cell*. 27(1):189-201.

Sheerin, D., Menon, C., Oven-Krockhaus, S., Enderle, B., Zhu, L., Johnen, P., Schleifenbaum, F., Stierhof, Y-D., Huq, E., Hiltbrunner, A. (2015). Light-Activated Phytochrome A and B Interact with Members of the SPA Family to Promote Photomorphogenesis in Arabidopsis by Reorganizing the COP1/SPA Complex. *The Plant Cell*. 27:189-201.

Sheerin, D.J.; Hiltbrunner, A. (2017). Molecular mechanisms and ecological function of far-red light signalling. *Plant Cell Environment*. 40:2509–2529.

Shin, A-Y., Han, Y-J., Baek, A., Ahn, T., Young, S., Nguyen, T., Son, M., Woo, K., Shen, Y., Song, P-S., Kim, J-I. (2016). Evidence that phytochrome functions as a protein kinase in plant light signalling. *Nature communications*. 7:11545.

Shinomura, T., Uchida, K., & Furuya, M. (2000). Elementary Processes of Photoperception by Phytochrome A for High-Irradiance Response of Hypocotyl Elongation in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 122(1):147–156.

Simpson, K., Fuentes, P., Quiroz-Iturra, L.F., Flores-Ortiz, C., Contreras, R., Handford, M., and Stange, C. (2018). Unraveling the induction of phytoene synthase 2 expression by salt stress and abscisic acid in *Daucus carota*. *Journal Experimental Botany*. 69:4113-4126

Smirnova, O., Stepanenko, I., Shunny, V. (2012). Mechanism of Action and Activity Regulation of COP1, a Constitutive Repressor of Photomorphogenesis. *Russian Journal of Plant Physiology*. 59(2):155-166.

Sng, B.J.R.; Singh, G.P.; Van Vu, K.; Chua, N.H.; Ram, R.J.; Jang, I.C. (2020). Rapid metabolite response in leaf blade and petiole as a marker for shade avoidance syndrome. *Plant Methods*. 16:144.

Stange, C., and Flores, C. (2012). "Carotenoids and Photosynthesis-Regulation of Carotenoid Biosynthesis by Photoreceptors." *Advances in Photosynthesis - Fundamental Aspects*, Chapter 4.

Stange, C., Fuentes, P., Handford, M., Pizarro, L. (2008). *Daucus carota* as a novel model to evaluate the effect of light on carotenogenic gene expression. *Biological Research*. 41:289-301.

Stanley & Yao-Wu, (2019). Transcriptional Regulation of Carotenoid Biosynthesis in Plants: So Many Regulators, So Little Consensus. *Frontiers in Plant Science*. 10:1017.

Stelmach, K., Macko-Podgórnj, A., Allender, C., Grzebelus, D. (2021). Genetic diversity structure of western-type carrots. *BMC Plant Biology*. 21(1):200.

Sun Q, Yoda K, Suzuki M, Suzuki H. (2003). Vascular tissue in the stem and roots of woody plants can conduct light. *Journal of Experimental Botany*. 54:1627–1635.

Sun, Q., Yoda, K., Suzuki, H. (2005). Internal axial light conduction in the stems and roots of herbaceous plants. *Journal of experimental Botany*. 56(409):191–203.

Sun, T., Yuan, H., Cao, H., Yazdani, M., Tadmor, Y., Li., L. (2018). Carotenoid metabolism in plants: the role of plastids. *Molecular Plant*. 11(1):58-74.

Swain, S., Jiang, HW., Hsieh, HL. (2017). FAR-RED INSENSITIVE 219/JAR1 Contributes to Shade Avoidance Responses of Arabidopsis Seedlings by Modulating Key Shade Signaling Components. *Frontiers of Plant Science*. 8:1901.

Taylor, B.L., Zhulin, I.B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. 63:479–506.

Tepperman, JM., Hwang, YS., Quail, PH. (2006). phyA dominates in transduction of red-light signals to rapidly responding genes at the initiation of Arabidopsis seedling de-etiolation. *Plant Journal*. 48(5):728-42.

Thorne, SW., Boardman, NK. (1971). Formation of chlorophyll B, and the fluorescence properties and photochemical activities of isolated plastids from greening pea seedlings. *Plant Physiology*. 47(2):252-61.

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

Trakulnaleamsai, C., Okazawa, A., An, C., Kajiyama, S., Fukusaki, E., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Kobayashi, A. (2005). Isolation and Characterization of a cDNA

Encoding Phytochrome A in the Non-Photosynthetic Parasitic Plant, *Orobancha minor* Sm. *Bioscience. Biotechnology. Biochemistry.*, 69(1):71–78.

van Gelderen, K., Kang, C. and Pierik, R. (2018). Light signaling, root development, and plasticity. *Plant Physiology.* 176:1049-1060.

Venkat, A., Muneer, S. (2022). Role of Circadian Rhythms in Major Plant Metabolic and Signaling Pathways. *Frontiers Plant Science.* 13:836244.

von Lintig, J., Welsh, R., Bonk, M., Giuliano, G., Batchauser, A., Kleining, 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. *The Plant Journal.* 12(3):625-634.

Wang H, Ma L, Habashi J, Li J, Zhao H, Deng XW. (2002). Analysis of far-red light-regulated genome expression profiles of phytochrome A pathway mutants in *Arabidopsis*. *The Plant Journal.* 32(5):723-33.

Waters, M., & Pyke, K. (2018). Plastid Development and Differentiation. *Annual Plant Reviews.* 30–59.

Welsch, R., Arango, J., Bär, C., Salazar, B., Al-Babili, S., Beltrán, J., Chavarriaga, P., Ceballos, H., Tohme, J., & Beyer, P. (2010). Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene. *The Plant cell.* 22(10):3348–3356.

Wolf, I., Kircher, S., Fejes, E., Kozma-Bognár, L., Schäfer, E., Nagy, F., Adám, E. (2011). Light-regulated nuclear import and degradation of *Arabidopsis* phytochrome-A N-terminal fragments. *Plant Cell Physiol.* 52(2):361-72.

Yang, C., Xie, F., Jiang, Y., Li, Z., Huang, X., Li, L. (2018). Phytochrome A Negatively Regulates the Shade Avoidance Response by Increasing Auxin/Indole Acetic Acid Protein Stability. *Development Cell.* 44(1):29-41.e4.

Yeh, K-C., Lagarias, C. (1998). Eukaryotic phytochromes: Light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. PNAS. 95(23):13976-13981.

Zhang, J., Xie, C., Wu, X., Du, B., Chen, S. (2001). Tobacco Two-component gene *NTHK2*. Chinese Science Bulletin. 46(1): 574-577.

Zhao, J., Yang, G., Jiang, L., Zhang, S., Miao, L., Xu, P., Chen, H., Chen, L., Mao, Z., Guo, T., Kou, S., Yang, H-Q., Wang, W. (2022). Phytochromes A and B Mediate Light Stabilization of BIN2 to Regulate Brassinosteroid Signaling and Photomorphogenesis in Arabidopsis. Frontiers in Plant Science. 13:865019.

Zhou, P., Song, M., Yang, Q., Su, L., Hou, P., Guo, L., Zheng, X., Xi, Y., Meng, F., Xiao, Y., Yang, L. and Yang, J. (2014). Both PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED1 (PAR1) and PAR2 promote seedling photomorphogenesis in multiple light signaling pathways. Plant Physiology 164:841-852.

## 8. ANEXO

Nombre vector	Vector comercial usado	Antibiótico de resistencia en <i>E. coli</i>	Antibiótico de resistencia en <i>A. tumefaciens</i>
pCR8-Phya	pCR8/GW/TOPO	Espectinomicina (100 mg/L)	-
pCR8-Phyaas	pCR8/GW/TOPO	Espectinomicina (100 mg/L)	-
pPhyA:GFP	pGWB5	-	Kanamina (100 mg/L)
pPhyA-as	pGWB2	-	Kanamina (100 mg/L)

Medio	Antibióticos		Hormonas		
	Higromicina (mg/L)	Timentin (mg/L)	* 2,4-D (mg/L)	** IBA (mg/L)	*** BAP (mg/L)
Zanahoria MI	2	300	1	-	-
Zanahoria MII	4	300	0,5	-	-
Zanahoria MIII	6	300	-	-	-
Tabaco MI	10	300	-	5	1

Tabaco MII	15	300	-	-	-
Tabaco MIII	15	300	-	-	-

\* Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, \*\*IBA: Ácido indolbutírico, \*\*\*BAP: 6-Benzylaminopurine

**Tabla III. Lista de partidores usados en esta tesis**

Nombre del partidor	Secuencia	Uso
Kana.F Kana.R	5'- TGA CTGGGCACAACAGACAATC -3' 5'- AAAGCACGAGGAAGCGGTC -3'	Amplifica 665 pb del gen de resistencia a kanamicina, usado en la genotipificación de plantas de tabaco DcPHYA
DcPHYA.F DcPHYA.R	5'- ATGTCATCTTCACGACCTGC -3' 5'- AGATTCGTGCTTACTTGCTGC -3'	Amplifica el marco de lectura abierto del gen <i>DcPHYA</i> de 3387 pb usado para el clonamiento del gen y la expresión en tabaco
DcPHYA.F2 DcPHYAq.R	5'- TGGAGCTCTTGCTCTAGGGG -3' 5'- ATGGCTTTATCCACAGGAAGACCG -3'	Amplifican un fragmento de 516 pb del gen <i>DcPHYA</i> usado para el silenciamiento en zanahoria
DcPHYAq.F DcPHYAq.R	5'- GCAGTTACAAGTGAGATGGTCAGGC -3' 5'- ATGGCTTTATCCACAGGAAGA CCG -3'	Utilizados para cuantificar los niveles de expresión relativa del gen <i>DcPHYA</i> en líneas de zanahorias silenciadas para el gen <i>DcPHYA</i> y líneas de tabaco expresoras del gen <i>DcPHYA</i>



DcPSY1q.F DcPSY1q.R	5'- ATCGGTGTGGCGAAGTTTGT -3' 5'- CAAGAGCCTTGGGCGTGATA -3'	Utilizados para cuantificar los niveles de expresión relativa del gen <i>DcPSY1</i> en líneas de zanahorias silenciadas para el gen <i>DcPHYA</i> .
DcPSY2q.F DcPSY2q.R	5'- TGGCTCAAGCAGGGCTTTCT -3' 5'- ATGCCCATACCGGCCATCTA -3'	Utilizados para cuantificar los niveles de expresión relativa del gen <i>DcPSY2</i> en líneas de zanahorias silenciadas para el gen <i>DcPHYA</i> .
DcLCYB1q.F DcLCYB1q.R	5'- TTGACCTTCCTTTGTATGACCCGTC -3' 5'- TTCTGCCTCAGAACTTGTTGTGC-3'	Utilizados para cuantificar los niveles de expresión relativa del gen <i>DcLCYB1</i> en líneas de zanahorias silenciadas para el gen <i>DcPHYA</i> .
DcLCYB2q.F DcLCYB2q.R	5'- GCTTGCGATGCTTAGCTTGTC ACT -3' 5'- CAATACCACCATTACCAACTCCC -3'	Utilizados para cuantificar los niveles de expresión relativa del gen <i>DcLCYB2</i> en líneas de zanahorias silenciadas para el gen <i>DcPHYA</i> .
DcPAR1q.F DcPAR1q.R	5'- AATGCCAAGCCCTTGAGCCAC -3' 5'- ATCCTCATCCTCATCAGCTCCAGT -3'	Utilizados para cuantificar los niveles de expresión relativa del gen <i>DcPAR1</i> en líneas de zanahorias silenciadas para el gen <i>DcPHYA</i> .
DcUbiq.F	5'- GCTCGAGGACGGCAGAAC -3'	Utilizado como gen normalizador durante la

DcUbiq.R	5'- CTTGGGCTTGGTGTAGGTCTTC -3'	cuantificación de los niveles de expresión relativa de los distintos genes evaluados en las líneas de zanahorias silenciadas para el gen <i>DcPHYA</i> .
NtPAR1-likeq.F NtPAR1-likeq.R	5'- CCAGGAGGAGAATCACTTGGTGT-3' 5'- ACCGATCGAACTGTCCCTCT-3'	Utilizados para cuantificar los niveles de expresión relativa del gen <i>NtPAR1-like</i> en líneas de tabaco expresoras de <i>DcPHYA</i> , tratadas con LRL u oscuridad.
NtPEPCKq.F NtPEPCKq.R	5'- CGAGGGTGTACCTTCCGAGAT-3' 5'- CTTCAATTTAGAAATTTGGACCGCA-3'	Utilizados para cuantificar los niveles de expresión relativa del gen <i>NtPEPCK</i> en líneas de tabaco expresoras de <i>DcPHYA</i> , tratadas con LRL u oscuridad.
NtGGPSq.F NtGGPSq.R	5'- GTATTGGGTTGTTGTTTCAAGTTGTGGAT- 3' 5'- GCAATCAATGGAGCTGCTTTGTCTGGATC - 3'	Utilizados para cuantificar los niveles de expresión relativa del gen <i>NtGGPS</i> en líneas de tabaco expresoras de <i>DcPHYA</i> , tratadas con LRL u oscuridad.
NtPSY1.F NtPSY1.R	5'- GGAACCAAGCTAATGACCCCAGAGAGA -3' 5'- GGCCGCCCACTGAAAATATCTTCC -3'	Utilizados para cuantificar los niveles de expresión relativa del gen <i>NtPSY1</i> en líneas de tabaco expresoras de <i>DcPHYA</i> ,

		tratadas con LRL u oscuridad
NtPSY2.F NtPSY2.R	5'- TCAGACATGTTGGAGAAGATGC -3' 5'- GCTTCAATCTCGTCCAATATCTTG -3'	Utilizados para cuantificar los niveles de expresión relativa del gen <i>NtPSY2</i> en líneas de tabaco expresoras de <i>DcPHYA</i> , tratadas con LRL u oscuridad
NtActinaq.F NtActinaq.R	5'- GTATGTTGCTATCCAGGCTGTGCT -3' 5'- CCGAAGAATTGCATGTGGAAGTGCAT -3'	Utilizado como gen normalizador durante la cuantificación de los niveles de expresión del gen <i>DcPHYA</i> en las líneas de tabaco expresoras de <i>DcPHYA</i> .
NtFE1q.F NtFE1q.R	5'- TGAGATGCACCACGAAGCTC -3' 5'- CCAACATTGTCACCAGGAAGTG -3'	Utilizado como gen normalizador durante la cuantificación de los niveles de expresión relativa de los distintos genes evaluados en las líneas de tabaco expresoras de <i>DcPHYA</i> tratadas con LRL u oscuridad.

**Tabla IV. Condiciones térmicas usadas con las distintas ADN polimerasas**

		<b>Shappire</b>	<b>Taq Invitrogen</b>	<b>PFU ultra II</b>	<b>Evagren</b>
<b>Paso</b>	Temperatura	Tiempo (minutos)	Tiempo (minutos)	Tiempo (minutos)	Tiempo (minutos)
<b>Denaturación inicial</b>	95°C	01:00	05:00	01:00	10:00
<b>Denaturación</b>	95°C	00:05	00:30	00:20	00:15
<b>Alineamiento</b>	Dependiendo de los partidores	00:05	00:30	00:45	00:15
<b>Elongación</b>	72°C	00:10	02:30	01:45	00:15
<b>Elongación final</b>	72°C	01:00	05:00	03:00	10:00

ID:829943	MSAGNGNATNGDGGFSFP--KGPVMPKITTGAAKRGSGVCHDDSGPTVNATTIDELHSLQ	58
ID:107805694	-----MASNGNGEFSFDSKRRSGLPKIQTKTDDDNVVCHDDSATPVKAQTLDELHSLQ *:*:* * ** : :*** * :. . . ***** . *:* * :*****	54
ID:829943	KKRSAPTPINQNAAAFAAVSEEEERQKIQLQSIASLASLSTRESGPKVVRGDPAEKKT	118
ID:107805694	KKKSAPTPIKSPHAFG-VAVSEEEERQKQLQSIASLASLSTRETGPKVVKGDPARQAE *:*:*****: . * . .***** *****:*****:****: .	113
ID:829943	GSTTPAYAHGQHHSIFSPATGAVSDSSLKFTHVLYNLSPAELYEQAIKYEKGSFITSSGA	178
ID:107805694	PKVAQSHAT--H--HHHAPTLNISDSALKFTHILYNLSPAELYEQAIKYEKGSFITSSGA . . : ::* * . * :***:*****:*****:*****:*****:*****:*****	169
ID:829943	LATLSGAKTGRAPRDKRVVRDATTEDLWVGKGSPIEMDEHTFMVNRERAVDYLSLEK	238
ID:107805694	LATLSGAKTGRSPRDKRVVRDETTEKDLWVGKGSPIEMDEHTFLINRERAVDYLSLEK *****:***** * * . :*****:*****:*****:***** *****	229
ID:829943	VFVNDQYLNWDPENRIKVRIVSARAYHSLFMHNMCI RPTQEELESFGTDPFTIYNAGQFP	298
ID:107805694	VYVNDQFLNWDPNRIKVRIVSARAYHSLFMHNMCI RPTAEELFEGTDPFTIYNAGQFP *:*:***:*****:*****:*****:***** ***** .*****:*****	289
ID:829943	CNRYTHYMTSSTSVDLNLARREMVILGTQYAGEMKGLFSVMHYLMPKRRILSLHSGCNM	358
ID:107805694	CNRYTHYMTSSTSIDVNLARREMVILGTQYAGEMKGLFSVMHYLMPKRRILSLHSGCNM *****:*****:*****:*****:*****:***** ***** *	349
ID:829943	GKGDVALFFGLSGTGKTTLSTDHNRYLIGDDEHCWTTETGVSNIEGGCYAKVDLSREKE	418
ID:107805694	GKGDVALFFGLSGTGKTTLSTDHNRYLIGDDEHCWSDHGVSNIEGGCYAKCIDLSREKE ** .*****:*****:*****:*****:*****:***** *****	409
ID:829943	PDIWNAIKFGTVLENVVFDEHTREVDYSDKSVTENTRAAYPIEFIPNAKIPCVGPHPTNV	478
ID:107805694	PDIWNAIKFGTVLENVVFEEHTREVDYADKSVTENTRAAYPIEFIPNAKIPCVGPHPKNV *****:*****:*****:*****:*****:***** ***** *	469
ID:829943	ILLACDAFGVLPVSKNLNAQTMHYHIFISGYTALVAGTEDGIKEPTATFSACFGAAFI MLH	538
ID:107805694	ILLACDAFGVLPVSKNLNAQTMHYHIFISGYTALVAGTEDGIKEPTATFSACFGAAFI MLH *****:*****:*****:*****:*****:***** *****	529
ID:829943	PTKYAAMLAEKMKSQGATGWLVTGWSSGGSYGVGNRIKLAYTRKI IDAIHSGSLKANYK	598
ID:107805694	PTKYAAMLAEKMKKHGATGWLVTGWSSGGSYGVGNRIKLAYTRKI IDAIHSGALLNANYK ***** . :***** ***** * .*****:*****:*****:***** *	589
ID:829943	KTEIFGFEIPTEIEGIPSEILDVNSWSDKKAHKDTLVKLGGLFKNFVFNHFKIGVDG	658
ID:107805694	KTEVFGLEIPTEIEGIPSEILDVNSWSDKKAHKDTLVKLGGLFKNFVFNHFKIGVDG ***:*. :*****:*. :*****:*. :*****:*****:*****:*. :***:*	649
ID:829943	KLTEEILAAGPIF 671	
ID:107805694	NLTEEILAAGPNF 662 :***** *	

**Figura 1. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína PEPCK.** Ambas secuencias fueron extraídas de la plataforma de NCBI. Para tabaco, el gene ID es 107805694, mientras que para Arabidopsis el gene ID es 829943. Se realizó un análisis de alineamiento múltiple usando la plataforma de Clustal Omega. Se determinó que ambas secuencias comparten un 83,48% de identidad de secuencia aminoacídica.

ID:820043	MAATSTAAAASSIMGTRVVS DISSNSSRFTARFGFGTKKASP KKA-KTVISDRPLWFFGA	59
ID:107798677	---MATAAATSSFIGTRL-PEIHSGAGRVQARFGFGTKKAAPK KAPKRQIPDRPLWFFGA	56
	:****:***:***: :* *.:.*. *****:**** * * *****	
ID:820043	KSPEYLDGSLVGDYGFDFPGLGKPAEYLQFDLDSLQNLAKNLYGEVIGTRTEAVDPKST	119
ID:107798677	KAPEYLDGSLVGDYGFDFPGLGKPAEYLQFDLDSLQNLAKNLAGDVIGTRTEAVDPKST	116
	*:*****:***** *.:***** **	
ID:820043	PFQPYSEVFG LQRFRECELIHGRWAMLATLGAITVEWLTGVTWQDAGKVELVDGSSYLGQ	179
ID:107798677	PFQPYSEVFG LQRFRECELIHGRWAMLATLGALTVEWLTGITWQDAGKVELVEGSSYLGQ	176
	*****:*****:*****:*****	
ID:820043	PLPFSISTLIWIEVLVVG YIEFQRNAELDSEKRLYPGGKFFDPLGLASDPEKKAQLQLAE	239
ID:107798677	PLPFSITTLIWIEVLVIG YIEFQRNAELDPEKRLYPGGSFFDPLGLAADPEKKATLQLAE	236
	*****:*****:***** *****.*****:*****:***** *****	
ID:820043	IKHARLAMVGF LGFVQAAATGKGPLNNWATHLS DPLHTTIIDTFSSS- 287	
ID:107798677	IKHARLAMVAF LGFVQAAATGKGPLNNWATHLS DPLHTTIFDTFGFFS 285	
	*****.*****:*****:*****:*****:*****	

**Figura 2. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína LCHB.** Ambas secuencias fueron extraídas de la plataforma de NCBI. Para tabaco, el gene ID es 107798677, mientras que para Arabidopsis el gene ID es 820043. Se realizó un análisis de alineamiento múltiple usando la plataforma de Clustal Omega. Se determinó que ambas secuencias comparten un 87.28% de identidad de secuencia aminoacídica.

ID:818887	MEETLATPDATRRSLSPSCSATVKS-----RAAGFERRTKRLSE-	40
ID:107765527	-----MESSCNSEETTTT VATLSRKDQKMTQKNSKRQKRMNNVKKVLKES	46
	:. **.: .: * :....*: *.*	
ID:818887	---TNASVREDREEAE EEEDEVKEKIEALQRIIPGGAALGVDALFEETAGYILSLQCQIK	97
ID:107765527	SSNCNTDNAGNNQEEDDDKAEVEEKIMALQKIVPGGESLGVDMLFEETAGYILALQCQIK	106
	*.: .:.* :::: **:** ***:** *:* ***:** *:* ***:**	
ID:818887	TIKVLT SFLQRIDQEDMKFGG 118	
ID:107765527	TLKVLAS FVEGSEKERMKLGG 127	
	*:***:***: :.* **:*	

**Figura 3. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína PAR1.** Ambas secuencias fueron extraídas de la plataforma de NCBI. Para tabaco, el gene ID es 107765527, mientras que para Arabidopsis el gene ID es 818887. Se realizó un análisis de alineamiento múltiple usando la plataforma de Clustal Omega. Se determinó que ambas secuencias comparten un 87.28% de identidad de secuencia aminoacídica.

ID:829834	MAS-VTLGSWIVVH--HHNHHHPSSILTKSRSRSCPITLTKPISFRSKRTVSSSSSIVSS	57
ID:109210081	MRSMLVDSWAGQVCSVFNQTLPNKTF----TGFMKIPVKNPSFLKQKRPFFAL---SVS * * :.** .*: *.. : : * :.* :.:** . : *	53
ID:829834	SVVTK-EDNL--RQSEPFSSDFMSYIITKAELVNKALDSAVPLREPLKIHEAMRYSLLAG	114
ID:109210081	AIATKQDDKVKEAETQKEQFNFKTYVAEKAISVNKALDEAVIVKDPPIHEAMRYSLLAG :.** :*:: ::: ..*: * : * ** *.* ** :::* *****	113
ID:829834	GKRVRPVLCIAACELVGGEESTAMPAACAVEMIHTMSLIHDDLPCMDNDDLRRGKPTNHK	174
ID:109210081	GKRVRPMLCLAACELVGGDQSNAMPAACAVEMIHTMSLIHDDLPCMDNDDLRRGKPTNHK *****:*.*****:.*.*****	173
ID:829834	VFGEDVAVLAGDALLSFAFEHLASATSSDVSPVRVVRVAVGELAKAIGTEGLVAGQVVDI	234
ID:109210081	VYGEDVAVLAGDSSLAFEFIFIATAT--AGVSPSRILAAIGELAKSIGTEGLVAGQVADI *:*****:*.*****.:*:* ** *:: * :*****.*****. **	231
ID:829834	SSEGLDLNDVBLEHLEFIHLHKTAALLEASAVLGAIVGGGSDEIERLRKFARCIGLLFQ	294
ID:109210081	ACTGN--PNVGLDTLEFIHMHKTAALLEASVVLGAILGGGTDEEVEKLRRFARCIGLLFQ :. * :***: *****:*****.*****:***:*:*:*:*****	289
ID:829834	VVDDILDVTKSSKELGKTAGKDLIADKLTYPKIMGLEKSREFAEKLNRDARDQLLGFSD	354
ID:109210081	VVDDILDVTKSSEELGKTAGKDLVVDKTTYPKLLGLEKAKEFAELNRDAKQQLADFDPY *****:*****:.* *****:***:*** :**:*:***. **	349
ID:829834	KVAPLLALANYIAYRQN	371
ID:109210081	KAAPLIALADYIAYREN	366
	*.***:***:*****:*	

**Figura 4. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína GGPS.** Ambas secuencias fueron extraídas de la plataforma de NCBI. Para tabaco, el gene ID es 109210081, mientras que para Arabidopsis el gene ID es 829834. Se realizó un análisis de alineamiento múltiple usando la plataforma de Clustal Omega. Se determinó que ambas secuencias comparten un 65.56% de identidad de secuencia aminoacídica.