

UCH - FC  
Biotecnología  
0152  
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**DESARROLLO DE HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DEL GEN LICOPENO  $\beta$ -CICLASA 2 (LCYB2) DE *DAUCUS CAROTA* (ZANAHORIA).**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

**Nallatt Samira Ocaez Mancilla**



Directora de Seminario de Título: Dra. Claudia Stange Klein

Diciembre, 2010  
Santiago - Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta.:

**NALLATT SAMIRA OCAREZ MANCILLA**

**“DESARROLLO DE HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DEL GEN LICOPENO  $\beta$ -CICLASA 2 (LCYB2) DE D.CAROTA (ZANAHORIA)”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en biotecnología molecular.

*Dra. Claudia Stange*  
**Directora Seminario de Título**

*Dr. Michael Handford*  
**Co-Director**

### Comisión de Evaluación

*Dr. Francisco Chávez*  
**Presidente Comisión**

*Dra. Lorena Norambuena*  
**Correctora**



Santiago de Chile, Diciembre del 2010

## BIOGRAFÍA



Mi nombre es Nallatt Samira OCAREZ MANCILLA, nací el 21 de Diciembre de 1985, al comienzo del verano, en la ciudad de Iquique, lugar de hermosas playas, cielo despejado y agradable clima.

Tuve una infancia feliz gracias a mis padres y abuelos, quienes siempre me apoyaron y estuvieron conmigo cuando lo necesité. Su participación en mi proceso de formación fue fundamental, ya que me enseñaron y entregaron los valores necesarios para enfrentar la vida.

El primer encuentro que tuve con la educación, fue en el Jardín Infantil Talpiot, ingresé muy pequeña al nivel medio mayor, ahí obtuve mis primeros aprendizajes. Lugar que aún recuerdo con mucho cariño por los gratos momentos que ahí viví.

La mayor parte de mi educación básica y media, transcurrió en el Liceo Academia Iquique, con un paso fugaz por la ciudad de Santiago, en donde cursé tercero básico en el colegio San Nicolás en la comuna de Independencia. Sin embargo, fue en la ciudad de Iquique donde adquirí los mayores aprendizajes que hasta el día de hoy conservo y aplico. De la institución educativa, Academia Iquique, destaco la excelencia de sus docentes del área científica, responsables de mi interés por esta área.

Elegí la Universidad de Chile como mi casa de estudio de educación superior, por lo que representa en la sociedad educacional y su prestigio en el área científica, por esto y como primer desafío, tuve que dejar mi ciudad natal para iniciar mi proyecto formativo en esta área de la ciencia. Escogí la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, porque en un principio me parecía muy interesante y novedosa, y aunque pasé por muchas etapas de inseguridad y de incertidumbre acerca de mi futuro laboral, hoy me encuentro a gusto en lo que elegí y felizmente trabajando en un lugar donde he podido poner en práctica todos los conocimientos entregados por mis docentes, que son la base de mi formación que hoy concluye en esta etapa.



A mis padres, abuelos y hermana

No te rindas que la vida es eso,  
Continuar el viaje,  
Perseguir tus sueños,  
Destrobar el tiempo,  
Correr los escombros.  
Y destapar el cielo.

**Mario Benedetti.**



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al laboratorio de Biología Molecular Vegetal y en especial al team CSK por acogerme muy bien desde el primer día que llegué a preguntar si podía hacer mi Unidad de investigación en este laboratorio. Porque si bien no es un laboratorio que tenga muchos recursos, lo que más tiene son muchos corazones y personas que hacen del trabajo diario algo divertido. Agradezco a la profe Claudia por todo lo que me enseñó y porque siempre me ha tratado con mucho cariño. Además le doy las gracias a mis compañeritos de laboratorio porque finalmente es de ellos y con ellos con quienes más se aprende. Entre ellos destaco a la Lore, Charlie, Pau y Mandujano, de los que aprendí mucho y con los que recuerdo haber hecho mi primer PCR, gel de agarosa, miniprep, digestión, qRT entre otras cosas.

A todas las personas lindas del lab, quienes se ganaron un pedacito de mi corazón. En especial a la Lore que resultó ser una mamona en cubierto, una excelente amiga, regalona, tierna y cariñosa, en quien confío ciegamente y es sin duda una de mis amigas más queridas. A la Yu por ser una super-mujer, por todos los momentos mamones que pasamos juntas, por tantas cosas ricas que cocinamos y comimos y por lo mucho que me regaló cuando más lo necesitaba. A la Pau, porque admiro su fortaleza e inteligencia, porque me hace reír y porque quiere mucho a mi mamita =). A Juank por su alegría de vivir, su ánimo, su energía y por musicalizar mis días de trabajo. A Charlie, por la paz que transmite, por su buen humor y porque siempre tuvo la voluntad de ayudarme cuando se lo pedí. A Mandujano, porque me encanta su personalidad, inteligencia y humor negro y porque me presentó la "deliciosa". A Guille, porque me encanta su forma de ver la vida, feliz, libre y sin restricciones. A Carlitos R. por su ternura y por los miles de abrazos que me ha dado. A Carlitos S. porque siempre fue muy amable conmigo y porque me regaló un chocolate en uno de mis cumpleaños. Al Dieguito por ser lindo, atento y dulce y porque me conquistó con muchas pizzas. A la Francita porque con ella tengo una conexión del más allá y porque me inició en las clases particulares y me hice millonaria. A Darío porque es un buen hombre y cada vez que nos vemos podemos conversar como si fuéramos grandes amigos. A la Romy, porque es una loquita a la que quiero mucho y porque la hemos pasado muy bien juntas. Finalmente, al Sebita, porque sin él el laboratorio no funcionaría, porque trabaja como chino pero siempre con una gran sonrisa y porque siempre que lo necesité me ayudó.

A mis amigos de la vida. A la Fabiolita con la que pasé felices momentos en la infancia y adolescencia y con la que reí hasta las lágrimas. A mi amiguito Germán por los casi 20 años de una amistad, que estoy segura perdurará por siempre. A la Barbarita, que me hace tanto reír, con la que he pasado lindos momentos y con la que tengo una amistad que revive cada vez que nos vemos. A la shimi, mijiji o val, porque hemos estado juntas en muchos momentos de penas y alegrías, porque nuestros destinos se cruzan una y otra vez, porque admiro su fortaleza y la quiero mucho. A mi Patito porque desde pequeñito ha sido un caballero, un hombre dulce, atento y regalón y lo quiero mucho. Y dentro de este grupo no puedo dejar fuera a los chinitos y a la Lady con los que compartí lindos momentos en el colegio y con los que hacíamos un excelente equipo de estudio, lo que finalmente nos llevó a todos a la Universidad.

A todas las lindas personas que conocí durante los años de Universidad y en Santiago. A la Carito López, de la que fui amiga durante la infancia, pero cuya amistad se retomó con más fuerza estos últimos años en Santiago, muchas gracias por todas esas idas al cine y salidas improvisadas en los momentos precisos. A la Carito Figueroa, por la compañía y el cariño que me entregó durante los primeros años de U y por su humor negro que hasta hoy me hace tanto reír. A la Pame, porque siempre me ha entregado una visión positiva de la vida y por esa alegría sandunguera que tiene. Al Matías con el que viví muchos lindos momentos y a quien siempre recordaré con mucho cariño. A mi Nelly, mi brujita buena favorita, muchas gracias por apoyarme cuando más lo necesité, por el cariño inmenso, por los consejos y por los mejores abrazos de



oso. A mi Nancy linda, por ser una amiga fiel, por estar en las buenas y en las malas, por todo el cariño que me ha entregado y por todos esos momentos de máxima felicidad que hemos pasado juntas. A Nilo, por todo el apoyo, ayuda y cariño que me ha dado, porque es capaz de hacerme reír incluso cuando estoy más triste y porque lo admiro y quiero mucho.

Agradezco sobre todo a mi familia, por todo el amor que siempre me han brindado y porque siempre han creído en mí. En especial a mi mamita hermosa, por su inmensa entrega de amor, por los lindos recuerdos de mi niñez, por ser además de mi madre mi amiga. A mi papito por ser siempre un apoyo y por estar en todos los momentos en que lo he necesitado. A mi tatita y Oquita, por ser como mis segundos padres, pero aún mejores!!, porque en su casa siempre me he sentido segura y feliz y porque los amo mucho. A mis abuelitos paternos, sobre todo a mi Cholita la abuelita más tierna y cariñosa, que hoy es un angelito que me cuida desde el cielo. Y a mi hermanita, por ser mi compañera de juegos, de penas y alegrías. Por ser mi mejor amiga, mi compañía y mi apoyo para toda la vida, te amo amor chiquito, pequeñita cachipurri!



## INDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Los carotenoides: estructura, función y biosíntesis.....	1
1.2 Regulación de la vía carotenogénica.....	5
1.3 La zanahoria ( <i>Daucus carota</i> ) como modelo de estudio.....	8
1.4 Importancia del gen <i>lcyb</i> en la biosíntesis de carotenoides y los genes <i>lcyb</i> de <i>D. carota</i> .....	10
1.5 Estrategia desarrollada.....	14
1.6 Objetivos.....	16
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y MEDIOS DE CULTIVO.....	17
2.2 REACTIVOS Y EQUIPOS UTILIZADOS.....	17
2.3 MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	18
2.3.1 Extracción de RNA total desde el tejido vegetal.....	18
2.3.2 Cuantificación y evaluación de la integridad y calidad del RNA obtenido.....	18
2.3.3 Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	19
2.3.3.1 Transcripción Reversa, síntesis de cDNA.....	19
2.3.3.2 Evaluación de la integridad del cDNA sintetizado y amplificación de un fragmento del gen <i>lcyb2</i> mediante PCR.....	20
2.3.3.3 Visualización de los amplificados obtenidos de las reacciones de PCR.....	21
2.3.4 PCR de colonias de <i>E.coli</i> y <i>A.tumefaciens</i> para la selección de los clones positivos.....	21
2.3.5 Purificación del DNA plasmidial de <i>E.coli</i> .....	22
2.3.6 Digestión con enzimas de restricción para la selección de los clones positivos.....	22
2.3.7 Purificación del DNA desde geles de agarosa.....	23
2.3.8 RT-PCR para confirmar las plantas transgénicas.....	24
2.3.9 RT-PCR cuantitativo.....	25
2.3.9.1 Diseño y prueba de partidores específicos para el RT-PCR cuantitativo.....	25
2.3.9.2 Ensayos de RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR).....	27
2.3.9.3 Análisis de los datos del RT-PCR cuantitativo.....	28
2.3.9.4 Análisis estadístico.....	30
2.4 CONSTRUCCIONES GENÉTICAS.....	30
2.4.1 Tecnología Gateway®.....	30
2.4.2 Generación del vector pMDC32/AS- <i>lcyb2</i> para el silenciamiento génico post-transcripcional del gen <i>lcyb2</i> .....	32
2.4.2.1 Diseño de los partidores para amplificar un fragmento conservado de <i>lcyb2</i> de <i>D. carota</i> .....	32
2.4.2.2 Clonación del fragmento del gen <i>lcyb2</i> en el vector de entrada pCR8®.....	33
2.4.2.3 Obtención del vector pMDC32/AS- <i>lcyb2</i> .....	34
2.4.2.4 Evaluación de la funcionalidad del vector pMDC32/AS- <i>lcyb2</i> en <i>N. tabacum</i> .....	35
2.5 CULTIVO Y MATERIAL BIOLÓGICO.....	35



2.5.1 Cultivo de <i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	35
2.5.2. Transformación de <i>E.coli</i> competentes.....	35
2.5.3 Transformación de <i>A.tumefaciens</i> competentes.....	36
2.5.4 Transformación transitoria de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	37
2.5.5 Transformación estable de <i>Daucus carota</i> .....	38
2.5.6 Construcción de la curva de resistencia al antibiótico higromicina, para <i>D. carota</i> ..39	
2.5.7 Cultivo de <i>Daucus carota</i> en medio hidropónico.....	40
3. RESULTADOS.....	41
3.1 Cuantificación de los transcritos de los genes carotenogénicos <i>lcyb1</i> y <i>lcyb2</i> en las hojas y la raíz modificada de <i>D. carota</i> .....	41
3.2 Construcción del vector pMDC32/AS- <i>lcyb2</i> .....	44
3.2.1 Clonación de un fragmento de <i>lcyb2</i> en el vector de entrada pCR8® .....	44
3.2.2 Análisis de la construcción pCR8/ <i>lcyb2</i> .....	46
3.2.3 Recombinación con el vector pMDC32/AS- <i>lcyb2</i> .....	49
3.2.4 Análisis de la construcción pMDC32/AS- <i>lcyb2</i> .....	50
3.3 Evaluación de la funcionalidad de la construcción pMDC32/AS- <i>lcyb2</i> .....	53
3.4 Obtención de las plantas transgénicas de <i>D.carota</i> que poseen las construcciones para el silenciamiento de los genes <i>lcyb1</i> y <i>lcyb2</i> .....	55
3.4.1 Establecimiento de la curva de resistencia a higromicina en <i>D. carota</i> .....	55
3.4.2 Transformación estable de <i>D.carota</i> silvestre y de una línea transgénica silenciada para el gen <i>lcyb1</i> .....	57
3.4.3 Análisis molecular de las líneas transgénicas de <i>D.carota</i> con la construcción pMDC32/AS- <i>lcyb2</i> y PBIN19/AS- <i>lcyb1</i> .....	59
4. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES.....	63
5. CONCLUSIONES .....	72
6. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA .....	73
7. REFERENCIAS .....	73

#### INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencia de los partidores utilizados.....	26
Tabla 2: Vectores utilizados en este seminario de título.....	32

#### INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ruta de síntesis de los carotenoides en las plantas.....	4
Figura 2: Árbol filogenético de los genes <i>lcyb</i> .....	13
Figura 3: Esquema del mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional.....	15
Figura 4: Esquema de la recombinación LR del sistema Gateway®.....	31





Figura 5: Esquema de la región del gen <i>lcyb2</i> utilizada para el silenciamiento génico.....	33
Figura 6: Cultivo de zanahorias en medio hidropónico.....	41
Figura 7: Plantas de <i>D.carota</i> variedad Nantes de 4 y 12 semanas de desarrollo cultivadas en medio hidropónico.....	42
Figura 8: RT-PCR del gen <i>18S</i> para probar la calidad del cDNA sintetizado a partir del RNA de las zanahorias de 4 y 12 semanas. ....	43
Figura 9: Niveles de mRNA de <i>lcyb1</i> y <i>lcyb2</i> en las hojas versus las raíces de <i>D. carota</i> . ....	44
Figura 10: Esquema de la clonación del fragmento del gen <i>lcyb2</i> en el vector pCR8/GW/TOPO. ....	46
Figura 11: PCR de colonias de <i>E.coli</i> transformadas con el vector pCR8/ <i>lcyb2</i> . ....	47
Figura 12: Digestión doble del vector pCR8/ <i>lcyb2</i> con las enzimas <i>HpaI</i> y <i>NcoI</i> . ....	48
Figura 13: Esquema de la recombinación del vector de entrada PCR8-9 con el vector de destinación pMDC32, para generar el vector pMDC32/AS- <i>lcyb2</i> . ....	49
Figura 14: PCR y análisis de restricción de los clones pMDC32/AS- <i>lcyb2</i> . ....	51
Figura 15: Análisis de la secuencia del vector pMDC32/AS- <i>lcyb2</i> del clon MC2. ....	52
Figura 16: Análisis de expresión mediante RT-PCR de los genes <i>lcyb2</i> y <i>18S</i> en las hojas de tabaco transformadas transitoriamente con la construcción pMDC32/AS- <i>lcyb2</i> mediante RT-PCR. ....	55
Figura 17: Curva de resistencia a higromicina para plantas de zanahorias silvestres. ....	56
Figura 18: Efecto del antibiótico higromicina en el desarrollo de plántulas de zanahorias silvestres. ....	56
Figura 19: Embriogénesis somática de la transformación de <i>D. carota</i> silvestre y de la línea transgénica silenciada para <i>lcyb1</i> con los vectores binarios pMDC32 y pMDC32/AS- <i>lcyb2</i> . ....	58
Figura 20: Fenotipo de las líneas transformantes de <i>D.carota</i> . ....	59
Figura 21: Análisis de la expresión de los genes <i>18S</i> , <i>hpt</i> y <i>nptII</i> en las hojas de las zanahorias transformadas con la construcción pMDC32/AS- <i>lcyb2</i> y pMDC32 mediante RT-PCR. ....	61
Figura 22. Nivel de mRNA de <i>lcyb2</i> en las hojas de las líneas de las zanahorias transformadas. ....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	: ácido abscísico
ANOVA	: análisis de varianza
AS	: antisentido
C	: carbono
C-	: control negativo
C+	: control positivo
CaMV	: virus del mosaico de la coliflor
C $\beta$ Hx	: $\beta$ -caroteno hidroxilasa
CCS	: capsantina capsorrubina sintasa
cDNA	: DNA complementario
CDS	: región codificante
C $\epsilon$ Hx	: caroteno $\epsilon$ -hidroxilasa
Ct	: ciclo umbral
DEPC	: dietilpirocarbonato
DMAPP	: dimetilalil pirofosfato
DNA	: ácido desorribonucleico
dNTPs	: desoxirribonucleótidos trifosfato
DOXP	: 1-deoxy-D-xylulose-5-fosfato
dsRNA	: RNA de doble hebra
EDTA	: ácido etilendiaminotetracético
GA	: giberelina
GGPP	: geranilgeranil pirofosfato
GGPS	: geranilgeranil pirofosfato sintasa
HPLC	: cromatografía líquida de alta resolución
IPI	: isopentenil pirofosfato isomerasa

IPP	: isopentenil pirofosfato
LCYB	: licopeno $\beta$ ciclasa
LCYE	: licopeno $\epsilon$ ciclasa
LHC	: complejos captadores de luz
MOPS	: ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
mRNA	: RNA mensajero
MVA	: ácido mevalónico
Nos	: nopalina sintasa
NTR	: región no traducible
Pb	: pares de base
PCR	: reacción en cadena de la polimerasa
PDS	: fitoeno desaturasa
PM	: marcador de peso molecular
PSY	: fitoeno sintasa
RdRp	: RNA polimerasa dependiente de RNA
RNA	: ácido ribonucleico
RNAi	: RNA interferente
ROS	: especies reactivas del oxígeno
RT	: transcripción reversa
S/D	: sin digerir
SGPT	: silenciamiento génico post-transcripcional
siRNA	: RNA interferente pequeño
S/RT	: sin transcripción reversa
T <sub>m</sub>	: temperatura de desnaturación térmica
VDE	: violaxantina de-epoxidasa
ZDS	: $\zeta$ -caroteno desaturasa
ZEP	: zeaxantina epoxidasa

## RESUMEN

Los carotenoides son pigmentos sintetizados por las plantas, las algas, algunos hongos y las bacterias. Estos cumplen funciones importantes tanto en las plantas como en los animales. La zanahoria (*Daucus carota*), nuestro modelo de estudio, acumula altos niveles de  $\beta$ -caroteno tanto en las hojas como en la raíz modificada. Este pigmento es precursor de la vitamina A o retinol, que es importante para la visión y el crecimiento óseo.

En la zanahoria, se han reportado dos genes (*lcyb1* [GeneBank: DQ192190] y *lcyb2* o *ccs* [GeneBank: DQ192191]) que codificarían para las enzimas licopeno  $\beta$  ciclasa, involucradas en la ciclación del licopeno para producir  $\beta$ -caroteno. En otros modelos también se han reportado dos genes *lcyb*, con la expresión de cada gen asociada a un órgano en particular (hojas, frutos o flores). En este seminario de título se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para determinar la expresión de *lcyb1* y *lcyb2* en las hojas y la raíz modificada de zanahoria y la tecnología Gateway® para generar un vector (pMDC32/AS-*lcyb2*) que gatille el silenciamiento génico postranscripcional de *lcyb2* en las plantas de zanahoria silvestres y transgénicas (silenciadas para *lcyb1*), para determinar así la función de *lcyb2* en *D. carota*. Se observó que los genes *lcyb* de *D. carota* presentan una expresión diferencial en las hojas y en la raíz modificada, *lcyb1* se expresa preferentemente en las hojas jóvenes y adultas y *lcyb2* en la raíz modificada de las plantas adultas. Por otra parte, se demostró la funcionalidad de la construcción pMDC32/AS-*lcyb2* mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco y se generaron líneas transgénicas de zanahoria transformadas establemente con esta construcción que previamente habían sido silenciadas para *lcyb1*. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real se determinó que estas líneas presentan reducido los niveles de mensajero de *lcyb2* en sus hojas y un fenotipo caracterizado por un tamaño reducido, clorosis en las hojas y baja viabilidad, lo que podría estar asociado a una alteración en la ruta de la síntesis de los carotenoides en estas plantas. Estos resultados sugieren que en estas plantas está operando el silenciamiento génico postranscripcional de *lcyb2* como se esperaba y que *lcyb2* sería requerido para la síntesis de los carotenoides en *D. carota*. Como proyecciones

se encuentran generar líneas simples silenciadas para *lcyb2* y más líneas dobles silenciadas para *lcyb1* y *lcyb2*. En estas plantas se analizará el nivel de acumulación del mensajero de *lcyb2* y de otros genes carotenogénicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y el contenido y la composición de los carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución, para determinar si tienen alguna alteración en la ruta de biosíntesis de carotenoides.

Este trabajo permitió comenzar el estudio del gen *lcyb2* y su participación en la ruta de biosíntesis de los carotenoides y sus posibles regulaciones órgano-específicas en *D. carota*. En un futuro los conocimientos adquiridos permitirán dirigir la investigación hacia puntos claves de regulación de esta ruta, para llegar a realizar mejoramientos genéticos en la zanahoria y en otros modelos que poseen interesantes características comerciales, nutricionales y fisiológicas.

#### ABSTRACT

Carotenoids are pigments synthesized by plants, algae, some fungi and bacteria. They have important roles in both plants and animals. The carrot (*Daucus carota*), our model of study, accumulate high levels of  $\beta$ -carotene in both leaves and in the modified root. This carotenoid is the main precursor of vitamin A or retinol, which is needed for vision and bone growth.

In carrot, two genes have been reported (*lcyb1* [GeneBank: DQ192190] and *lcyb2* or *ccs* [GeneBank: DQ192191]) that could encode for enzymes with lycopene  $\beta$  cyclase activity, which is involved in the cyclization of lycopene to produce  $\beta$ -carotene. In other models, two *lcyb* genes have also been reported, in which their expression is associated with a particular organ (leaves, fruits or flowers). In this work we use real time polymerase chain reaction to determine the expression of *lcyb1* and *lcyb2* in leaves and modified roots of carrot and the Gateway® technology to generate a vector (pMDC32/AS-*lcyb2*) to trigger posttranscriptional gene silencing of *lcyb2* in wildtype and transgenic (that is *lcyb1* silenced) carrots, to determine the role of *lcyb2* in *D. carota*. It was determined that the *lcyb* genes of *D. carota* are differentially expressed in leaves and modified root, *lcyb1* is preferentially expressed in adult and young leaves while *lcyb2* is expressed preferentially in the modified root of adult plants. Moreover, we demonstrated the functionality of the pMDC32/AS-*lcyb2* construction by transient transformation of tobacco leaves

and generated stable transformed carrot lines with this construction, carrots that were previously silenced for *lcyb1*. By means of real time polymerase chain reaction we determined that these lines have reduced levels of *lcyb2* transcripts in their leaves and a phenotype characterized by a small size, chlorosis in leaves and low viability, which could be associated with an alteration in the carotenoid biosynthetic pathway in these plants. These results suggest that in these plants the post-transcriptional gene silencing of *lcyb2* was activated as expected and that *lcyb2* would be required for the synthesis of carotenoids in *D. carota*. Projections of this research are to generate more transgenic silenced lines only for *lcyb2* and more double silenced lines for *lcyb1* and *lcyb2*. In these plants, the accumulation of *lcyb2* transcripts and other carotenogenic genes by real time polymerase chain reaction will be analyzed, as well as the content and composition of carotenoids by means of high-performance liquid chromatography, to determine if the *lcyb2* and the double silenced plants have alterations in the carotenoids biosynthetic pathway.

This work permitted the beginning of the study of the *lcyb2* gene to determine its participation in the biosynthetic pathway of carotenoids and potential organ-specific regulation in *D. carota*. In the future, the knowledge gained will allow us to direct the investigation towards key points of regulation of this pathway, and to make genetic improvements in carrots and other models that have interesting commercial, nutritional and physiological characteristics.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Los carotenoides: estructura, función y biosíntesis.

Los carotenoides reciben su nombre por ser los principales pigmentos presentes en la raíz de las zanahorias, *D. carota* (Zeb y Mehmood, 2004). Son compuestos liposolubles derivados del isopreno sintetizados *de novo* por los organismos fotosintéticos como las plantas, las algas y las bacterias y también por algunos hongos y bacterias no fotosintéticos (Hirschberg y col., 1997). Su estructura básica es un tetraterpeno simétrico y lineal de 40C, llamado fitoeno, formado a partir de 8 unidades de isopreno. Los carotenoides hidrocarbonados se llaman carotenos y los que además en su estructura contienen oxígeno se llaman xantófilas. Ambos, pueden ser acíclicos, monocíclicos o bicíclicos y la ciclación puede ocurrir en uno o ambos extremos de la molécula formando anillos  $\beta$ - o anillos  $\epsilon$ - (Fraser y Bramley, 2004). El rasgo característico de los carotenoides es su cadena poliénica (sistema extenso de dobles enlaces conjugados), que actúa como cromóforo (Britton, 1995).

Los carotenoides cumplen roles esenciales tanto en las plantas como en los animales. En las plantas, regulan las propiedades físicas de las membranas celulares vegetales, de forma similar a como lo hace el colesterol en las membranas animales (Gruszecki y Strzalka, 2005). Se encuentran preferentemente en la membrana interna de los plastidios, en los cloroplastos se acumulan en la grana y en el centro de reacción del fotosistema II asociado a los complejos captadores de luz (Light harvesting complex, LHC) junto con la clorofila a y b (Demming-Adams y col., 1996), donde actúan como pigmentos accesorios de la fotosíntesis que absorben en las longitudes de onda entre 400 y 500 nm (Britton, 1995). También actúan en la disipación térmica del exceso de energía lumínica y generan un alto nivel de protección foto-oxidativa contra los efectos del singlete del oxígeno, el radical superóxido y del triplete excitado de la clorofila generado en los centros de reacción del fotosistema II producto de la fotosíntesis (Armstrong y Hearts, 1996; Cunningham y Gantt, 1998; Telfer, 2005). Los carotenoides se acumulan en los

cromoplastos presentes en los frutos, pétalos de las flores y algunas raíces, otorgándoles intensos colores (amarillos, naranjos y rojos) y atrayendo a los agentes polinizadores y dispersores de las semillas (Naik y col, 2003; Corona y col, 1996; Masaya y col, 2004; Bramley, 2002; Bartley y Scolnik 1995). Además, estos pigmentos son precursores en la síntesis de la hormona ácido abscísico (ABA), que participa en procesos vitales para la fisiología vegetal, como el crecimiento vegetativo y la senescencia, la adaptación a la sequía y salinidad y en muchos procesos del desarrollo como la maduración, la latencia y la germinación de las semillas (Chen y col., 2008; Zeevaart y Creelman, 1988; Mauch-Mani, 2005). También, son precursores de diversos compuestos volátiles importantes para el aroma de las flores y los frutos (Bouvier y col., 2003; Lewinsohn y col., 2005).

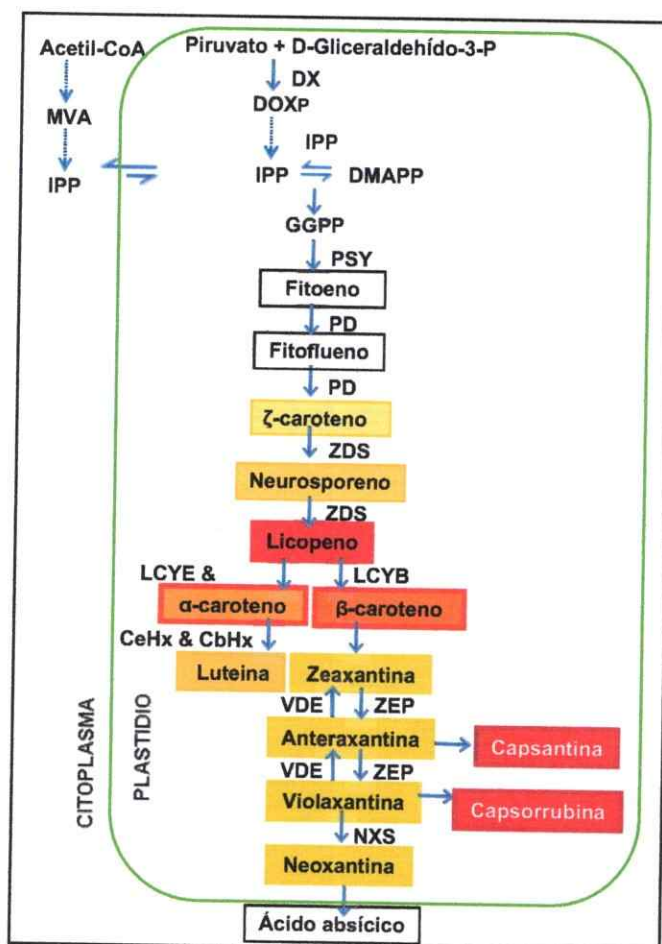
En los animales y humanos los carotenoides también cumplen importantes funciones, pero son incapaces de sintetizarlos y los obtienen de la dieta. Son precursores de los retinoides como el retinal (principal pigmento visual), el retinol (vitamina A) y el ácido retínico (sustancia que controla la morfogénesis) (Naik y col., 2003). El  $\beta$ -caroteno es el principal precursor de la vitamina A, cuya deficiencia conduce a xerofalmia, ceguera y muerte prematura (Bramley, 2002). Son potentes antioxidantes, propiedad que se debe básicamente a sus enlaces conjugados, que les permiten absorber el exceso de energía de otras moléculas y liberarla en forma de calor. Así, protegen a las células y tejidos de los efectos dañinos de los radicales libres de moléculas lipídicas y proteicas y de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Britton, 1995; Nelson y col., 2003). La ingesta de carotenoides puede contrarrestar enfermedades asociadas al daño oxidativo en humanos tales como el cáncer (Breimer, 1990; Tanaka y col., 1995; Nishino, 1998; Jyonouchiy y col, 2000), las enfermedades coronarias (Mayne, 1996) y los procesos degenerativos en la mácula (Snodderly, 1995; Handelman, 2001).

En las plantas la síntesis de los carotenoides ocurre en los plastidios (Figura 1). Comienza con la formación del isopentenil pirofosfato (IPP, molécula de 5C) que puede ser generado a través de dos rutas; una citosólica, la ruta del ácido mevalónico (MVA) y una



plastidial, la ruta del 1-deoxy-D-xylulose-5-fosfato (DOXP) también llamada vía independiente del MVA. La ruta del MVA utiliza como precursor al acetil-CoA y tiene al mevalonato como primer intermediario para generar al IPP, responsable de la formación de los esteroides, sesquiterpenoides y triterpenoides en el citosol (Bramley, 2002). La ruta independiente del MVA utiliza como precursor al DOXP sintetizado por la condensación del gliceraldehído-3 fosfato con el piruvato y conduce a la formación de isoprenoides plastidiales como los carotenoides, entre otros (Lichtenthaler y col, 1997; Schwender y col, 1997; Bramley, 2002). Aunque estas rutas son independientes existe una cooperación entre ellas, dada por la transferencia de IPP entre el citosol y el plastidio (Lauie y col, 2003). Luego, la molécula de IPP isomeriza a dimetilalil pirofosfato (DMAPP) por acción de la IPP isomerasa (IPI) y 3 moléculas de IPP son condensadas con 1 molécula de DMAPP por la geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPS) para generar el geranylgeranyl pirofosfato (GGPP, molécula de 20C). Por una unión "cola-cola" de 2 moléculas de GGPP, catalizada por la fitoeno sintasa (PSY), se sintetiza el fitoeno (40C). Este sufre cuatro desaturaciones antes de convertirse en licopeno, pasando por fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno y neurosporeno. Las dos primeras desaturaciones las realiza la fitoeno desaturasa (PDS) y las dos últimas la  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS). Luego, el licopeno es sustrato de la licopeno  $\beta$  ciclasa (LCYB) que puede ciclar sus extremos y generar anillos en configuración  $\beta$  y de la licopeno  $\epsilon$  ciclasa (LCYE) que puede ciclar un extremo y generar un anillo en configuración  $\epsilon$ . Así se obtienen dos carotenoides, el  $\beta$ -caroteno, carotenoide bicíclico que posee dos anillos  $\beta$  y el  $\alpha$ -caroteno, carotenoide bicíclico que posee un anillo  $\beta$  y otro  $\epsilon$ . Los carotenoides sintetizados hasta este punto se llaman carotenos y los que serán sintetizados posteriormente se llaman xantófilas. Luego, el  $\alpha$ -caroteno es hidroxilado en su anillo  $\beta$  por la caroteno  $\beta$ -hidroxilasa (C $\beta$ Hx) y en su anillo  $\epsilon$  por la caroteno  $\epsilon$ -hidroxilasa (C $\epsilon$ Hx), para sintetizar luteína. Por otra parte el  $\beta$ -caroteno es hidroxilado por la  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (C $\beta$ Hx) para producir zeaxantina (Cunningham y Gantt, 1998). La zeaxantina es epoxidada para dar anteraxantina y luego violaxantina por acción de la zeaxantina epoxidasa (ZEP), reacción que puede ser revertida por la violaxantina de-epoxidasa (VDE). El equilibrio entre estas dos reacciones es llamado ciclo de

las xantófilas y es el que regula el sistema de disipación térmica en los cloroplastos (Niyogi, 1999). Sobre la violaxantina actúa la neoxantina sintasa, generando neoxantina. La violaxantina y la neoxantina son clivadas y transferidas al citosol donde son transformadas en moléculas de ABA (Nambara y Marion-Poll, 2005). La anteraxantina y la violaxantina en algunos modelos vegetales, como el pimentón, son sustrato de la capsantina capsorrubina sintasa (CCS), que genera capsantina y capsorrubina, respectivamente (Ha y col., 2007).



**Figura 1: Ruta de síntesis de los carotenoides en las plantas.** Todos los isoprenoides derivan del isopentenil pirofosfato (IPP) y de su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP), sintetizados a través de dos rutas independientes y compartimentalizadas. Una citosólica, la ruta del ácido mevalónico (MVA) y una plastidial, la ruta del 1-deoxy-D-xylulose-5-fosfato (DOXP). En esta figura se muestra un esquema general de la síntesis de los carotenoides en las plantas y las enzimas implicadas en cada etapa. **IPI**: isopentenil pirofosfato isomerasa; **GGPS**: geranylgeranil pirofosfato sintasa; **PSY**: fitoeno sintasa; **PDS**: fitoeno desaturasa; **ZDS**: ξ-caroteno desaturasa; **LCYB**: licopeno β-ciclasa; **LCYE**: licopeno ε-ciclasa; **CbHx**: caroteno β-hidroxilasa; **CeHx**: caroteno ε-hidroxilasa; **ZEP**: zeaxantina epoxidasa; **VDE**: violaxantina de-epoxidasa; **NXS**: neoxantina sintasa; **CCS**: capsantina capsorrubina sintasa.

## 1.2 Regulación de la vía carotenogénica.

Los genes y las enzimas que participan en la biosíntesis de los carotenoides se conocen con bastante detalle. Sin-embargo, aún no se conocen todos los detalles sobre la regulación génica y metabólica de esta vía y es un ámbito de investigación que aún se encuentra en desarrollo. Se ha establecido que en los plastidios el contenido de los carotenoides puede regularse principalmente en cuatro niveles: (1) la formación de estructuras capaces de almacenar/estabilizar los carotenoides, (2) la regulación de la transcripción de los genes implicados en la biosíntesis de los carotenoides, (3) la regulación post-transcripcional de las enzimas implicadas en la biosíntesis de los carotenoides y, (4) el catabolismo de los carotenoides (Fraser y Bramley 2004; Howitt y Pogson 2006)

En los cloroplastos prácticamente todos los carotenoides se encuentran asociados a proteínas unidas a las clorofilas, formando parte de los complejos de captación y disipación de la energía lumínica, mientras que en los cromoplastos se encuentran inmersos en estructuras lipoproteicas que pueden ser globulares, cristalinas, membranosas, fibrilares o tubulares (Vishnevetsky y col., 1999). El mutante *or* de la coliflor es un claro ejemplo de la influencia de las estructuras de almacenamiento en el contenido total de los carotenoides. Las inflorescencias del mutante son naranjas, debido a la aparición de láminas que acumulan  $\beta$ -caroteno en la membrana plastidial, mientras que las del parental son blancas por la ausencia de carotenoides (Li y col., 2001), sin mostrar diferencias en los niveles de expresión de los genes carotenogénicos en ambos genotipos (Li y col., 2006).

Estudios realizados en diversos vegetales señalan que la forma principal de regulación de esta ruta es a nivel transcripcional (Bramley, 2002, Cunningham, 2002; Howitt y Pogson 2006; Römer y Fraser, 2005; Tanaka y col., 2008; Taylor y Ramsay, 2005; Ronen y col., 1999), determinando que el desarrollo, la maduración de los órganos y la luz regulan la transcripción de los genes carotenogénicos. Se ha observado que las plantas crecidas en condiciones normales (foto-período de 16 horas) que luego son expuestas a luz de alta intensidad aumentan

la transcripción de los genes carotenogénicos como *psy*, *pds*, *zds* y *lcyb*, mientras que si se ponen en oscuridad, la expresión disminuye (Simkin y col, 2003). De manera similar, en las hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) expuestas a luz de mayor intensidad se observa un aumento en la transcripción de los genes carotenogénicos analizados (*c $\beta$ hx*, *zep* y *vde*) (Woitsch y Römer, 2003). Asociado a la maduración de los frutos aumenta la biosíntesis de los carotenoides, aumentando la expresión de algunos genes y disminuyendo la expresión de otros para favorecer la acumulación de un carotenoide en particular, como ocurre en el tomate, la naranja y el damasco (Pecker y col., 1996; Giuliano y col, 1993; Corona y col, 1996; Ronen y col, 1999; Bramley, 2002; Kato y col, 2004; Rodrigo y col, 2004; Kita y col, 2007). Por otra parte, esta ruta también es regulada mediante retroalimentación por inhibición de los productos finales. Por ejemplo la inhibición de la ciclación del licopeno en las hojas de tomate incrementa la expresión de los genes *pds* y *psy1* (Bramley, 2002).

A nivel génico existe otro punto de regulación, dado por la presencia de más de un gen que codifica para una misma actividad enzimática. Por ejemplo, en tomate se han descrito dos genes que codifican para PSY: *psy1* que participa en la biosíntesis de los carotenoides en el cromoplasto durante la maduración del fruto y *psy2* cuya expresión predomina en el tejido fotosintético; asociado a los cloroplastos (Fraser y col, 1999, Fraser y col, 1994). En maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza sativa*), se describieron recientemente tres genes *psy*. En ambas plantas, *psy1* y *psy2* son inducidos por la luz durante la de-etiolación (transición de la plantas desde la oscuridad a la luz); mientras que el nivel de transcrito de *psy3* es regulado en respuesta al estrés abiótico (sequía y salinidad) y a ABA (Li y col., 2008; Welsch y col., 2008). En *A.thaliana* (Tian y DellaPenna 2001), pimentón (Bouvier y col., 1998) y tomate (Hirschberg 2001) se han identificado dos genes *C $\beta$ Hx* y en *A.thaliana* existen indicios de un tercer gen (Tian y col., 2003). En tomate, uno de los genes *C $\beta$ Hx* (*crtR-b1*) tiene expresión constitutiva en hojas, mientras que el otro (*crtR-b2*) es activado principalmente en las flores (Hirschberg, 2001; Galpaz y col., 2006). En tomate también existen dos genes que codifican para la actividad LCYB, enzima clave en la regulación de la biosíntesis de los carotenoides (Ronen y col., 1999;

Bramley, 2002), uno de ellos es *lcyb*, asociado principalmente a la biosíntesis de los carotenoides en el tejido fotosintético y el otro es *cycb* que presenta una expresión fruto específica (cromoplasto) durante la maduración de este órgano (Ronen y col., 2000). En el pimentón (*Capsicum annuum*) se han descrito dos genes que codifican para enzimas con actividad LCYB, estos son *lcyb* y *ccs* (Hugueney y col., 1995). Este último codifica para una proteína que además tiene la actividad capsantina capsorrubina sintasa (CCS), encargada de la síntesis de capsantina y capsorrubina a partir de las xantófilas anteraxantina y violaxantina, respectivamente (Figura 1; Bouvier y col., 1994). Análisis de expresión muestran que *lcyb* se expresa preferentemente en las hojas y que *ccs* es transcrito principalmente durante la maduración de los frutos (Hugueney y col., 1995; Hugueney y col., 1996). Estos estudios indican que en las plantas que poseen alto contenido de carotenoides en órganos abundantes en cromoplastos, existe más de un gen que codifica para enzimas claves en la biosíntesis de los carotenoides como PSY y LCYB, donde uno de ellos es específico de cloroplastos y el otro de cromoplastos.

El tercer nivel de regulación de la síntesis de los carotenoides es la regulación post-transcripcional de las enzimas implicadas en este proceso. En los cromoplastos, las proteínas PSY y PDS pueden encontrarse en forma inactiva solubilizadas en el estroma o en forma activa unidas a la membrana, sugiriendo que el control del equilibrio entre las fracciones de proteína libre/unida a la membrana es un mecanismo post-transcripcional capaz de regular la actividad de estas enzimas (Schledz y col., 1996; Al Babili y col., 1996; Bonk y col., 1997; Welsch y col., 2000). Para PDS dicho mecanismo estaría asociado al estado redox de quinonas unidas a la membrana (Bonk y col., 1997; Breitenbach y col., 2001).

El cuarto nivel de regulación de la biosíntesis de estos pigmentos, es el catabolismo de los carotenoides. Los apocarotenoides son productos de la ruptura de los carotenoides y algunos de ellos, como la  $\beta$ -ionona, son compuestos volátiles que influyen en el aroma de los frutos (Camara y Bouvier 2004; Simkin y col., 2004a; Simkin y col., 2004b; Lewinsohn y col.,

2005). La ruptura de los carotenoides es catalizada por una familia de enzimas denominadas CCDs (Giuliano y col., 2003; Camara y Bouvier, 2004; Lewinsohn y col., 2005). Diferencias en la expresión de los genes *CCDs*, podrían modificar la acumulación tanto de sus sustratos como de sus productos. Por ejemplo, en el crisantemo se ha identificado un gen *CCD4a*, cuya expresión en los pétalos conduce a la degradación de los carotenoides sintetizados, presentando este tejido un color blanco debido a la práctica ausencia de los carotenoides. La delección del gen *CCD4a* del genoma del crisantemo o la supresión de su expresión mediante silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT), conduce a la acumulación de los carotenoides y los pétalos presentan un color amarillo (Ohmiya y col., 2006).

Dentro de los puntos de regulación descritos para la biosíntesis de los carotenoides, es importante destacar el punto de regulación génica, en que existe más de un gen que codifica para una enzima carotenogénica, ya que fue el abordado en este seminario de título.

### 1.3 La zanahoria (*Daucus carota*) como modelo de estudio.

*Daucus carota* L., nuestro modelo de estudio de la síntesis de los carotenoides, es una hortaliza miembro de la familia *Apiaceae* y es cultivada por su raíz comestible, que contiene altos niveles de  $\beta$ -caroteno (9,7 mg/g de peso fresco, Fraser y Bramley, 2004), vitaminas B1 y C y fibra dietética (Wally y col., 2007). A través de métodos tradicionales de cultivo, se han desarrollado cultivares comerciales, buscando mejorar el crecimiento, forma y color de la raíz modificada y los niveles de  $\beta$ -caroteno (Wally y col., 2008). Así, se han seleccionado variedades de color naranja (como la variedad Nantes empleada en los experimentos de este seminario de título), amarillas y rojas que sintetizan carotenoides en la raíz modificada y en el tejido fotosintético; mientras que las silvestres son de raíz modificada blanca y sintetizan carotenoides exclusivamente en el tejido fotosintético, al igual que otras plantas (Just y col., 2007).

La carotenogénesis ha sido extensamente estudiada en los frutos y las flores, pero hay poco conocimiento acerca de su regulación en órganos como las raíces (Clotault y col., 2008). En la zanahoria la síntesis de los carotenoides ocurre en sus hojas, que están expuestas a la

luz, por lo que en este tejido la expresión de los genes carotenogénicos podría ser activada por la luz, tal como en otras plantas. Pero, una particularidad de este modelo es que sintetiza altos niveles de carotenoides en su raíz modificada, en condiciones de oscuridad, lo que sugiere que en ésta existiría una regulación distinta a las descritas actualmente, convirtiendo a la zanahoria en un modelo muy interesante para el estudio de la carotenogénesis.

La zanahoria es una de las plantas modelo más utilizada para la embriogénesis somática, por lo que se han establecido procedimientos experimentales simples y eficientes para su realización (Shibukawa y col., 2009). Otras metodologías como su propagación *in vitro* y la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* también se encuentran establecidas. Así, ha sido posible utilizar la transgénesis para aumentar la resistencia a los hongos y otras enfermedades (Gilbert y col., 1996; Melchers y Stuver, 2000; Takaichi y Oeda, 2000; Chen y Punja, 2002; Jayaraj y Punja, 2007; Jayaraj y Punja, 2008), generar plantas resistentes a los herbicidas (Chen y Punja, 2002), para la aplicación de la ingeniería metabólica en el diseño de productos medicinales (Bouche y col., 2003; Marquet-Blouin y col., 2003; Kumar y col., 2004) y nuevos compuestos antioxidantes (Jayaraj y col., 2008). Todo esto valida a *D. carota* como un modelo apto para el estudio y análisis de los genes de la ruta carotenogénica.

En la base de datos Genebank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) se encuentran depositadas secuencias de cDNA para la mayoría de los genes carotenogénicos de *D. carota*. Se encuentran publicados tres cDNAs completos que codifican para C $\beta$ Hx, dos para PSY y ZDS, y uno para PDS, CRTISO, LCYB, CCS, LCYE, ZEP y VDE (Just y col, 2007). Además, se conoce la expresión de algunos genes carotenogénicos durante el desarrollo de la raíz de zanahoria en variedades de distintos colores (Clotault y col., 2008). También, se ha estudiado la expresión de otros genes carotenogénicos en las hojas y la raíz modificada de *D. carota* var. Nantes y el efecto de la luz sobre la expresión de los genes, la morfología y el desarrollo de la raíz modificada (Stange y col., 2008). Sin embargo, hasta el momento no existe ningún estudio funcional acerca de los genes carotenogénicos en *D. carota*.

En este seminario de título se comenzó el estudio funcional del gen capsantina capsorrubina sintasa (*ccs* o *lcyb2*, [GeneBank: DQ192191]), que se postula codificaría para una segunda enzima con actividad LCYB en *D. carota* (Just y col., 2007). Esto complementa un estudio previo realizado en nuestro laboratorio (Pizarro, 2008), en que se determinó la función del gen licopeno  $\beta$ -ciclase (*lcyb1*, [GeneBank: DQ192190]) de *D. carota* en la síntesis de carotenoides.

#### **1.4 Importancia del gen *lcyb* en la biosíntesis de carotenoides y los genes *lcyb* de *D. carota*.**

La enzima LCYB en las plantas es requerida para la ciclación del licopeno para producir  $\beta$ -caroteno (Figura 1), el principal carotenoide acumulado en las zanahorias. La ciclación del licopeno por las enzimas licopeno ciclasas (LCYE y LCYB) es un punto de división clave en la vía de síntesis de los carotenoides y alteraciones en su regulación o en la actividad enzimática afectan fuertemente la composición de los carotenoides en los distintos tejidos vegetales (Hirschberg, 2001; Bramley, 2002; Cunningham, 2002; Botella-Pavía y Rodríguez-Concepción, 2006; Howitt y Pogson, 2006). Genes que codifican para la enzima LCYB se han identificado en varios modelos vegetales. En muchos casos están codificados dos genes *lcyb*, uno de ellos con expresión preferencial en los cromoplastos y el otro asociado al tejido fotosintético. Por ejemplo:

- En el tomate (*Solanum lycopersicum*) uno de los genes *lcyb*, es asociado principalmente a la biosíntesis de los carotenoides en el tejido fotosintético, mientras que *cycb*, se expresa en forma transitoria en los frutos durante su maduración y también se detecta en los pétalos de las flores, siendo indetectable en las raíces, las hojas y las semillas (Ronen y col: 2000).
- En el pimiento (*Capsicum annuum*), aunque el gen *lcyb* se expresa en todas las etapas del desarrollo de las hojas y los frutos, su expresión es 5 a 10 veces mayor en las hojas jóvenes que en las senescentes y los frutos. No se observa un aumento significativo de su expresión durante la maduración de los frutos. Por el contrario el gen *ccs* (capsantina capsorrubina



sintasa) que codifica para una enzima que también posee actividad LCYB, es altamente expresado durante la maduración de los frutos y su transcripción es indetectable en los tejidos verdes (Hugueney y col. 1995).

- En la naranja (*Citrus sinensis*) recientemente se han aislado dos genes *lcyb*, llamados *Csβ-lcy1* y *Csβ-lcy2*. *Csβ-lcy1* se expresa en bajos niveles y permanece relativamente constante durante la maduración de los frutos mientras que *Csβ-lcy2* presenta una expresión específica en los cromoplastos y una marcada inducción tanto en la piel como en la pulpa de los frutos de naranja en forma paralela con la acumulación de β; β-xantófilas, principalmente violaxantina (Alquézar y col., 2009).
- En la papaya (*Carica papaya*) se ha identificado un ortólogo de *lcyb* denominado *cpicyb* o *lcy-β1*, cuya expresión es 7 veces más alta en las hojas que en los frutos. Esto indica que la expresión de *cpicyb* es específica de los cloroplastos y sugiere que es inhibida durante el proceso de maduración de los frutos (Skelton y col., 2006). Recientemente se ha identificado un segundo gen *lcyb* denominado *cpcybc* o *lcy-β2* cuya expresión sería específica de cromoplastos, detectándose un aumento al comenzar el estado verde maduro de los frutos (Blas y col., 2010, Devitt y col., 2010).
- En el azafrán (*Crocus sativus*) se han identificado dos genes *lcyb*, *CstLcyB1* y su parólogo *CstLcyB2a* derivado de un antiguo evento de duplicación génica. Se observó que *CstLcyB1* fue altamente expresado en las hojas y en el tejido del estigma y presentó bajos niveles en los tépalos. Por el contrario *CstLcyB2a* fue sólo detectado en el tejido del estigma. Durante el desarrollo de *C.sativus*, la coloración de sus estigmas cambia del blanco al púrpura pasando por el amarillo y anaranjado, cambios de color que van acompañados de una acumulación de los carotenoides (principalmente β-caroteno) y los apocarotenoides. Los transcritos de *CstLcyB2a* se detectaron en todos los estados del desarrollo de los estigmas, mientras que *CstLcyB1* fue sólo detectado en el estado rojo y pre-antesis, en niveles mucho más bajos que *CstLcyB2a* (Ahrazem y col. 2009).

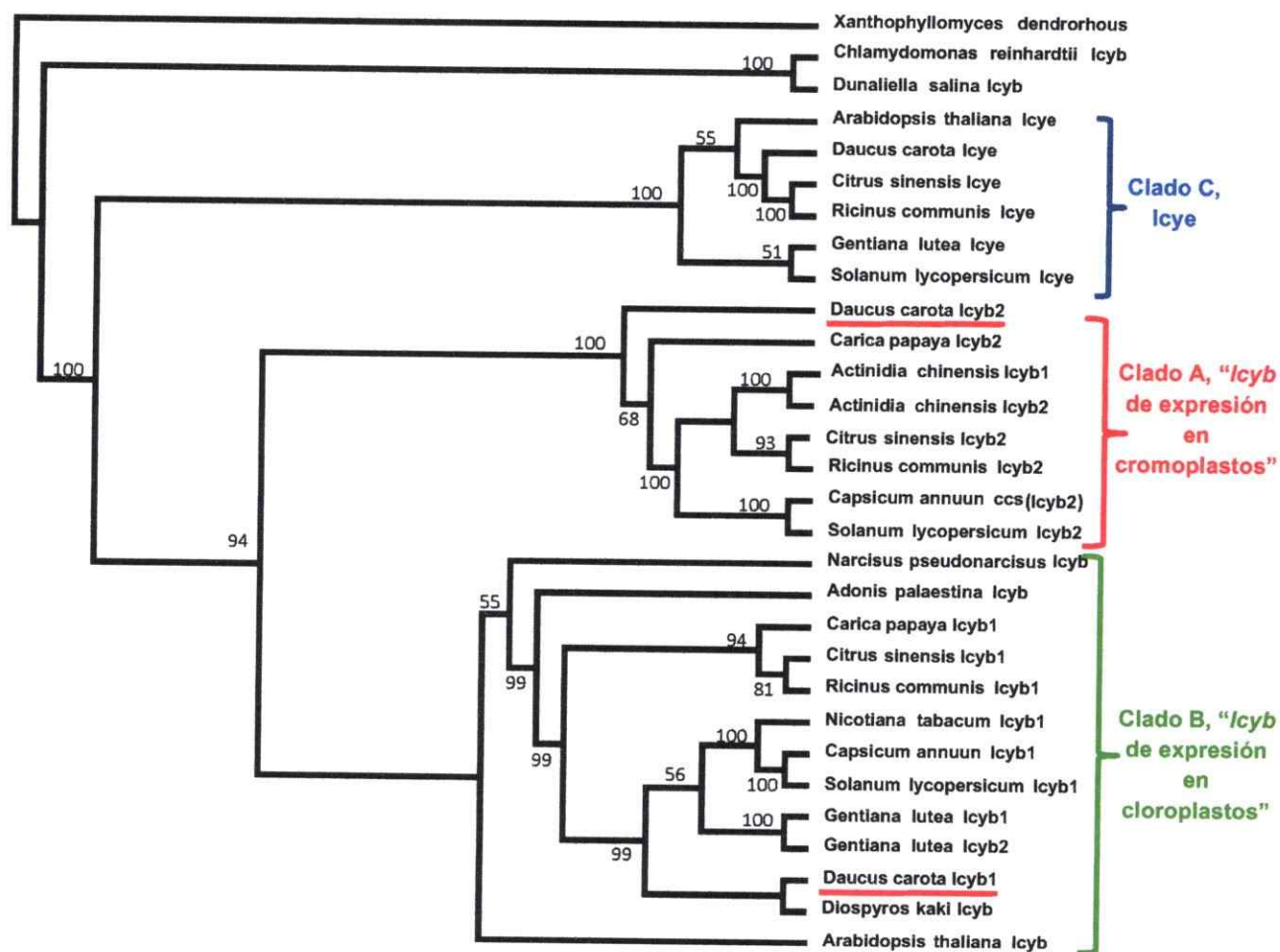
- En la sandía (*Citrullus lanatus*) hasta el momento sólo se ha aislado un gen *lcyb* que sería el responsable de determinar la coloración de la piel roja o amarillo canario de esta fruta. Se encontró que el perfil transcripcional de *lcyb* fue similar en las sandías de color amarillo canario y rojo, pero fue detectado un polimorfismo en la región codificante que cosegrega con cada fenotipo de color. Esto sugiere que una mutación fundamental en el alelo *lcyb* de las sandías rojas podría reducir la actividad LCYB y resultar en la acumulación de licopeno (Bang y col., 2007).

Estos ejemplos evidencian la existencia de un gen *lcyb* que se expresa preferentemente en cromoplastos y sería un mecanismo frecuente en la regulación de la carotenogénesis en los tejidos con altos niveles de carotenoides. Las zanahorias poseen una raíz modificada con un alto contenido de cromoplastos y que acumula altos niveles de carotenoides en oscuridad por lo que se esperaría encontrar un gen *lcyb* que se exprese preferentemente en este órgano.

Respecto a los genes licopeno  $\beta$  ciclasa de *D. carota*, *lcyb1* [GeneBank: DQ192190] posee un porcentaje de identidad entre 74 y 77% con los cDNAs de *lcyb* específicos de los cloroplastos de plantas y también con *lcyb* de algas y cianobacterias. Además, al ser silenciado en la zanahoria se produce una disminución significativa de los niveles de  $\beta$ -caroteno y carotenoides totales en las hojas (63% y 67% de reducción respectivamente) y en la raíz modificada (45% y 38% de reducción respectivamente), lo que indica que este gen codificaría para una enzima con actividad LCYB y que su expresión es necesaria para la síntesis de  $\beta$ -caroteno en *D. carota* (Pizarro, 2008). Por otra parte, el gen *ccs* o *lcyb2* [GeneBank: DQ192191] de *D. carota* posee un 74% de identidad nucleotídica con *lcyb2* o *Cs $\beta$ -lcy2* de naranja, *cycb* de tomate, *ccs* de pimentón, 71% con *lcyb2* o *cp $\beta$ cycb* de papaya y 65% con *lcyb2* o *CstLcyB2a* de azafrán, genes que se expresan preferentemente en los cromoplastos, durante la maduración de los frutos y codifican para enzimas con actividad LCYB. Es por esto que análisis filogenéticos realizados en el laboratorio agrupan a *lcyb2* de *D. carota* con genes *lcyb* de expresión preferencial en tejidos abundantes en cromoplastos (Clado A, Figura 2) y a *lcyb1* de *D. carota*

lo agruparon con genes *lcyb* de expresión preferencial en tejidos abundantes en cloroplastos (Clado B, Figura 2).

Por último es importante mencionar que en zanahoria no se encuentran los pigmentos capsantina ni capsorrubina productos directos de la actividad de la enzima CCS, por lo tanto es más probable que *ccs* o *lcyb2* de *D. carota* codifique para una enzima con actividad LCYB.

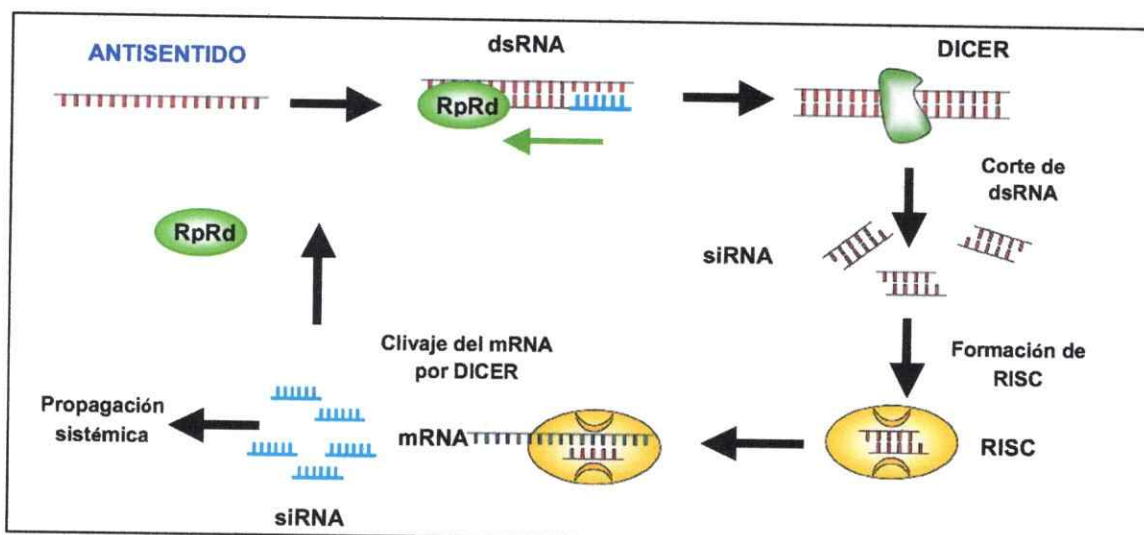


**Figura 2: Árbol filogenético de los genes *lcyb*.** La hipótesis filogenética generada mediante el análisis de Neighbor-joining (Bootstrap =100; PAUP4.0) muestra que los genes *lcyb/lcyb* están distribuidos en 3 clados principales. Los genes *lcyb* que tienen una expresión preferencial en tejidos abundantes en cromoplastos son agrupados en el Clado A, los genes *lcyb* con expresión en órganos fotosintéticos son agrupados en el Clado B y los genes anotados como licopeno epsilon ciclasa (*lcyb*) están agrupados en el Clado C. Esta topología es consistente con la hipótesis filogenética generada por el análisis de Parsimonia (PAUP4.0) (Ocaez, 2009.).

### 1.5 Estrategia desarrollada

En este seminario de título se abordó la caracterización funcional del gen *lcyb2* de *D.carota*. Primero se determinó si al igual que en otros sistemas modelo los genes *lcyb1* y *lcyb2* tienen una expresión diferencial, en las hojas y la raíz modificada de la zanahoria. Se analizó la expresión de ambos genes mediante PCR cuantitativo (qRT-PCR). Finalmente, con el propósito de validar la función del gen *lcyb2* en la carotenogénesis en *D.carota* mediante ingeniería genética, se desarrolló un vector binario para SGPT de *lcyb2*.

El SGPT abarca una secuencia de eventos que conducen a la degradación dirigida de un transcrito procesado (mRNA) en la célula y de esta forma al silenciamiento de la expresión del gen correspondiente (Susi y col., 2004). Se inicia con la generación de los RNAs interferentes (siRNAs) que gatillarán el silenciamiento, a partir del clivaje de la doble hebra de RNA (dsRNA). Una forma de originar el dsRNA, consiste en la expresión en antisentido del gen blanco o un fragmento de éste. Se ha descrito que para que un transgen sea capaz de inducir silenciamiento de una secuencia homóloga se requiere una identidad nucleotídica superior al 80% y un tamaño mínimo de 100pb (Burton y col, 2000, Ingelbrecht y col, 1999; Mueller y cols, 1995; Shweizer y col, 2000) de forma tal que los transcritos hibriden con el mRNA endógeno y sirvan como partidores para la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) que generará el dsRNA (van Blockland y cols, 1994; Tang y col, 2003). Luego, los dsRNAs son cortados por DICER (una RNasa de tipo III), que genera pequeñas moléculas de 21-26 nucleótidos de dsRNA que poseen dos nucleótidos sin aparear en los extremos 3' de cada hebra, llamados siRNA (Susi y col, 2004; Tang y col, 2003). Éstos se unen al complejo RISC que reconoce al RNA endógeno blanco y sintetiza el RNA de doble hebra. Además, los siRNA se transmiten a través del floema, llegando a otras células vegetales, propagando el silenciamiento a toda la planta (Hamilton y col, 2002; Voinnet y col, 1998).



**Figura 3: Esquema del mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional.** El RNA en antisentido hibrida con el mRNA endógeno y sirve como partidor para que la RNA polimerasa dependiente de RNA (RpRd) genere el dsRNA. Este es cortado por DICER, produciendo los siRNA que junto al complejo RISC reconocen al mRNA endógeno, se sintetiza la hebra complementaria y se forma el dsRNA que es cortado por DICER silenciando el gen blanco. Además, los siRNA son propagados en forma sistémica por el floema. Adaptado de Baulcombe, 2004.

Por la forma en que opera el SGPT permite seleccionar un gen blanco en este caso *lcyb2* y silenciarlo en forma sistémica y altamente específica, lo que permite generar líneas con diferentes grados de silenciamiento (Knock down), sin producir mutantes nulas (knock out) ya que, remanentes del transcrito del gen que se está silenciando se lograrán traducir y eventualmente se logrará ver fenotipos que generados mediante mutación completa podrían ser letales, como ocurre cuando los genes mutados son indispensables para la vida de las plantas como son los genes carotenogénicos. Por ejemplo mutantes homocigotas de arroz en los genes *pds*, *zds* y *lcyb* no son viables (Fang y col., 2008). Otra desventaja que tiene la mutagénesis frente al SGPT es que es al azar y las mutaciones deben ser secuenciadas o mapeadas para confirmar sus posiciones, lo que requiere de grandes colecciones de líneas mutantes para tener una buena cobertura del genoma completo, transformándose en un proceso muy laborioso y extenso (Matthew, 2004). Además, la estrategia de SGPT ya ha sido utilizada para estudios de los genes carotenogénicos. En tomate permitió determinar que la enzima PSY2 no contribuye a la síntesis de los carotenoides en la maduración del fruto (Fraser y col., 1999) y que *cycb* tiene una función fruto específica (Ronen y col., 2000). En papa se encontró que al silenciar los

genes *CHY1* y *CHY2* (que codifican para la enzima caroteno  $\beta$ -hidroxilasa) se produce un incremento en los niveles de los carotenoides totales y de  $\beta$ -caroteno en los tubérculos de la papa (Diretto y-col., 2007). En zanahoria fue aplicada para estudiar la función del gen *lcyb1* (Pizarro 2007 y 2008), determinando que dicho gen es relevante para la síntesis de  $\beta$ -caroteno en toda la planta y actualmente se está utilizando para evaluar la función de los genes *zds1* y *zds2* (Flores, 2009). En base a estos antecedentes, se decidió utilizar esta estrategia para bajar el nivel total de transcrito del gen *lcyb2* de *D.carota* en plantas silvestres y en una línea transgénica silenciada para *lcyb1* y de esta forma aportar evidencias acerca de si alguno de estos genes tiene una función órgano específica o si son requeridos en toda la planta y en particular determinar la importancia de *lcyb2* en la síntesis de los carotenoides en la zanahoria.

### 1.6 Objetivos

**Objetivo general:** Desarrollo de estrategias moleculares para la caracterización funcional del gen licopeno  $\beta$ -ciclase 2 (*lcyb2*) en *D. carota* (zanahoria).

#### Objetivos específicos

- Cuantificación de los niveles de los transcritos de los genes carotenogénicos *lcyb1* y *lcyb2* en las hojas y la raíz modificada de *D. carota* mediante PCR cuantitativo en tiempo real.
- Construcción del vector pMDC32/AS-*lcyb2* mediante la tecnología Gateway® para el SGPT del gen *lcyb2*.
- Evaluación en tabaco, de la funcionalidad de la construcción pMDC32/AS-*lcyb2*.
- Obtención de plantas transgénicas de *D. carota* con la construcción para el SGPT de *lcyb1* y *lcyb2* mediante embriogénesis somática.
- Análisis molecular para la selección y confirmación de las líneas transgénicas de *D. carota* que poseen la construcción para el SGPT de *lcyb1* y *lcyb2*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y MEDIOS DE CULTIVO.

Las bacterias empleadas en este seminario de título fueron las cepas de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (genotipo: *supE44*,  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*) y *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Genotipo: C58, plásmido Ti curado, Gen<sup>R</sup>, Rif<sup>R</sup>).

El material vegetal utilizado fue *Daucus carota* variedad Nantes y *Nicotiana tabacum*.

El cultivo de bacterias se realizó en medio LB-líquido (triptona 2% p/v, NaCl 0,8% p/v, pH 7.0 a 25°C) y LB-sólido (triptona 2% p/v, NaCl 0,8% p/v, agar 1,6% p/v, pH 7.0 a 25°C).

Para la agro-infiltración de *N.tabacum* se utilizó el medio de infiltración (MgCl<sub>2</sub> 25 mM, MES 10 mM, acetosiringona 200  $\mu$ M, a pH 5,7), mientras que para la transformación de *D.carota* con *A.tumefaciens* se ocupó el medio MS-líquido (MS (Murashige & Skoog basal medium, *PhytoTechnology Laboratories*™) 0,44% p/v, mioinositol 100 ppm, sacarosa 20% p/v, pH = 5,8) suplementado con acetosiringona 0,8 mM. Para la embriogénesis somática de *D.carota* se utilizó el medio MS-sólido (MS (Murashige & Skoog basal medium, *PhytoTechnology Laboratories*™) 0,44% p/v, mioinositol 100 ppm, sacarosa 20% p/v, agar-agar 7% p/v, pH = 5,8)

### 2.2 REACTIVOS Y EQUIPOS UTILIZADOS

Se utilizaron reactivos para biología molecular, que fueron adquiridos en Merck, Invitrogen, Fermentas, Promega, Axygen, BIOLINE, New England Biolabs, Quantace, Sigma-Aldrich, *Phyto Technology Laboratories*, Stratagene y Omega Bio-tek.

Entre los equipos utilizados se encuentran: un autoclave para esterilizar soluciones y tierra, una centrifuga refrigerada (Universal 32 R Hettich), un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 V3.3, dos termocicladores convencionales MyCycler™ (Bio Rad) y un termociclador acoplado a un sistema óptico de detección, Mx3000P™ (Stratagene)

## 2.3 MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 2.3.1 Extracción de RNA total desde el tejido vegetal

Para la extracción del RNA de *D. carota* o de *N.tabacum*, se utilizó el reactivo RNA-solv® de Omega Bio-tek. Aproximadamente 100 mg de tejido, fueron homogenizados en un mortero estéril con 1 mL de RNA-solv® en presencia de nitrógeno líquido. Luego, se pasó el homogenizado a un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL donde se agregó 200 µL de cloroformo, se agitó en un vórtex por 30 s y se incubó en hielo durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 x g por 15 min a 4°C, se rescató aproximadamente el 80% de la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifuga. Enseguida, se precipitó el RNA agregando 500 µL de isopropanol a -20°C, se homogenizó por inversión 10 veces y se incubó por 20 min a -20°C. Después, se centrifugó por 10 min a 12000 x g a 4 °C y se descartó completamente el sobrenadante. El precipitado fue lavado con 500 µL de etanol al 80% en agua ultrapura estéril tratada con DEPC (dietilpirocarbonato), centrifugado por 3 min a 16000 x g a 4°C, secado y resuspendido en 40 µL de agua ultrapura estéril tratada con DEPC.

### 2.3.2 Cuantificación y evaluación de la integridad y calidad del RNA obtenido

Para cuantificar el RNA total extraído se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 V3.3, que mide la absorbancia de los ácidos nucleicos ( $\lambda=260$  nm) con un 2% de error. El programa de este espectrofotómetro entrega las razones 260/280 y 260/230 que permiten evaluar la pureza de las extracciones de RNA. Valores de la relación 260/280 cercanos a 2.0 indican extracciones puras de RNA, mientras que valores más bajos señalan la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorben a 280 nm. Para la relación 260/230 los valores para muestras puras de RNA están en el rango de 1.8 a 2.2. Valores más bajos revelan la presencia de solventes orgánicos, algunas sales, proteínas y polisacáridos (NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.6 User's Manual pp 19).

Para evaluar la integridad del RNA total extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, formaldehído al 3% y amortiguador MOPS al 1X. Para preparar el gel se



disolvió la agarosa en 26,1 mL de agua desionizada tratada con DEPC y autoclavada, calentándola hasta obtener una solución homogénea. Bajo campana se agregaron 3 mL de amortiguador MOPS al 10X (MOPS 400 mM, CH<sub>3</sub>COONa 100 mM y EDTA 10 mM pH 8) y 900 µL de formaldehído al 37%. A 1 µg de cada muestra de RNA se le agregó 1 µL de amortiguador de carga denaturante (Amortiguador-MOPS 1,5X, formamida 69%, formaldehído 1,5% y Bret 0,1 µg/µL) y la mezcla fue denaturada por 10 min a 70°C. Luego, las muestras se pusieron en hielo por 5 min y antes de cargar se les agregó 1 µL de amortiguador de carga (Azul de bromofenol 0.25%, xilen cyanol 0.25% y glicerol 80%). El gel se colocó en una cámara de electroforesis con amortiguador MOPS al 1X a una diferencia de potencial de 70 V durante 45 min. Los geles fueron observados y fotografiados bajo luz UV en un transiluminador con cámara fotográfica incorporada (GeneGenius Classic de SynGene®). Para determinar la integridad del RNA total, se verificó la presencia de las bandas de RNA ribosomal 28S y 18S en una razón 2:1.

### **2.3.3 Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

#### **2.3.3.1 Transcripción Reversa, síntesis de cDNA.**

Se tomaron 2 µg de RNA y se le adicionaron 50 unidades de DNAsa I libre de RNAsa (Fermentas), amortiguador de DNAsa I 1X (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>) y 20 unidades de inhibidor de ribonucleasas RiboLock™ (Fermentas). Se completó con agua tratada con DEPC hasta un volumen de 10 µL y se incubó a 37 °C por 30 min. Para inactivar la DNAsa I se agregó 1 µL de EDTA 25 mM en agua DEPC. Después de este tratamiento el RNA fue utilizado directamente en la síntesis de la hebra complementaria (cDNA).

Las reacciones de transcripción reversa se llevaron a cabo mediante el sistema ImProm-II® Reverse Transcription System (Promega). Cada reacción se realizó con 1 µg de RNA total tratado con DNAsa I en un volumen de reacción de 20 µL. La composición final de la mezcla fue: 4 µL de Amortiguador ImProm-II® RT 5X, 2,5 µL MgCl<sub>2</sub> (Fermentas) 25 mM, 1 µL dNTPs (Fermentas) 10 mM disueltos en agua DEPC, 1 µL Oligo AP

(5'TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGCTTCG3') 10  $\mu$ M y 20 U de inhibidor de ribonucleasas RiboLock™ (Fermentas). La mezcla se separó en dos volúmenes, uno contenía 1  $\mu$ g del RNA total y el partidor Oligo AP y el otro el resto de los componentes de la reacción.

Cada reacción se realizó en un termociclador, cuyo programa consiste en incubar 5 min a 70 °C el volumen que contiene el RNA y el Oligo AP, con el objetivo de desenrollar las hebras de RNA y luego los tubos son incubados en hielo, añadiéndoles el resto de la mezcla de reacción. Después de 5 min, se vuelven a colocar en el termociclador y se incuban por 5 min a 25 °C, para permitir el alineamiento del partidor Oligo AP. Luego, se incuban a 42 °C por 60 min, para permitir la síntesis del cDNA y finalmente se aumenta la temperatura a 70°C por 15 min, para inactivar a la transcriptasa reversa.

#### **2.3.3.2 Evaluación de la integridad del cDNA sintetizado y amplificación de un fragmento del gen *icyb2* mediante PCR.**

La integridad del cDNA sintetizado se confirmó mediante la amplificación de un fragmento de 196 pb de la subunidad ribosomal *18S* utilizando los partidores F-18S y R-18S (Tabla 1). La mezcla de reacción fue la siguiente: 1  $\mu$ L de cDNA molde, 2,5  $\mu$ L de amortiguador Paq 5000™ DNA polimerasa 10X (Stratagene), 0,5  $\mu$ L de dNTPs (Fermentas) 10 mM, 0,5  $\mu$ L de cada partidor a 10  $\mu$ M y 0,1  $\mu$ L de la enzima Paq DNA polimerasa (0,5 U), en un volumen final de 25  $\mu$ L. Además, se realizaron dos controles de la reacción, uno de ellos utilizando el RNA tratado con DNasa I como molde en lugar de cDNA (control sin transcripción reversa, S/RT) y un control negativo de la reacción de PCR sin molde (C-).

El programa de amplificación tiene una denaturación inicial a 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos para amplificar el fragmento del gen *18S* con el siguiente programa: Denaturación a 95°C por 30 s, 52°C por 40 s para la unión de los partidores y por último una temperatura de elongación de 72°C por 30 s. La reacción continuó con una extensión final a 72°C por 5 min y concluyó manteniendo las muestras a 10°C.

Una vez confirmada la integridad del cDNA, se realizó un PCR para amplificar un fragmento de 589 pb de la región codificante del gen *lcyb2* [DQ192191], utilizando los partidores F-*lcyb2* GATE y R-*lcyb2* GATE (Tabla 1). Se ocupó el mismo programa de amplificación antes mencionado para 18S, pero la reacción se realizó a distintas temperaturas de apareamiento de los partidores (48, 51, 53 y 56 °C) para determinar la mejor condición para obtener el fragmento del tamaño esperado y la extensión final se aumentó a 10 min.

#### **2.3.3.3 Visualización de los amplificadores obtenidos de las reacciones de PCR.**

La visualización de los productos de PCR y del DNA plasmidial, se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa cuya concentración estuvo en el rango de 1 al 2%. Este fue preparado con amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) y bromuro de etidio 1 µg/mL. Se mezclaron 8 µL de cada muestra con 1 µL de amortiguador de carga (Azul de bromofenol 0.25%, xylene cyanol 0.25% y glicerol 80%). El gel se colocó en una cámara de electroforesis con amortiguador TAE 1X a una diferencia de potencial entre 80 y 100 V durante 30 a 40 min. La visualización y toma de imagen se llevó a cabo con el equipo GeneGenius Classic de SynGene®.

#### **2.3.4 PCR de colonias de *E.coli* y *A.tumefaciens* para la selección de los clones positivos.**

El PCR de colonias, se realiza como el PCR tradicional, pero en lugar de utilizar como molde el DNA plasmidial purificado, se usa directamente una fracción de la colonia a analizar tomada desde la placa de cultivo en medio sólido o bien una alícuota del cultivo de noche líquido de estas bacterias. Las colonias de *E.coli* transformadas con las construcciones pGEM-T/*lcyb2*, pCR8/*lcyb2* y pMDC32/AS-*lcyb2* y las colonias de *A.tumefaciens* transformadas con los vectores pMDC32 y pMDC32/AS-*lcyb2* se analizaron por este método. La reacción se compuso de: 2,5 µL amortiguador Taq DNA polimerasa 10X (Stratagene), 0,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 100 Mm, 0,5 µL de dNTPs (Fermentas) 10 mM, 0,5 µL de cada partidor a 10 µM (F-*lcyb2* GATE y R-*lcyb2* GATE o F-Hig y R-Hig dependiendo de la construcción evaluada) y 0,1 µL de la enzima Taq polimerasa (0,5 U), en un volumen final de 25 µL. Además, se realizaron dos controles de la

reacción, un control positivo en que como molde se utilizó DNA plasmidial de la construcción correspondiente y un control negativo en que se utilizó agua en lugar de cultivo bacteriano.

El programa de PCR empleado consta de una etapa de denaturación inicial a 95°C por 4 min, seguido de 38 ciclos con las siguientes etapas: Denaturación a 95°C por 50 s, 56°C por 50 s para la unión de los partidores y por último una temperatura de elongación de 72°C por 1 min. La reacción continuó con una extensión final a 72°C por 10 min y concluyó manteniendo las muestras a 10°C. Para obtener resultados positivos el PCR de colonias de *A.tumefaciens* se debió realizar con un "hot start", después del cual se agregó 0,1 µL de la enzima Taq polimerasa a cada tubo por separado.

### **2.3.5 Purificación del DNA plasmidial de *E.coli***

La purificación del DNA plasmidial desde las bacterias *E.coli*, se realizó mediante el kit comercial Axyrep™ de Axygen, siguiendo el protocolo y utilizando los reactivos proporcionados por el fabricante. Con este DNA se realizaron los análisis de digestión enzimática y amplificaciones por PCR; también se utilizó para los procedimientos de transformación, recombinación y secuenciación del DNA.

### **2.3.6 Digestión con enzimas de restricción para la selección de los clones positivos.**

Se extrajo el DNA plasmidial de los clones pCR8-3, 5 y 9, portando la construcción pCR8/*cyb2* y se realizó una digestión enzimática doble para determinar la orientación en que se clonó el fragmento de 589pb del gen *icyb2* en el vector pCR8®/GW/TOPO®TA (pCR8). La reacción contuvo 300, 200 y 150 ng de DNA plasmidial de los clones pCR8-3, 5 y 9 respectivamente, amortiguador Tango 1X (Fermentas), 10 U de la enzima *Hpa* I (Fermentas) y agua nanopura para completar un volumen de 20 µL. La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 45 min, luego se agregaron 5 U de la enzima *Nco* I (Fermentas) y se incubó por 1 h a 37°C.

Con el objetivo de facilitar la recombinación del vector PCR8/*cyb2* con el vector de destinación pMDC32, se linealizó el vector pCR8/*cyb2* mediante una digestión simple con la enzima *Xba* I. La reacción se compuso de 950 ng de DNA plasmidial, amortiguador Tango 1X

(Fermentas), 10 U de la enzima *Xba* I (Fermentas) y agua nanopura para completar un volumen final de 20  $\mu$ L. La mezcla se incubó por 7 h a 37°C.

El análisis de los clones MC1 y MC2 con la construcción pMDC32/AS-Icyb2 se realizó mediante una digestión simple con la enzima *Xba* I. La mezcla de reacción se compuso de 150 y 280 ng de DNA plasmidial de los clones MC1 y MC2 respectivamente, amortiguador Tango 1X (Fermentas), 5 U de la enzima *Xba* I (Fermentas) y agua nanopura para completar un volumen total de 20  $\mu$ L. Se incubó por 2 h y 30 min a 37°C.

Después de transcurrido el tiempo de incubación a 37°C, las muestras fueron sometidas a una electroforesis en gel de agarosa para visualizar las bandas generadas por la digestión enzimática (sección 2.3.3.3)

### **2.3.7 Purificación del DNA desde geles de agarosa.**

Para extraer desde el gel de agarosa la banda correspondiente al vector pCR8/Icyb2 lineal, que luego se recombinaría con el vector de destinación pMDC32, se llevó a cabo un protocolo de purificación que utiliza una solución de sílica.

Para preparar la solución de sílica, se masó 1 g de sílica y se mezcló por agitación durante 2 h con 10 mL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7,4). Luego se eliminó el sobrenadante junto con el particulado fino y se agregaron 10 mL de PBS, se agitó y se dejó decantar por 2 h. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 2000 x g por 2 min y se resuspendió en 10 mL de una solución de KI 3M. De esta forma se obtuvo una solución de sílica con una concentración final de 100 mg/mL, que fue separada en alícuotas y guardada a 4°C protegida de la luz.

Para la extracción desde el gel de agarosa, en primer lugar se cortó la banda de interés desde el gel, se agregó 150  $\mu$ L de una solución de KI 6M y se puso en un baño a 60°C por 15 min hasta que se disolviera la agarosa. Luego, se agregó 10  $\mu$ L de la solución de sílica y se invirtió el tubo cada 2 min por 10 min, para evitar que la sílica precipitara. Posteriormente, se centrifugó por 5 s a 14000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se adicionaron 500  $\mu$ L del

amortiguador de lavado (TrisHCl 10 mM, NaCl 50mM, EDTA 2,5 mM, etanol 50% v/v) a -20°C, se resuspendió, se centrifugó por 5 s a 14000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se lavó 3 veces más y la última vez después de eliminar el sobrenadante, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. y se eliminó el sobrenadante, dejando el precipitado lo más seco posible. Este se resuspendió en 20 µL de agua nanopura, y se calentó a 60 °C por 5 min. Finalmente, se centrifugó por 1 min a 14000 rpm, se tomó el sobrenadante y se transpasó a otro tubo.

Para determinar el rendimiento de la extracción se realizó un gel de agarosa al 1% en el que se cargaron 2 µL de lo extraído desde el gel y 5 µL de marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas) y luego se realizó la cuantificación utilizando el programa Image J.

### **2.3.8 RT-PCR para confirmar las plantas transgénicas.**

Para confirmar que las plantas de zanahoria generadas por embriogénesis somática expresan la construcción pMDC32/AS-*lcyb2*, se extrajo RNA de sus hojas (sección 2.3.1), se llevó a cabo la síntesis de cDNA (sección 2.3.3.1) y se evaluó su integridad amplificando por PCR un fragmento de la subunidad ribosomal 18S (sección 2.3.3.2). Luego, se realizó un PCR para amplificar un fragmento de 163 pb del gen *hpt* que confiere resistencia a higromicina y que es portado por las construcciones pMDC32 y pMDC32/AS-*lcyb2* con las cuales se realizó la transformación. Como control negativo se utilizó como molde cDNA de zanahoria silvestre (wt) y como control positivo DNA plasmidial del vector pMDC32/AS-*lcyb2*. Además, de un control negativo de la reacción de PCR sin molde (C-) y un control sin transcripción reversa (S/RT).

En este seminario de título se transformaron, con las construcciones pMDC32 y pMDC32/AS-*lcyb2*, plantas de zanahorias silvestres y una línea transgénica silenciada para el gen *lcyb1* [DQ192190] (sección 2.5.5). Esta línea posee un alto porcentaje de silenciamiento de *lcyb1* en las hojas y la raíz modificada (96 y 83% respectivamente) y fue generada en la tesis de Magister de Pizarro L. (2008) mediante la transformación estable de zanahorias silvestres con el vector pBIN19/AS-*lcyb1*. Ésta construcción posee un fragmento de 494 pb del gen *lcyb1* en antisentido con respecto al doble promotor de expresión constitutiva fuerte 35S del virus del

mosaico de la coliflor, permitiendo desencadenar el SGPT de *lcyb1*. En este caso además de evaluar mediante RT-PCR que las líneas generadas amplificaban el fragmento del gen *hpt*, se determinó si también amplificaban un fragmento de 650 pb del gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina en plantas y que es portado por la construcción pBIN19/AS-*lcyb1*.

La mezcla de reacción para cada PCR fue la siguiente: 3  $\mu$ L de molde, 1,5  $\mu$ L de amortiguador  $\text{NH}_4$  10X (BIOLINE), 0,5  $\mu$ L de dNTPs (Fermentas) 10 mM, 2,5- $\mu$ L de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 0,5  $\mu$ L de cada partidor a 10  $\mu$ M, 0,2  $\mu$ L de la enzima BIOLASE™ DNA polimerasa (1 U) y agua nanopura para completar un volumen de 25  $\mu$ L. El programa de PCR utilizado fue el mismo que se ocupó para amplificar el gen *18S* (sección 2.3.3.2).

### 2.3.9 RT-PCR cuantitativo.

#### 2.3.9.1 Diseño y prueba de partidores específicos para el RT-PCR cuantitativo.

Los partidores utilizados para llevar a cabo los ensayos de PCR en tiempo real fueron diseñados en las regiones 5' no traducibles (NTR) de los genes *lcyb1* [DQ192190] y *lcyb2* [DQ192191] de *D.carota* subespecie *sativus*, anotadas en la base de datos de NCBI, y se generaron de esta forma partidores altamente específicos. En el caso del gen normalizador *18S* [AY552527.1] de *D.carota*, se utilizó una región conservada de este gen para el diseño de los partidores. Los partidores se analizaron en la página web <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>, para descartar aquellas parejas de partidores que formaran homo o heterodímeros con un  $\Delta G$  muy bajo. También se consideró que los partidores tuvieran un contenido de GC entre 40 y 60%, una  $T_m$  similar entre ellos y que amplificaran un fragmento pequeño entre 100 y 200 pb aproximadamente. Finalmente, se realizó un alineamiento contra la base de datos de la colección de nucleótidos del NCBI mediante la herramienta bioinformática BLASTn con lo cual se corroboró que cada partidor fuera específico para el gen objetivo. Todos los partidores utilizados en este seminario de título fueron sintetizados por IDT® y se detallan en la Tabla 1.

Una vez sintetizados los partidores, se probaron con el cDNA de una de las muestras biológicas. El programa de PCR empleado consta de una etapa de denaturación inicial a 95°C por 4 min, seguido de 35 ciclos con las siguientes etapas: Denaturación a 95°C por 30 s, 56°C por 40 s para la unión de los partidores y por último una temperatura de elongación de 72°C por 20 s. La reacción continuó con una extensión final a 72°C por 5 min y concluyó manteniendo las muestras a 10°C. Se utilizó la misma mezcla de reacción descrita en el punto 2.3.8 y los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 1: Secuencia de los partidores utilizados.** Se presentan las secuencias de los partidores que fueron utilizados en este seminario de título, con su respectiva temperatura de fusión, el tamaño del fragmento amplificado y el nombre del gen objetivo. **18S:** Subunidad menor del DNA ribosomal 18S, **lcyb1:** gen *lcyb1* de *D.carota*, **lcyb2:** gen *lcyb2* de *D.carota*, **hpt:** gen que codifica para la higromicina fosfotransferasa, **nptII:** gen que codifica para la neomicina fosfotransferasa II.

Gen objetivo	Partidores	Secuencia (5'→3')	Tm, °C	Fragmento esperado, pb
18S	F-18S	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT	65,0	196
	R-18S	ACAATGATCCTTCCGCAGGT	67,4	
lcyb1	F-lcyb1q	TGAGTGCAGCTTACACCTACTTGATTA	67,2	161
	R-lcyb1q	AACTGCAGAAGATATTGGAGA	61,7	
lcyb2	F-lcyb2q	CAAGTAGATTCTCTGTGTCCAT	64,1	84
	R-lcyb2q	TTACATGATTGCCAGAAAGACTC	65,0	
lcyb2	F-lcyb2 GATE	GTGATTGTGATCGGAGCTGG	66,1	589
	R-lcyb2 GATE	GTGGGAGACTTGGCGTTAG	66,0	
hpt	F-HIG	TCGCTAAACTCCCCAATGTC	65,3	163
	R-HIG	GCGAAGAATCTCGTGCTTTC	64,5	
nptII	F-nptII	GTGGGAGACTTGGCGTTAG	66,0	650
	R-nptII	CTATGCCTGTAGCGGT	61,7	



### 2.3.9.2 Ensayos de RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR)

En este seminario de título se utilizaron 3 pares de partidores para realizar los ensayos de RT-PCR cuantitativo. En el laboratorio ya se contaba con los partidores para los genes *lcyb1* y *18S* y también se había determinado la eficiencia de estos. Por lo tanto, sólo se diseñaron los partidores para *lcyb2* y luego se determinó su eficiencia como se explica a continuación.

A partir del fragmento génico de *lcyb2* amplificado por PCR convencional se realizaron cinco diluciones seriadas (1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000, 1/10000000), con agua libre de nucleasas. Con estas diluciones se realizaron ensayos de RT-PCR cuantitativo en un termociclador Mx3000P™ (Stratagene), utilizando el kit SensiMix™ Plus SYBR (Quantace). 2X de este Master mix contienen amortiguador de la reacción, DNA polimerasa activada por calor, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> 6mM, estabilizadores y SYBR® Green I. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 20 µL, compuesta por: 10 µL de Master Mix al 2X, 7 µL de agua libre de nucleasas, 0,5 µL de cada partidor 10 µM y 2 µL de cada dilución.

La eficiencia (E) de los partidores se obtuvo a partir de la pendiente de la recta obtenida al graficar el ciclo umbral (Ct) de cada dilución versus el número de dilución. La pendiente de esta recta se introdujo en la ecuación 1 y así se obtuvo la eficiencia.

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

Ec. 1

El programa de PCR ocupado para todos los ensayos de qRT-PCR, se compuso de una etapa de denaturación inicial a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos con las siguientes etapas: Denaturación a 95°C por 30 s, 59°C por 30 s para la unión de los partidores y por último una temperatura de elongación de 72°C por 30 s. La detección de los amplificados se realizó por fluorescencia al final del segundo paso de estos ciclos. Luego, se continuó un ciclo adicional que permitió realizar una curva de disociación al final de cada experimento. Este ciclo está compuesto de tres etapas: 95°C por 1 min, 60°C por 30 s y finalmente 95°C por 30 s. La detección de los amplificados se realizó por fluorescencia.

Para los ensayos cuantitativos en primer lugar se extrajo RNA (sección 2.3.1) desde las plantas de zanahoria en estudio, este se cuantificó y se determinó su integridad (sección 2.3.2). Después, se realizó la síntesis del cDNA y se evaluó su calidad con un PCR convencional para amplificar un fragmento del gen *18S* (sección 2.3.3).

En la determinación de la acumulación de los transcritos de los genes *lcyb1* y *lcyb2* en hojas y raíces de zanahorias silvestres de 4 y 12 semanas de desarrollo cultivadas en medio hidropónico (sección 2.5.7), se evaluó cada muestra biológica en triplicado biológico (cada uno obtenido de 3 plantas distintas) y en duplicado técnico, obteniéndose en total 6 valores para cada muestra. Para la comparación de la expresión del gen *lcyb2* en las hojas de las zanahorias silvestres (wt) versus las hojas de las zanahorias transgénicas generadas, se obtuvo la muestra desde estas zanahorias crecidas en tierra (sección 2.5.5), evaluándose la muestra silvestre (obtenido de 3 plantas distintas) y las líneas transgénicas en triplicado técnico.

El programa y la mezcla de reacción de PCR fueron los mismos utilizados para la determinación de la eficiencia de los partidores, pero en este caso se reemplazaron los 2  $\mu$ L de cada dilución seriada por 2  $\mu$ L de una dilución 1/10 de cada cDNA. Se realizó un control negativo, denominado "NTC" (con sus respectivas réplicas técnicas) para cada gen analizado, al cual se le agregaron 2  $\mu$ L de agua libre de nucleasas en lugar de 2  $\mu$ L de una dilución de cDNA. Además, se realizaron controles sin RT, denominados como "no RT", en los que en lugar de cDNA se utilizaron 2  $\mu$ L de una dilución del RNA tratado con DNasa I de cada muestra, con el fin de confirmar la ausencia de DNA en las muestras de cDNA (previamente analizadas en el PCR convencional hecho para evaluar la calidad de los cDNA sintetizados).

#### **2.3.9.3 Análisis de los datos del RT-PCR cuantitativo.**

En primer lugar se verificó que las curvas de amplificación tuvieran la característica forma sigmoidea y luego se observaron las curvas de disociación para cada fragmento génico amplificado, en las que se espera observar un único y pronunciado pico para cada amplificado, confirmando la especificidad de los partidores diseñados. Además a partir de esta curva se

determina la temperatura de disociación ( $T_m$ ) de los fragmentos y ésta se puede comparar con la calculada en forma teórica.

Para los controles negativos (NTC) y sin RT (no RT), se espera que la fluorescencia no sobrepase la línea umbral y si la hace se tomó como criterio de confiabilidad de los datos obtenidos que el Ct del producto amplificado en estos controles apareciera 10 ciclos más tarde que los de las muestras (Introduction to Quantitative PCR: Methods and application guide).

Una vez obtenidos los datos se procedió a realizar los cálculos para determinar los niveles de acumulación de los mRNAs de *lcyb1* y *lcyb2* en relación a los niveles de acumulación del mRNA de *18S* (gen normalizador). El normalizador se utiliza para uniformar posibles diferencias originadas por utilizar cantidades variables de cDNA o bien por variaciones en la extracción y cuantificación del RNA y a la eficiencia de la transcripción reversa (Introduction to Quantitative PCR: Methods and application guide).

Los valores de Ct fueron incorporados en la Ecuación 2, descrita por Pfaffl (2001), junto a los valores de eficiencia de cada par de primarios. Luego, se determinaron los grupos de datos a comparar y se decidió cual sería el calibrador para cada caso.

$$\text{Razón} = \frac{(E_{\text{gen objetivo}})^{-(Ct_{\text{gen objetivo}} - Ct_{\text{calibrador gen objetivo}})}}{(E_{\text{gen normalizador}})^{-(Ct_{\text{normalizador}} - Ct_{\text{calibrador normalizador}})}} \quad \text{Ec.2}$$

El calibrador actúa como una referencia de expresión de un gen objetivo determinado comparando la concentración relativa del mRNA del gen de interés con la de una muestra control (calibrador). El calibrador se usa en adición al gen normalizador.

En este seminario de título se usó como calibrador la expresión promedio del gen analizado en la planta silvestre cuando se evaluó la expresión del gen *lcyb2* en las líneas transgénicas. Por otra parte cuando se analizaron los niveles de los mRNAs de *lcyb1* y *lcyb2* en hojas y raíces de *D. carota* silvestres de 4 y 12 semanas de desarrollo, se utilizó como

calibrador el promedio de los valores de Ct de cada gen en hojas y raíces (Figura 9). Debido a que los calibradores son diferentes, no se pueden comparar los datos de un gráfico con otro.

#### 2.3.9.4. Análisis estadístico.

Los datos de abundancia relativa de los mRNAs fueron graficados y analizados mediante el programa GraphPad Prism. Para los gráficos en que se compararon los niveles de abundancia relativa de los genes *lcyb1* y *lcyb2* en las hojas versus las raíces (Figura 9), las diferencias estadísticas fueron evaluadas mediante el test no pareado de T, con corrección de Welch. En el caso en que se graficó el valor de abundancia relativa a *18S* del mRNA de *lcyb2* en las plantas transgénicas generadas (Figura 22), se utilizó el test de ANOVA de una vía para determinar si existía una variación significativa ( $p < 0,05$ ) en los promedios de cada conjunto de 3 réplicas técnicas, seguido de un post-test de Tukey de comparación múltiple, para evaluar si las diferencias entre el promedio de las réplicas era significativo ( $p < 0,05$ ). Las diferencias significativas fueron indicadas con asteriscos en todos los gráficos.

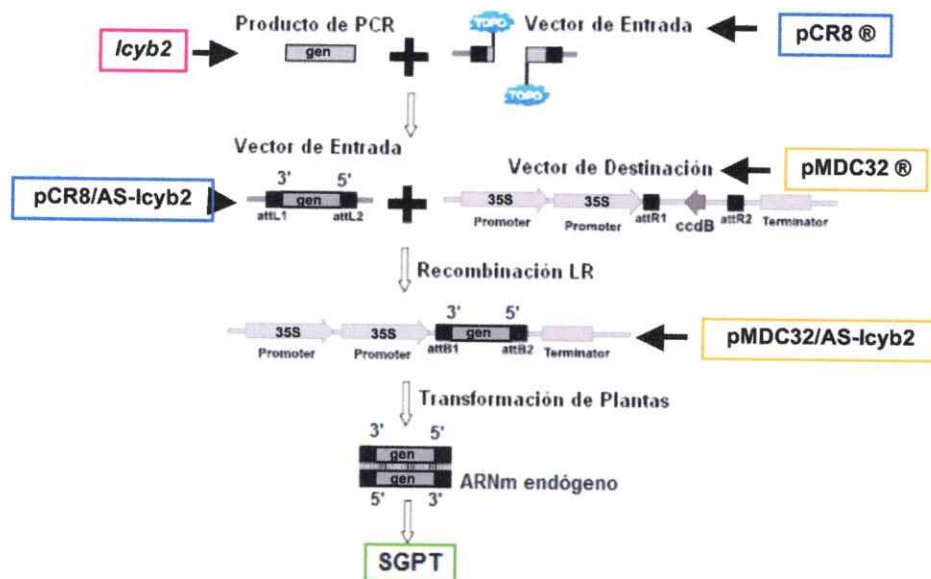
## 2:4 CONSTRUCCIONES GENÉTICAS

### 2.4.1 Tecnología Gateway®.

En este seminario de título, la generación de una construcción genética para el silenciamiento de *lcyb2*, se llevó a cabo mediante la tecnología Gateway®, a través de una reacción de recombinación LR (Figura 4), que es catalizada por la LR Clonasa™ (Invitrogen) (Catálogo Gateway® Technology Invitrogen). En esta reacción la recombinación ocurre entre un sustrato con los sitios attL (portados por un vector denominado de entrada) y un sustrato con los sitios attR (portados por un vector llamado de destinación).

Para ingresar la secuencia de interés a la plataforma de clonación Gateway®, se utilizó como vector de entrada a pCR8®/GW/TOPO®TA (Invitrogen), que para simplificar será llamado pCR8®. Este vector cuenta con una enzima del tipo topoisomerasa unida covalentemente a él, denominada comercialmente TOPO®, que es capaz de ligar las hebras de DNA de la secuencia

de interés, en este caso un producto de PCR, con dicho vector de entrada y luego la enzima es escindida del vector. Como vector de destinación se ocupó a pMDC32 (adquirido desde el stock ABRC del sitio Tair, N° de stock CD3-738), con el objetivo de tener el fragmento de *Icyb2* en antisentido bajo el control del doble promotor constitutivo CaMV 35S, de manera que al expresarse este fragmento en antisentido hibride con el mRNA endógeno en orientación sentido, formando el RNA doble hebra, que gatillará el silenciamiento de este gen (Figura 3 y 4). Además, este vector de destinación posee entre los sitios attR un cassette que contiene el gen *ccdB*, que es reemplazado por el gen de interés después de la recombinación. La proteína CcdB, interfiere con la proteína DNA girasa de *E.coli*, inhibiendo el crecimiento de las cepas de *E.coli* más utilizadas en el laboratorio (Ej: DH5 $\alpha$  y TOP10). De está forma después de transformar las células con el producto de la recombinación, no sobrevivirán aquellas que posean el vector de destinación sin recombinar, facilitando así el análisis posterior de las colonias generadas (Catálogo Gateway® Technology Invitrogen).



**Figura 4: Esquema de la recombinación LR del sistema Gateway®.** La reacción de recombinación LR, ocurre entre los sitios attL y attR de los vectores de entrada (pCR8®) y destino (pMDC32) respectivamente. El vector pCR8® cuenta con una enzima llamada TOPO® unida covalentemente a él, que puede ligar las hebras de DNA de un producto de PCR con el vector de entrada. El vector pMDC32 cuenta con el doble promotor CaMV 35S que permitirá la sobreexpresión de un fragmento de *Icyb2* en antisentido, para gatillar su SGPT y además posee un cassette con el gen *ccdB*, para la selección negativa de los vectores de destino en *E.coli*. Modificado de Helliwell y Waterhouse (2003)

**Tabla 2: Vectores utilizados en este seminario de título.** Se menciona el nombre de los vectores, el sitio donde se adquirieron, su tamaño en pares de base y el antibiótico al cual confieren resistencia en bacterias y plantas transformadas con éstos.

Nombre del vector	Tamaño (pb)	Resistencia conferida
pGEM-T <sup>®</sup> (Promega)	3589	Ampicilina (100 mg/L) en bacterias
pCR8 <sup>®</sup> /GW/TOPO <sup>®</sup> -TA(Invitrogen)	2817	Espectinomicina (100 mg/L) en bacterias
pMDC32 ( stock ABRC del sitio Tair)	11752	Kanamicina (100 mg/L) en bacterias Higromicina (8 mg/L) en plantas

#### 2.4.2 Generación del vector pMDC32/AS-*lcyb2* para el silenciamiento génico post-transcripcional del gen *lcyb2*.

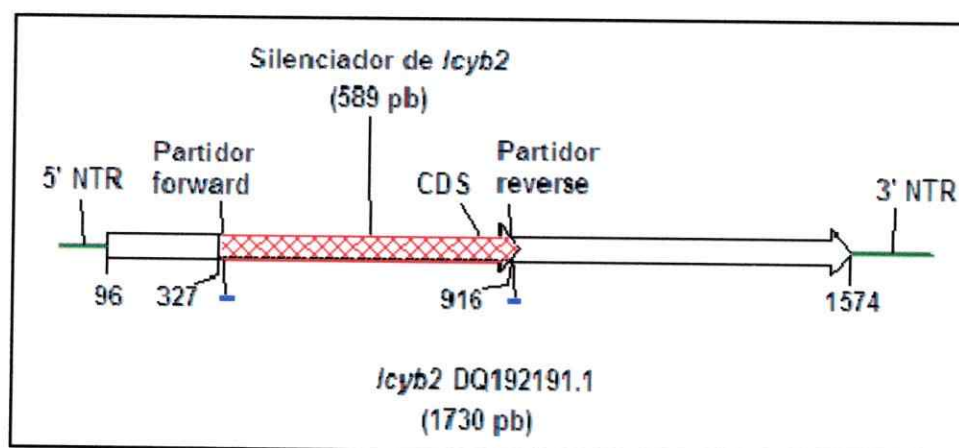
##### 2.4.2.1 Diseño de los partidores para amplificar un fragmento conservado de *lcyb2* de *D. carota*

Se buscó en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) las secuencias anotadas para el gen *ccs* (candidata capsantina capsorrubina sintasa) de *D. carota*, encontrando una secuencia parcial [AF208530] y una completa [DQ192191] que poseen un 98% de identidad nucleotídica en 497 pb. Para el diseño de los partidores sólo se consideró la secuencia completa del gen *ccs*, que tiene un tamaño de 1730 pb y su región codificante (CDS) abarca del nucleótido 96 al 1574. Este gen se encuentra anotado como *lcyb2* y es así como se denominará a lo largo de este seminario de título.

Utilizando la herramienta blast del servidor NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), se realizó un alineamiento del gen [DQ192191] (*ccs* de *Daucus carota*), con los genes [AF169241] (*ccs* de *Citrus sinensis*), [AF254793] (*lcyb* específico de cromoplasto de *Solanum lycopersicum*) y [X76165] (*ccs* de *Capsicum annuum*). Para el diseño de los partidores, se eligió una región en que las cuatro secuencias tuvieran el mayor porcentaje de identidad nucleotídica (entre un 71 y 74%), abarcando desde 327 pb hasta 916 pb de la región codificante de [DQ192191] (Figura 5).

Además, se realizó un alineamiento de este fragmento de *lcyb2* con la secuencia de *lcyb1* de *D. carota* [DQ192190], encontrando que en esta región tienen sólo un 58% de identidad nucleotídica, en consecuencia el silenciamiento estaría dirigido específicamente a *lcyb2*.

Los partidores (F-*lcyb2* GATE y R-*lcyb2* GATE, Tabla 1), se analizaron en la página web <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>, usando el mismo criterio que para el diseño de los partidores de la sección 2.3.9.1. Se verificó si estos partidores amplificaban el tamaño esperado de 589 pb, realizando una reacción de PCR a distintas temperaturas para el apareamiento de los partidores y utilizando cDNA de *D. carota* como molde (sección 2.3.3.2).



**Figura 5: Esquema de la región del gen *lcyb2* utilizada para el silenciamiento génico.** Para el diseño de los partidores (*lcyb2*-GATE, ver Tabla 1) para amplificar un fragmento conservado del gen *lcyb2* [DQ192191] de *D. carota*, se escogió una zona interna de la región codificante (CDS), que se extiende de la base 327 a la 916 del gen (589 pb).

#### 2.4.2.2 Clonación del fragmento del gen *lcyb2* en el vector de entrada pCR8®.

En un principio no se contaba con el vector de entrada pCR8®, por lo que se clonó el fragmento de 589 pb de una región interna del gen *lcyb2* obtenido por RT-PCR (sección 2.3.3.2) en el vector pGEM-T® (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. A partir de un clon positivo pGEMT-*lcyb2* se purificó DNA plasmidial (sección 2.3.5) y se amplificó por PCR el fragmento clonado de *lcyb2*, el que luego se clonó en el vector pCR8®. La reacción se compuso de 2 µL de producto de PCR, 2 µL de agua NP, 1 µL de solución salina y 1 µL de vector pCR8®.

Todos los componentes antes mencionados se mezclaron suavemente y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min. Luego se tomaron 2  $\mu$ L de la reacción y se transformaron mediante shock térmico células de *E.coli* cepa DH5 $\alpha$  químicamente competentes (sección 2.5.2). Las colonias generadas, se analizaron por PCR de colonias (sección 2.3.4) y se guardó un stock en glicerol a -80°C de los clones positivos. De estos se escogieron 3 clones al azar, para purificar su DNA plasmidial (sección 2.3.5) y analizarlos por digestión enzimática, para determinar la orientación en que se produjo la clonación del fragmento de *lcyb2* (sección 2.3.6).

#### **2.4.2.3 Obtención del vector pMDC32/AS-*lcyb2*.**

Una vez seleccionado el clon que posee el vector de entrada pCR8/*lcyb2* con el fragmento de *lcyb2* en antisentido, se hizo una digestión simple de su DNA plasmidial (sección 2.3.6) para linealizarlo y favorecer su recombinación con el vector de destinación pMDC32. La reacción de recombinación se compuso de 4  $\mu$ L del vector de entrada pCR8/*lcyb2* lineal (140 ng), 1  $\mu$ L del vector de destinación pMDC32 (50 ng), 2  $\mu$ L de LR Clonasa<sup>TM</sup> II (Invitrogen) y 1  $\mu$ L de amortiguador TE pH 8 para completar 8  $\mu$ L. La mezcla se agitó suavemente y se dejó incubando toda la noche a 25°C. Para detener la reacción se agregó 1  $\mu$ L de Proteínasa K (Invitrogen) y se incubó durante 10 min a 37°C. Finalmente, se transformaron las bacterias competentes de *E.coli* cepa DH5 $\alpha$  por shock térmico (sección 2.5.2) y se seleccionaron los clones transformantes en placas de LB sólido con kanamicina (100 mg/L) (Tabla 2).

Mediante los análisis de PCR de colonias y digestión enzimática (secciones 2.3.4 y 2.3.6 respectivamente) se determinó la orientación antisentido (AS) de *lcyb2* en el vector de destinación y uno de los clones positivos, pMDC32/AS-*lcyb2*, se secuenció en MacroGen Co. (USA), utilizando el partidador F-*lcyb2* GATE (Tabla 1).

#### **2.4.2.4 Evaluación de la funcionalidad del vector pMDC32/AS-*lcyb2* en *N. tabacum*.**

Para evaluar la funcionalidad de la construcción pMDC32/AS-*lcyb2*, se transformaron células de *A. tumefaciens* competentes (sección 2.5.3) con el vector pMDC32AS-*lcyb2* y con el



vector pMDC32 (sin el fragmento de *lcyb2*) que fue usado como control. Luego, se agroinfiltraron hojas de tabaco con estas bacterias (sección 2.5.4), para posteriormente determinar mediante RT-PCR la expresión del fragmento de 589 pb del gen *lcyb2*.

## **2.5 CULTIVO Y MATERIAL BIOLÓGICO**

### **2.5.1 Cultivo de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*.**

Las bacterias *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  fueron crecidas en medio LB líquido (triptona 2% p/v y NaCl 0,8 % p/v) y sólido (triptona 2% p/v, NaCl 0,8 % p/v y agar 1,6% p/v) durante 14 a 16 horas, a una temperatura de 37 °C con agitación de 250 a 300 rpm en el caso de cultivo líquido.

En el caso de las bacterias *A.tumefaciens* de la cepa GV3101, estas se crecieron en medio LB líquido y sólido por 36 a 48 h, a una temperatura de 28 °C en presencia de rifampicina (10 mg/L) y gentamicina (50 mg/L). Además, siempre se agregó al medio el antibiótico correspondiente para seleccionar a las bacterias con el vector de interés (Tabla 2). De todos los cultivos líquidos se guardó una alícuota en glicerol a -80°C, tomando 500  $\mu$ L del cultivo y 300  $\mu$ L de glicerol al 80% (v/v).

### **2.5.2. Transformación de *E.coli* competentes.**

En primer lugar se prepararon células de *E.coli* cepa DH5 $\alpha$  competentes. Para esto se tomó una alícuota de 1 mL de un cultivo de noche, se depositó en 100 mL de medio LB líquido y se puso a crecer por 3 h hasta una D.O.<sub>600</sub> de 0,6. Después, se centrifugaron 50 mL de las células en dos tubos de 25 mL a 3000 rpm por 10 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 10 mL de solución de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M fría y se incubó por 30 min a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 2000 rpm por 5 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en 2 mL de solución de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M. De esta forma se obtuvieron células químicamente competentes, las que se guardaron en alícuotas de 200  $\mu$ L en glicerol a -80 °C.

Para la transformación se mezclaron 50  $\mu$ L de las bacterias *E. coli* competentes con la reacción de ligación de interés y se mantuvieron en hielo durante 30 min. Luego, se aplicó un golpe térmico a 42°C por 1,5 min y la mezcla se depositó rápidamente en hielo por 1 min. A continuación, la mezcla se agregó a 1 mL de LB-líquido y se dejó incubando durante 1 h a 37°C con agitación. Posteriormente, se sembró 100  $\mu$ L de las células transformadas en una placa con LB sólido y el antibiótico correspondiente. El resto se centrifugó por 30 s a 10000 x g, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en lo que quedó de medio, el cual se sembró en otra placa. Las placas se dejaron a 37°C toda la noche hasta la aparición de las colonias.

### **2.5.3 Transformación de *A.tumefaciens* competentes.**

En primer lugar se prepararon células de *A. tumefaciens* de la cepa GV3101 competentes. Para esto se realizó un cultivo de 4 mL en medio LB líquido con rifampicina 10 mg/L y gentamicina 50 mg/L en agitación durante 18 horas a 28°C (sección 2.5.1). Este cultivo fue vertido en 100 mL de LB con los mismos antibióticos y se incubó con agitación hasta una D.O.<sub>600</sub> de 0,5. Después, se mantuvo en hielo durante 10 min y se centrifugó a 3.000 x g por 20 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM estéril y frío. Finalmente, se separó en alícuotas de 100  $\mu$ L, las que se congelaron en nitrógeno líquido para ser guardadas a -80°C hasta su utilización.

Para la transformación, se descongeló en hielo una alícuota de 100  $\mu$ L de las células de *A. tumefaciens* competentes y se mezclaron con 500 ng del vector binario (pMDC32 y pMDC32/AS-lcyb2). Se dejó 20 min en hielo y se congeló en nitrógeno líquido durante 5 min. Luego se descongeló a temperatura ambiente durante 15 min y la mezcla se incubó en 1 mL de medio LB a 28°C durante toda la noche con agitación.

Finalmente, trabajando en condiciones de esterilidad, se prepararon cuatro placas con LB sólido y antibióticos (rifampicina 10 mg/L, gentamicina 50mg/L, kanamicina 100 mg/L). En dos de ellas por separado se sembraron 50  $\mu$ L del cultivo de las células transformadas con el

vector pMDC32 y pMDC32/AS-*lcyb2*. El resto de cada cultivo se centrifugó por 30 s a 8000 x g, y se sembraron en las otras dos placas. Todas fueron incubadas en una estufa a 28°C por 48 h.

#### **2.5.4 Transformación transitoria de *Nicotiana tabacum*.**

El día anterior a la agroinfiltración se dejó creciendo una alícuota de los clones A2.1, A2.2 y A2.3 que poseen la construcción pMDC32/AS-*lcyb2* y el clon 2 de *A.tumefaciens* transformada con pMDC32 (A2.C) en 5 mL de LB líquido con los antibióticos rifampicina (10 mg/L), gentamicina (50mg/L) y kanamicina (100 mg/L), en agitación por 18 h a 28°C. Además, se preparó medio de infiltración (MgCl<sub>2</sub> 25 mM, MES 10 mM, acetoseringona 200 µM, a pH 5,7). Al día siguiente a cada cultivo de noche se le agregó LB líquido con antibióticos (rifampicina 10 mg/L, gentamicina 50mg/L y kanamicina 100 mg/L) y acetoseringona 20 µM hasta completar un volumen de 20 mL. Los cultivos se mantuvieron en agitación a 28°C hasta que alcanzaron una DO<sub>600</sub> de 1, luego se centrifugaron a 5000 x g por 10 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 20 mL de medio de infiltración.

Para la infiltración de las hojas de tabaco, se asperjaron las hojas para inducir la apertura de los estomas, luego se tomó con una jeringa sin aguja el cultivo de bacterias en el medio de infiltración y la jeringa se presionó contra el envés de la hoja induciendo la entrada de la solución a la hoja y finalmente se volvió a asperjar con agua para eliminar el exceso de *A.tumefaciens*. Después de tres días se extrajo el RNA total (sección 2.3.1) desde las hojas de tabaco agroinfiltradas y también de una sin infiltrar (control negativo), con el objetivo de realizar un RT-PCR para detectar el amplificado del fragmento de 589 pb del gen *lcyb2* de *D. carota* portado por la construcción pMDC32/*lcyb2* que se estaría expresando en las hojas de tabaco

#### **2.5.5 Transformación estable de *Daucus carota*.**

La transformación y la embriogénesis somática de zanahoria se basó en el protocolo descrito por Chen y Punja (2002). Los clones de *A. tumefaciens* A2.2 (transformada con la construcción pMDC32/AS-*lcyb2*) y A2.C (transformada con el vector pMDC32, utilizado como

control) se crecieron toda la noche en 5 mL de medio LB con antibióticos (rifampicina 10 µg/mL, gentamicina 50 µg/mL y kanamicina 100 mg/L). Luego, el medio de cultivo se centrifugó a 5000 x g por 10 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 25 mL de medio MS líquido con 0,8 mM de acetosiringona. Se incubó con agitación por aproximadamente 3 h a 28°C, hasta una D.O.<sub>600</sub> de 0,6.

Se cortaron segmentos de 1 cm de hipocotilo de *D. carota* silvestre y de la línea silenciada para *lcyb1* y se esterilizaron en hipoclorito de sodio al 20%. Los explantes, se incubaron por 10 min en agitación en una placa Petri y se realizaron 2 lavados con agua destilada estéril. Luego, en ambiente estéril se depositó el cultivo de *A. tumefaciens* en una placa Petri y se co-incubó con los explantes de hipocotilo por 10 min, a éstos se les hicieron pequeñas heridas con un bisturí para facilitar la infección de *A. tumefaciens*. A continuación, los explantes se secaron en papel absorbente estéril, se depositaron en medio MS sólido y se mantuvieron en oscuridad por 36 h. Luego, los explantes se lavaron con agua destilada estéril para eliminar el exceso de *A. tumefaciens* y se depositaron en nuevas placas con medio I, compuesto de MS sólido con los antibióticos cefotaxime (300mg/L) para eliminar a *A. tumefaciens* e higromicina (2mg/L) como agente de selección, además de la auxina sintética 2,4D (1 mg/L) necesaria para la inducción de la embriogénesis somática de *D. carota*. Después de 6 semanas en oscuridad, los explantes se pasaron al medio II, compuesto por MS sólido con cefotaxime (300 mg/L), higromicina (4 mg/L) y 2,4D (0,5 mg/L). Después de 8 semanas, con fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, los explantes desarrollaron embriones en estado inmaduro y se pasaron al medio III, en que se aumentó la concentración de higromicina a 8 mg/L, el cefotaxime se redujo a 150mg/L y se eliminó la hormona 2,4D para favorecer la maduración de los embriones, generándose plántulas. Luego de 4 semanas, las plántulas generadas se pasaron a frascos con medio III donde elongaron y enraizaron. Después de 4 meses, se obtuvieron plántulas con raíces apropiadas para su aclimatación en tierra (mezcla esterilizada y húmeda de tierra de hoja y vermiculita en proporción 3:1). Durante la aclimatación de las plantas, éstas se cubrieron con un vaso plástico para conservar la alta humedad a la que

fueron sometidas durante su cultivo *in vitro*. Se mantuvieron en un invernadero cerrado, con una temperatura constante de 22°C y fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. Luego de 2 semanas, las plantas se comenzaron a destapar gradualmente.

#### **2.5.6 Construcción de la curva de resistencia al antibiótico higromicina, para *D. carota*.**

Previo a la transformación estable de zanahorias con la construcción generada para el silenciamiento de *lcyb2*, fue necesario establecer la concentración de higromicina a la cual las plantas silvestres de *D. carota* son sensibles y no pueden desarrollar embiogénesis somática.

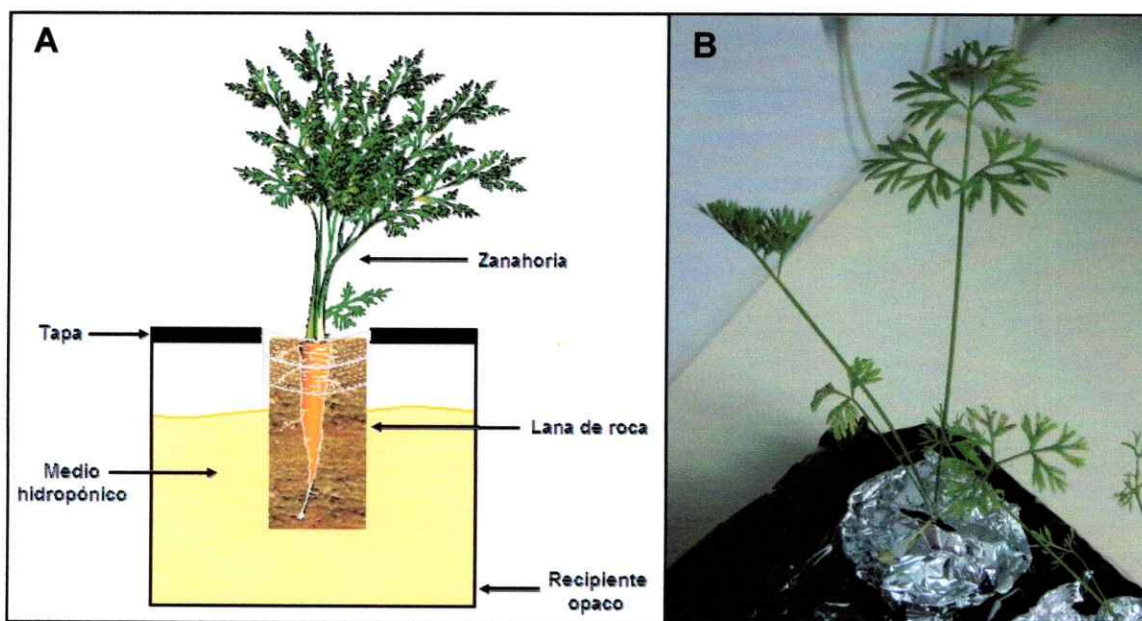
Se cortaron explantes de 1 cm de hipocotilos de zanahorias silvestres y se esterilizaron con hipoclorito de sodio (sección 2.5.5). Los explantes se depositaron en placas de Petri con medio MS sólido suplementado con 2,4D (1 mg/L) y distintas concentraciones de higromicina (2, 4, 8 y 10 mg/L). Se hicieron 2 placas para cada concentración de antibiótico evaluada y en cada una se depositaron 8 explantes. Al cabo de un mes se contó el número de explantes que presentaron desarrollo embriogénico y se construyó un gráfico de porcentaje de explantes con desarrollo embriogénico respecto a la concentración de higromicina presente en el medio (Figura 8). Posteriormente, se realizó una curva equivalente a partir de explantes de zanahorias silvestres que ya habían desarrollado tejido embriogénico luego de ser cultivados dos meses en medio de inducción de embriogénesis somática. Los explantes con desarrollo embriogénico fueron traspasados a placas con MS sólido sin hormonas para favorecer la maduración de los embriones y con distintas concentraciones de higromicina (2, 4, 8 y 10 mg/L), después de un mes se traspasaron a frascos con MS sólido sin hormonas, manteniendo la misma concentración del antibiótico. Al cabo de un mes se procedió a contar el número de explantes que generó plántulas a las distintas concentraciones de higromicina evaluadas.

#### **2.5.7 Cultivo de *Daucus carota* en medio hidropónico.**

En este seminario de título se emplearon dos métodos para el cultivo de zanahorias. El primero de ellos mencionado en la sección 2.5.5, en que las plantas fueron generadas *in vitro* y

luego traspasadas a tierra y el segundo correspondió al cultivo hidropónico. El medio hidropónico utilizado fue una solución nutritiva con las concentraciones de macro y micronutrientes descritos por Gibeaut D. y col. (1997). Esta fue preparada inicialmente a una concentración 100X a pH 5.0 conteniendo  $\text{KNO}_3$  125 mM,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  150 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  75 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, KCl 5 mM,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  5 mM,  $\text{MnSO}_4$  1 mM,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  200  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuSO}_4$  150  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si}$  10 mM y Fe quelado en DTPA 10 mM.

Para montar el sistema de raíz flotante hidropónica, se utilizaron cajas de plástico de 15x20x10 cm con tapa, que fueron forradas con bolsa de basura negra para mantener la oscuridad en la zona en que se desarrollaron las raíces de las zanahorias. En las tapas se les hicieron 6 orificios en los que se introdujo un trozo de lana de roca, que fue humedecida con medio hidropónico 1X y sobre ésta se depositó una semilla de *D. carota* var. Nantes adquirida comercialmente. Se agregó medio hidropónico 1X a las cajas hasta cubrir la lana de roca y se mantuvo este nivel adicionando semanalmente medio de cultivo a las cajas (Figura 6).



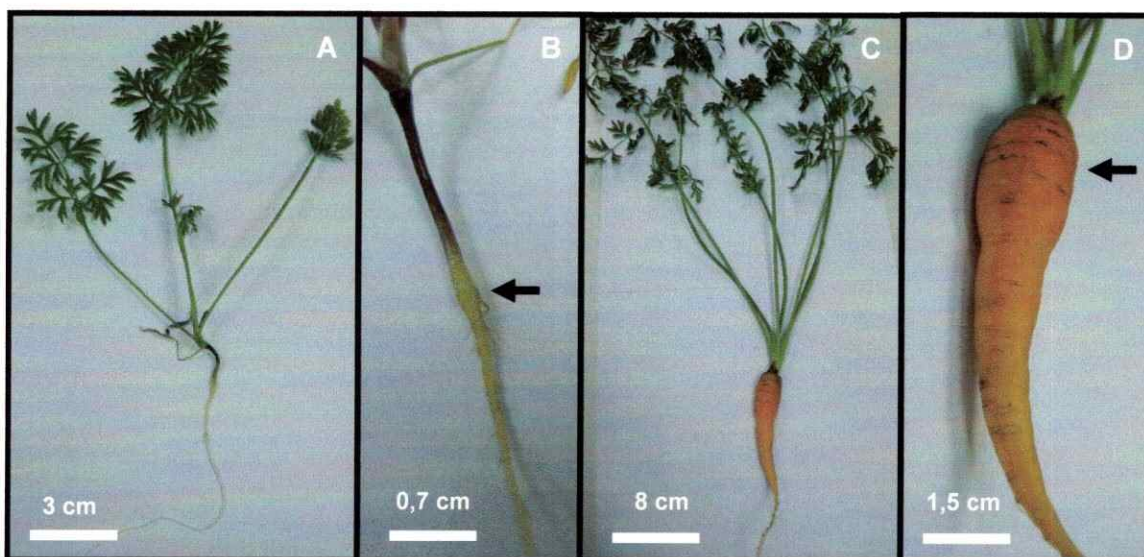
**Figura 6: Cultivo de zanahorias en medio hidropónico.** A. Representación esquemática de los componentes del sistema de cultivo hidropónico de raíz flotante. B. Fotografía de una zanahoria cultivada en medio hidropónico.

### 3. RESULTADOS

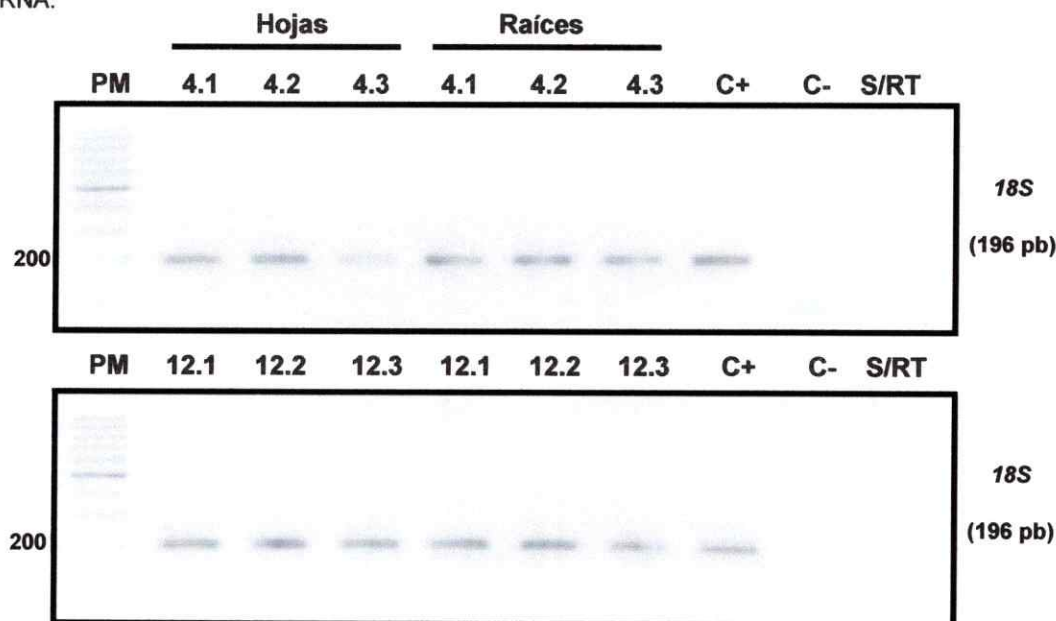
#### 3.1 Cuantificación de los transcritos de los genes carotenogénicos *lcyb1* y *lcyb2* en las hojas y la raíz modificada de *D. carota*.

Después de sembrar las semillas de *D. carota* en el sistema hidropónico (sección 2.5.7), se siguió el curso del desarrollo de las plantas durante 3 meses. Tras 4 semanas, se obtuvieron plantas jóvenes inmaduras, en las cuales aún no se apreció el engrosamiento de la raíz modificada. Estas plantas alcanzaron una longitud promedio de 14 cm (10 cm correspondieron a tallo-hojas y 4 cm a raíz). La raíz de 4 semanas, en la región que se desarrolló sobre la lana de roca y expuesta a la luz presentó una coloración púrpura, mientras que la que permaneció en oscuridad presentó una coloración amarilla-blancuecina (Figura 7 A y B). Al cabo de 12 semanas creciendo en medio hidropónico, se obtuvieron plantas de zanahoria adulta, en las cuales la raíz modificada alcanza su desarrollo maduro, presentado elevados niveles de carotenoides (Stange y col., 2008) y una coloración naranja. Estas plantas alcanzaron una longitud promedio de 53 cm, con un tallo-hojas de 44 cm y una raíz modificada de 9 cm (Figura 7 C y D).

Se tomaron grupos de 3 plantas de zanahorias de cada estadio (cada grupo correspondió a una réplica biológica) y se procedió a extraer el RNA de las hojas y de la raíz, específicamente de la zona que se desarrolló en la oscuridad. Luego de evaluar la integridad y calidad del RNA extraído, se realizó la síntesis de cDNA y la amplificación por PCR de un fragmento del gen *18S*. Para todas las muestras se obtuvo la banda del tamaño esperado y de una intensidad similar (Figura 8), por lo que los cDNA eran de la calidad adecuada para realizar los ensayos de RT-PCR cuantitativo.



**Figura 7:** Plantas de *D.carota* variedad Nantes de 4 y 12 semanas de desarrollo cultivadas en medio hidropónico. A) Zanahoria de 4 semanas de desarrollo. B) Raíz de la zanahoria de 4 semanas de desarrollo. C) Zanahoria de 12 semanas de desarrollo. D) Raíz de la zanahoria de 12 semanas de desarrollo. Con una flecha se indica la región de la raíz que se escogió para hacer las extracciones del RNA.



**Figura 8:** RT-PCR del gen *18S* para probar la calidad del cDNA sintetizado a partir del RNA de las zanahorias de 4 y 12 semanas. PM: 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas). 4.1, 4.2 y 4.3: 8  $\mu$ L del producto de PCR amplificando cDNA de las hojas y las raíces de 3 réplicas biológicas para las zanahorias de 4 semanas. 12.1, 12.2 y 12.3: 8  $\mu$ L del producto de PCR amplificando cDNA de las hojas y las raíces de 3 réplicas biológicas para las zanahorias de 12 semanas. C+: control positivo de la reacción realizada con DNA de *D.carota* silvestre. C-: control negativo de la reacción realizada sin DNA. S/RT: Control del RT-PCR en el que, como molde se utilizó RNA tratado con DNasa I (Fermentas). En esta figura se puede observar que se obtuvo el amplificado del tamaño esperado (196 pb) en todas las muestras evaluadas. Geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio y corridos por 40 min a 100+/- 1 V.

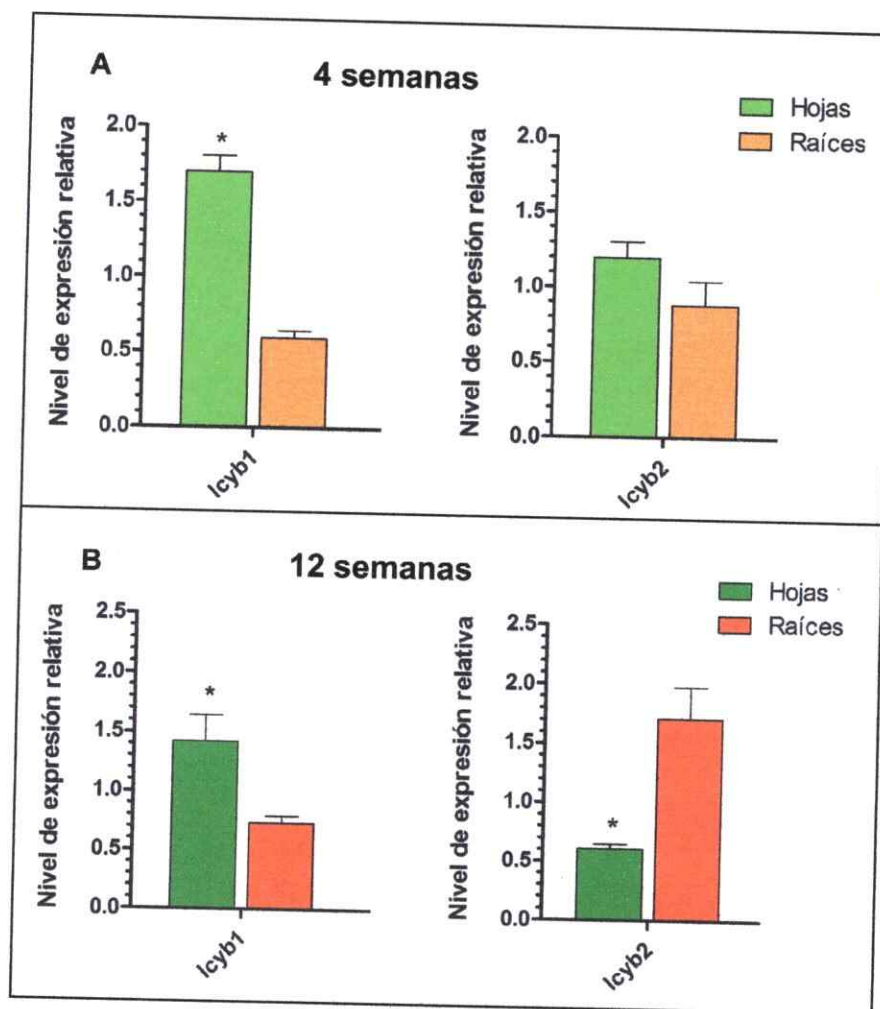


Para analizar los datos del RT-PCR cuantitativo, en primer lugar fue necesario establecer la eficiencia de los partidores que serían utilizados. Las eficiencias de los partidores para *lcyb1* y *18S* se determinaron con anterioridad en el laboratorio y son de 82% y 96% respectivamente (Fuentes, 2009 y Flores, 2010). En este seminario de título se determinó que la eficiencia de los partidores para *lcyb2* (F-*lcyb2q* y R-*lcyb2q*, Tabla 1) es de 100% (datos no mostrados).

Luego, se realizaron los experimentos de PCR en tiempo real para cuantificar la abundancia relativa de los RNAs mensajeros de los genes *lcyb1* y *lcyb2* en cada tejido (hoja y raíz) en los dos estados de desarrollo estudiados (4 y 12 semanas).

Al analizar las curvas de disociación para los genes *lcyb1*, *lcyb2* y *18S* se observó un único y agudo pico (datos no mostrados), evidenciando una amplificación específica de los genes objetivos.

La Figura 9 muestra los resultados del ensayo de qRT-PCR para determinar la expresión de los genes *lcyb1* y *lcyb2* en plantas de zanahorias silvestres. Se observa que en las zanahorias de 4 semanas, existe un nivel de mRNA de *lcyb1* 2,8 veces mayor en las hojas que en la raíz modificada, mientras que la acumulación del mRNA de *lcyb2* no fue significativamente diferente en las hojas respecto a las raíces (Figura 9.A). Por otra parte en las zanahorias de 12 semanas se observaron diferencias significativas en la acumulación de ambos mRNAs en las hojas y las raíces, para *lcyb1* se cuantificó 1,9 veces más mRNA en las hojas que en las raíces, mientras que para *lcyb2* fue 2,8 veces mayor en las raíces que en las hojas (Figura 9.B).



**Figura 9: Niveles de mRNA de *lcyb1* y *lcyb2* en las hojas versus las raíces de *D. carota*.** El calibrador utilizado en cada gráfico corresponde al promedio de los valores de Ct de cada gen en las hojas y las raíces en zanahorias de 4 y 12 semanas (A y B respectivamente). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los niveles de expresión de cada gen entre los dos tejidos, determinadas por el test de T no-pareado con corrección de Welch ( $p < 0.05$ ). \*\*\* = extremadamente significativa ( $p < 0,001$ ), \*\* = muy significativa ( $0,001 < p < 0,01$ ) y \* = significativa ( $0,01 < p < 0,05$ ).

### 3.2 Construcción del vector pMDC32/AS-*lcyb2*

#### 3.2.1 Clonación de un fragmento de *lcyb2* en el vector de entrada pCR8®.

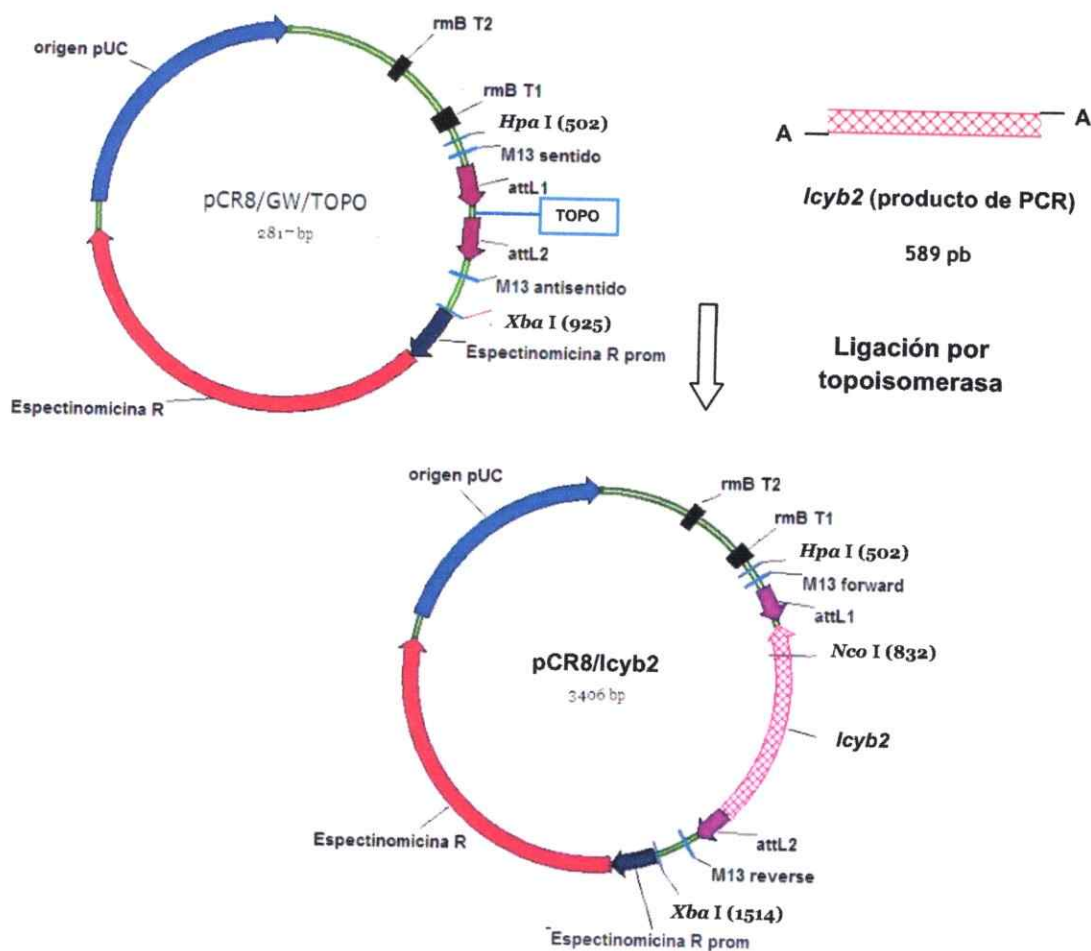
Con el objetivo de amplificar una región del cDNA de *lcyb2* para ser usado en la estrategia de silenciamiento, se extrajo el RNA total desde las hojas de *D. carota* silvestre como se describió en la sección 2.3.1. Después de evaluar la pureza e integridad del RNA (sección

2.3.2), se realizó una transcripción reversa (RT) y se obtuvieron los cDNAs de hebra simple complementarios a los mRNAs de la muestra utilizada (sección 2.3.3). Para probar la calidad del cDNA sintetizado, se realizó un PCR utilizando partidores que amplifican un fragmento de 196 pb de la subunidad ribosomal 18S (datos no mostrados). Una vez confirmado esto, se procedió con la amplificación del fragmento de 589 pb del gen *lcyb2* (sección 2.4.2.1), para lo cual fue necesario optimizar las condiciones de PCR, específicamente la temperatura de apareamiento de los partidores (sección 2.3.3.2)

A todas las temperaturas evaluadas, se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado (589 pb) y sin amplificadas inespecíficas (datos no mostrados). Sólo para tener mayor certeza de que la amplificación del fragmento de interés de *lcyb2* se hiciera en forma específica, se escogió la mayor temperatura de apareamiento de los partidores (56°C) y ésta se utilizó durante el desarrollo de este seminario de título.

En un comienzo no se contaba con el vector de entrada pCR8<sup>®</sup>, por lo que se utilizó el sistema pGEM-T (Promega), para clonar el fragmento de 589 pb del gen *lcyb2* de *D.carota* amplificado por RT-PCR (sección 2.3.3.2). Se utilizó el DNA plasmidial de un clon pGEM-T/*lcyb2* como molde para un PCR en el que se amplificó el fragmento de 589 pb el cual fue clonado en el vector de entrada pCR8<sup>®</sup> (sección 2.4.2.2), como se muestra en la Figura 10.

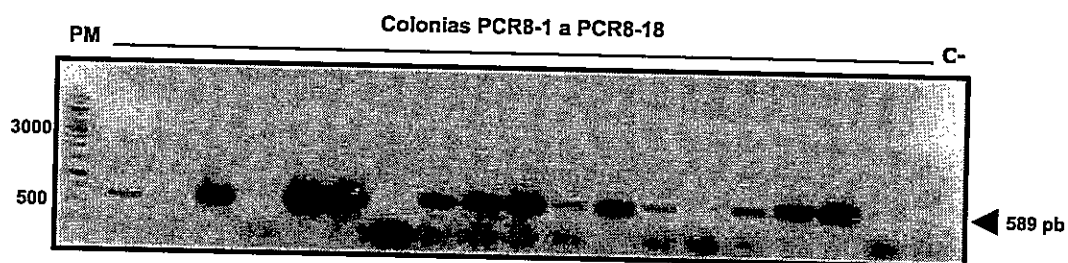
Posteriormente, se transformaron células competentes de *E.coli* cepa DH5 $\alpha$  y las colonias fueron seleccionadas en medio LB con el antibiótico de selección espectinomicina (sección 2.5.2 y Tabla 2).



**Figura 10: Esquema de la clonación del fragmento del gen *lcyb2* en el vector pCR8/GW/TOPO.** El fragmento de 589 pb del gen *lcyb2* de *Daucus carota* amplificado por PCR a partir del DNA plasmidial de pGEM-T/*lcyb2*, fue ligado al vector pCR8/GW/TOPO para generar el vector pCR8/*lcyb2*.

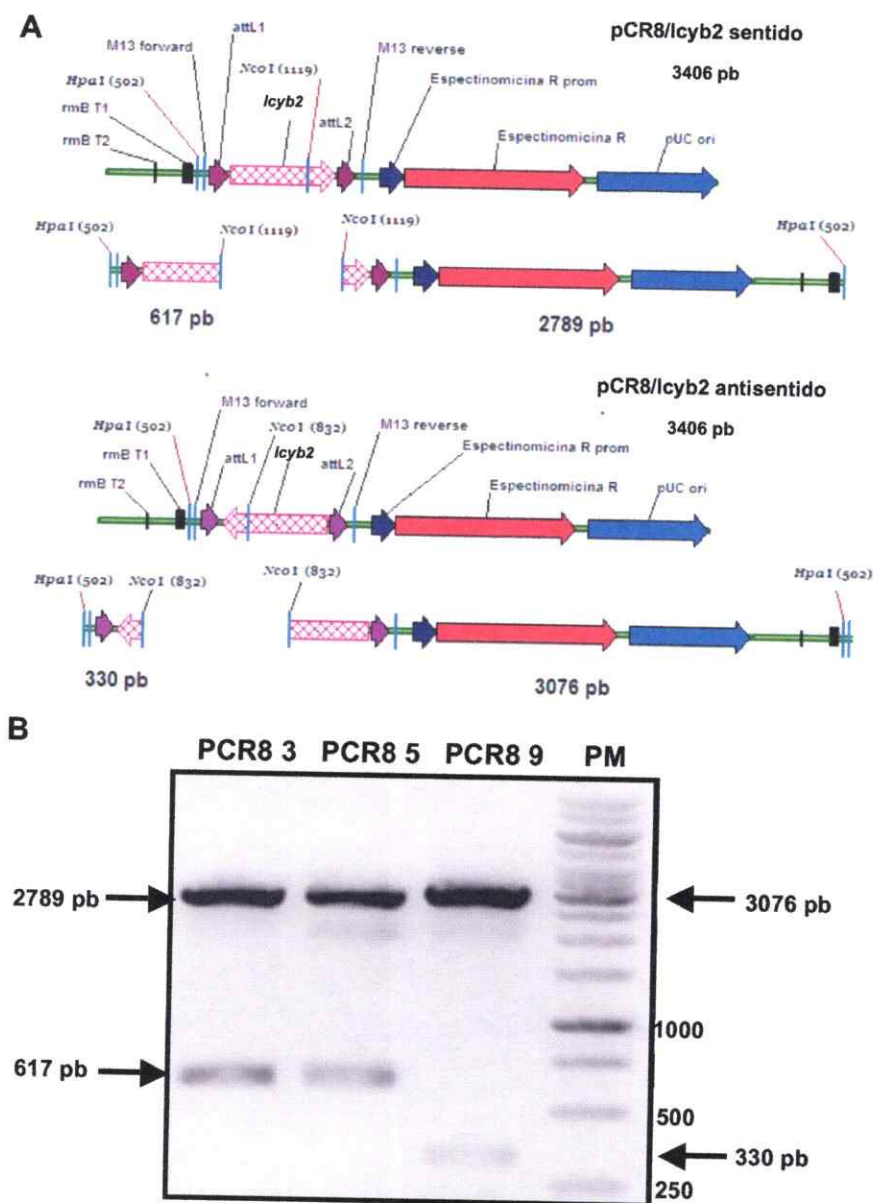
### 3.2.2 Análisis de la construcción pCR8/*lcyb2*

De las colonias que crecieron en el medio de selección, se escogieron 18 al azar y se sometieron al primer análisis, que fue un PCR directo de colonias (sección 2.3.4). En la Figura 11, se puede apreciar que se obtuvo un amplificado del tamaño esperado (589 pb) en 14 de los 18 clones analizados y no en el control negativo.



**Figura 11: PCR de colonias de *E.coli* transformadas con el vector pCR8/*lcyb2*.** PM: 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular de 1kb (Fermentas). Carril 2 al 9: 10  $\mu$ L del producto de PCR para las colonias 1 a la 18 de la clonación pCR8/*lcyb2*. C-: 10  $\mu$ L del control negativo de la reacción realizada sin DNA. La flecha muestra el amplificado de 589 pb del gen *lcyb2*. Gel de agarosa al 1%, corrido por 30 min a 111+/- 1 V.

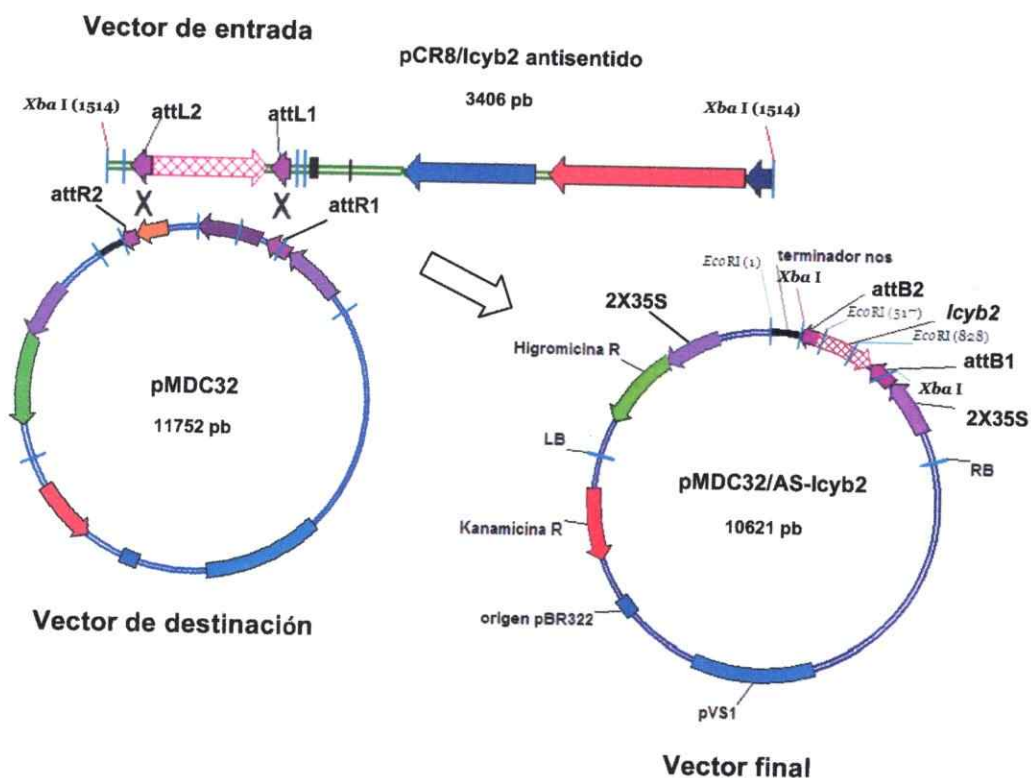
De los clones que resultaron positivos por el análisis de PCR, se escogieron 3 y se extrajo su DNA plasmidial mediante una minipreparación (sección 2.3.5). Estos DNAs, se utilizaron para un segundo análisis, que consistió en una digestión doble con las enzimas *Hpa* I + *Nco* I (sección 2.3.6). Con esta digestión, se confirmó que los clones poseen el fragmento de interés del gen *lcyb2* y se pudo determinar en que orientación se produjo la inserción de este fragmento en el vector pCR8<sup>®</sup>/GW/TOPO<sup>®</sup>TA. En la Figura 12.A, se muestran los fragmentos esperados para una digestión en sentido o antisentido del fragmento respecto a los sitios de recombinación attL. Al digerir los clones PCR8-3 y PCR8-5 se liberó un fragmento de 617 pb, mientras que al digerir el de PCR8-9 se liberó uno de 330 pb (Figura 12.B). Esto indica que los clones PCR8-3 y PCR8-5 poseen el fragmento de *lcyb2* en sentido, mientras que PCR8-9 en antisentido (Figura 12.A), que es la orientación deseada para los propósitos de generar el vector que permita silenciar el gen *lcyb2*, por lo que fue escogido para seguir con el procedimiento.



**Figura 12: Digestión doble del vector pCR8/lcyb2 con las enzimas *HpaI* y *NcoI*.** A) Esquema de la digestión en donde se indica el tamaño de los fragmentos liberados dependiendo de la dirección en que se produce la clonación del fragmento de 589 pb del gen *lcyb2*. B) Los carriles 1, 2 y 3 muestran la digestión del DNA plasmidial de los clones PCR8-3, 5 y 9 respectivamente. En los dos primeros se liberó una banda de 617 pb indicando que el fragmento de interés se clonó en sentido con respecto a las regiones de recombinación attL1 y attL2, mientras que para el clon PCR8 9 se liberó un fragmento de 330 pb indicando que la clonación ocurrió en antisentido. Gel de agarosa al 1%, con bromuro de etidio, corrido por 30 min a 110+/-1 V. Carril 4: marcador de peso molecular (PM) de 1 kb (Fermentas) \*Con fines explicativos se representó al vector pCR8/lcyb2 en forma lineal.

### 3.2.3 Recombinación con el vector pMDC32/AS-*lcyb2*

El fragmento de *lcyb2* fue clonado en el vector de destino pMDC32 mediante recombinación. Para aumentar la eficiencia de la recombinación, ésta se realizó con el vector de entrada linealizado. Para esto se hizo una extracción del DNA plasmidial de PCR8-9 por minipreparación (sección 2.3.5) y se digirió con la enzima de restricción *Xba* I (sección 2.3.6), que por tener un sólo sitio de corte en el vector pCR8/*lcyb2*, permite linealizarlo (datos no mostrados). La banda correspondiente al vector lineal se purificó desde el gel de agarosa (sección 2.3.7) y se recombinó con el vector de destino pMDC32 (sección 2.4.2.3), obteniéndose la construcción pMDC32/AS-*lcyb2* (Figura 13)



**Figura 13:** Esquema de la recombinación del vector de entrada PCR8-9 con el vector de destino pMDC32, para generar el vector pMDC32/AS-*lcyb2*. La recombinación ocurre entre las secuencias *attL1* y *attL2* del vector PCR8-9 con las *attR1* y *attR2* del vector pMDC32, generando el vector final pMDC32/AS-*lcyb2*, que contiene el fragmento de 589 pb del gen *lcyb2* en orientación antisentido con respecto al promotor doble CaMV 35S. En este vector producto de la recombinación se han generado dos nuevas secuencias denominadas *attB1* y *attB2*.

Después de realizar la reacción de recombinación se transformaron bacterias competentes de *E.coli* cepa DH5 $\alpha$  mediante shock térmico. Crecieron 2 colonias en el medio de selección LB con kanamicina (100 mg/L) las cuales se denominaron MC1 y MC2.

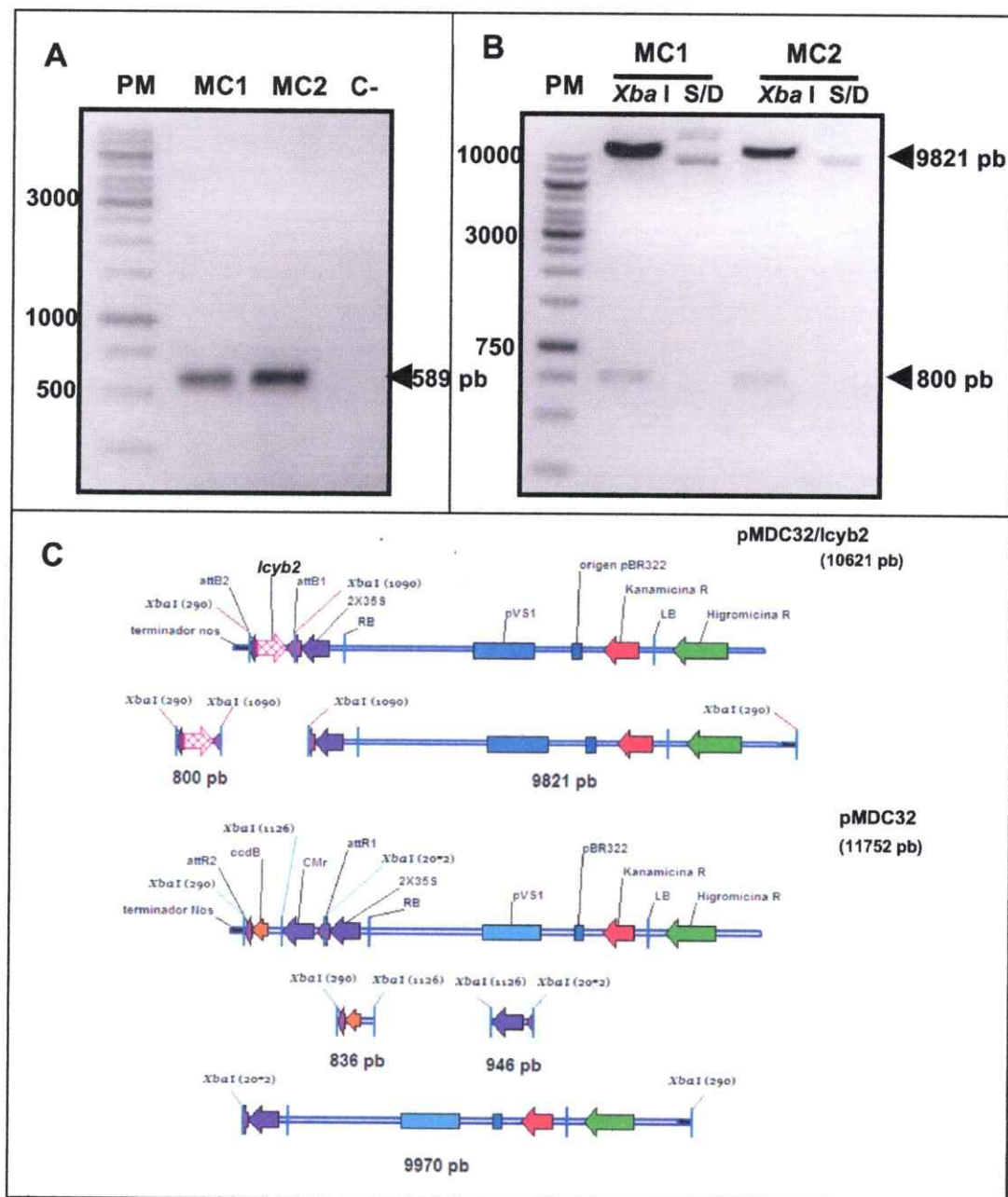
### 3.2.4 Análisis de la construcción pMDC32/AS-*lcyb2*

El primer análisis realizado con estas colonias, fue un PCR directo de colonias (sección 2.3.4). En la Figura 14.A se observa que se obtuvo un amplificado del tamaño esperado (589 pb) para ambos clones analizados, mientras que en el control negativo, en que la reacción se realizó sin DNA no se detectó ningún amplificado. Esto indica que ambos clones poseen el vector pMDC32 con el fragmento de 589 pb del gen *lcyb2*.

Para asegurar que efectivamente los clones poseen el inserto clonado, se realizó una digestión enzimática con *Xba*I del DNA plasmidial de los clones MC1 y MC2 (sección 2.3.6). El vector pMDC32 tiene tres sitios de corte para la enzima *Xba*I, mientras que el vector pMDC32/AS-*lcyb2* tiene dos sitios de corte. De esta manera, se espera que al digerir pMDC32 se liberen tres fragmentos de 836, 946 y 9970 pb, mientras que al digerir pMDC3/AS-*lcyb2* se liberen dos fragmentos, uno de 800 y otro de 9821 pb (Figura 14.C).

Al digerir el DNA plasmidial de MC1 y MC2, se liberaron dos bandas del tamaño esperado para pMDC32/AS-*lcyb2*, confirmando que poseen el vector con el fragmento de interés de *lcyb2* (Figura 14.B).





**Figura 14: PCR y análisis de restricción de los clones pMDC32/AS-lcyb2.** A) PCR de las colonias. MC1 y MC2: 10  $\mu$ L del producto de PCR para los clones MC1 y MC2 respectivamente. C-: 10  $\mu$ L del control negativo de la reacción realizada sin DNA. Con una flecha se indica el fragmento amplificado de 589 pb del gen *lcyb2* de *Daucus carota*. B) Digestión simple con la enzima *Xba* I. *Xba* I: 10  $\mu$ L de DNA plasmidial del clon MC1 y MC2 digerido con *Xba* I. S/D: DNA plasmidial de los clones MC1 y MC2 sin digerir. PM: 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular de 1kb (Fermentas). Geles de agarosa al 1%, con bromuro de etidio, corridos por 45 min a 100+/-1 V. C) Esquema de la digestión. El vector pMDC32/AS-lcyb2 tiene 2 sitios de corte para la enzima de restricción *Xba* I (posiciones 290 y 1090), por lo que al ser digerido se liberarán dos fragmentos uno de 800 y otro de 9821 pb. El vector pMDC32 posee 3 sitios de corte para *Xba* I (posiciones 290, 1126 y 2072), por lo que se liberarán 3 fragmentos de: 836, 946 y 9970 pb. Con fines explicativos se representó a los vectores pMDC32/AS-lcyb2 y pMDC32 en forma lineal.

Finalmente, el clon MC2 fue secuenciado utilizando el partidador F-*lcyb2* GATE (Tabla 1), obteniéndose una secuencia de 850 bases. Empleando la herramienta BLAST del servidor NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se determinó que dicha secuencia posee un 97% de identidad con la del cDNA de *lcyb2* de *D.carota* subsp *sativus* [DQ192191], en la región que

```

>gb|DQ192191.1| Daucus carota subsp. sativus putative capsanthin-capsorubin synthase
(CCS) mRNA, complete cds
Length=1730

Score = 911 bits (1010), Expect = 0.0
Identities = 538/553 (97%), Gaps = 5/553 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 6   TGCACACCCTGTGGC-EGCTAIG-AAITCG-GTTTGGCTGTGTGACCCCTTACCACCTAI 62
          |||| | || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 365  TGCAGAGCC-TGTGGCTGGCTRTGGRAITTCAGTITGGCTGTGTTCACCCCTTACCACCTAI 423

Query 63  GTGTTTGGCCTAACARTTATGGTGTGTGGTTGATGAGTTTGGGCTATGGGCTTTCAG 122
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 424  GTGTTTGGCCTAACARTTATGGTGTGTGGTTGATGAGTTTGGGCTATGGGCTTTCAG 483

Query 123  AITGTTTTGATAGACATGGCCCATGTCTTCTGTTTTATTAATGAGGCGRAGAGCAGCG 182
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 484  AITGTTTTGATAGACATGGCCCATGTCTTCTGTTTTATTAATGAGGCGRAGAGCAGCG 543

Query 193  TTCTGAAATCGGCCCTTATGGCCGAGTCTATAGTGCAGAAATTGAGCATCCGCTTGTTAGGAG 242
          || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 544  TTTTGAATCGGCCCTTATGGCCGAGTCTATAGTGCAGAAATTGAGCATCCGCTTGTTAGGAG 603

Query 243  GGTGGTTTCCATAGCCCTCGTGTTCATAGGCCCAAGCTTGGGAGGCTGGTTCATCAG 302
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 604  GGTGGTTTCCATAGCCCTCGTGTTCATAGGCCCAAGCTTGGGAGGCTGGTTCATCAG 663

Query 303  AGTTTGGAGTCTTCGATTCATGTGATGATGAPAA-GAATTCAGGCCGAGTTTGGATTGTGG 361
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 664  AGTTTGGAGTCTTCGATTCATGTGATGATGAPAA-GAATTCAGGCCGAGTTTGGATTGTGG 723

Query 362  ATGCTAGTGGATTTCAGAGCCTTTTGGGACTATGACRAGCCRAGRAACCTTGGGTATC 421
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 724  ATGCTAGTGGATTTCAGAGCCTTTTGGGACTATGACRAGCCRAGRAACCTTGGGTATC 783

Query 422  AGCTTGGCTCATGATATTTTGGCTGAGTGTAGTCTCCACCCTTTGAAATGGATAGAAATGG 481
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 784  AGCTTGGCTCATGATATTTTGGCTGAGTGTAGTCTCCACCCTTTGAAATGGATAGAAATGG 843

Query 482  TGCTTATGGATTGGAGAGATTCTCATTTGGGTATGAGCCCTGCCATTGCCGTTTTGCTTACG 541
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 844  TGCTTATGGATTGGAGAGATTCTCATTTGGGTATGAGCCCTGCCATTGCCGTTTTGCTTACG 803

Query 542  CCAAGTCTCCAC 554
          |||||
Sbjct 804  CCAAGTCTCCAC 816

```

abarca desde la base 6 a la 554 de la secuencia del clon MC2 (Figura 15).

**Figura 15: Análisis de la secuencia del vector pMDC32/AS-*lcyb2* del clon MC2.** Utilizando la herramienta BLAST del servidor NCBI se determinó que la secuencia obtenida de la secuenciación del clon MC2 con el partidador F-*lcyb2* GATE (ver Tabla 1) (Query), posee un 97% de identidad con la secuencia del cDNA completo de *lcyb2* [DQ192190] de *D.carota* subsp *sativus* (Sbjct).

Además, al alinear la secuencia de este clon y la secuencia del vector pMDC32 (utilizando el servidor ClustalW2, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), se verificó una vez más que el fragmento de *lcyb2* se encontraba clonado en antisentido respecto al promotor, lo cual es indispensable para generar el SGPT en las plantas transgénicas

### 3.3 Evaluación de la funcionalidad de la construcción pMDC32/AS-*lcyb2*.

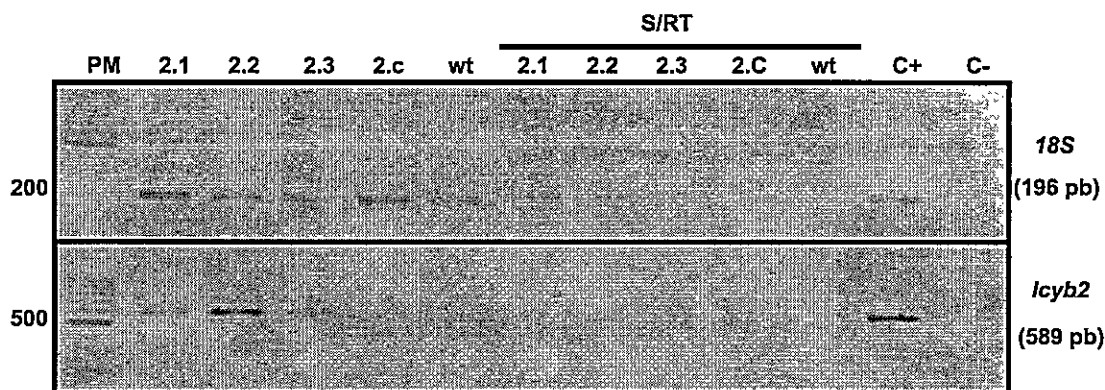
Luego se evaluó si la construcción pMDC32/AS-*lcyb2* era funcional transcripcionalmente. Para esto se transformaron transitoriamente hojas de *N. tabacum*, mediante *A. tumefaciens* con la construcción pMDC32/AS-*lcyb2* (sección 2.5.4) y luego se realizó un RT-PCR para evaluar la expresión de dicha construcción en las hojas de tabaco.

Se transformaron células competentes de *A. tumefaciens* cepa GV3101 con la construcción pMDC32/AS-*lcyb2* (sección 2.5.3), con el DNA plasmidial de los clones MC1 y MC2. Después de dos días en todas las placas se observaron colonias de *A. tumefaciens*, que se denominaron AC1 o AC2 dependiendo si se transformó con DNA plasmidial proveniente del clon MC1 o MC2, respectivamente. Se analizaron 5 colonias de cada placa por PCR directo de colonias, con los partidores F-*lcyb2* GATE y R-*lcyb2* GATE (Tabla 1), que permiten amplificar el fragmento de 589 pb del gen *lcyb2*. Para todos los clones analizados se obtuvo el amplificado del tamaño esperado (datos no mostrados), lo que indica que todos poseen la construcción pMDC32/AS-*lcyb2*. Además para tener un control de la infiltración, se transformó *A. tumefaciens* con el vector pMDC32 sin el inserto de *lcyb2* y las colonias crecidas en el medio de selección se evaluaron por PCR directo de colonias utilizando los partidores F-Hig y R-Hig (Tabla 1), que permiten amplificar un fragmento de 163 pb del gen *hpt* que confiere resistencia a higromicina y que es portado por el vector pMDC32. De este modo se seleccionaron los clones de *A. tumefaciens* positivos para este vector (datos no mostrados).

Se escogieron los clones AC2.1, AC2.2 y AC2.3 que poseen la construcción pMDC32/AS-*lcyb2* y el clon A2.C de *A. tumefaciens* transformada con pMDC32, para transformar en forma transitoria hojas de tabaco. Después de agroinfiltrar las hojas (sección

2.5.4), las plantas se dejaron 3 días en el invernadero y luego se extrajo RNA total desde las hojas agroinfiltradas y de una sin infiltrar (sección 2.3.1). Para evaluar la integridad del RNA extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa en condiciones denaturantes, cargando en todos los casos 1 µg del RNA extraído (sección 2.3.2). De esta forma se comprobó que todos los RNAs se encontraban íntegros mostrando las bandas características del RNA ribosomal (datos no mostrados).

Con estos RNAs se llevó a cabo la reacción de transcripción reversa (RT). Para evaluar la calidad del cDNA sintetizado se realizó un PCR para amplificar un fragmento de 196 pb de la subunidad ribosomal 18S. En la Figura 16 se observa el amplificado del tamaño esperado para el gen 18S en las 5 muestras analizadas. Luego, se realizó un PCR para amplificar el fragmento específico del gen *lcyb2* de *D.carota*. El producto específico de 589 pb se obtuvo únicamente en los casos en que se utilizó como molde el cDNA proveniente del tejido de tabaco infiltrado con *A.tumefaciens* transformado con el vector pMDC32/AS-*lcyb2* (2.1, 2.2 y 2.3). No se obtuvo el producto específico al utilizar cDNA del tejido infiltrado con el vector pMDC32 que no posee el fragmento del gen *lcyb2* (2.C) o cDNA del tejido de hoja de tabaco sin transformar (wt) (Figura 16). Así se demostró que los partidores utilizados son específicos para *lcyb2* de *D.carota*, ya que no hay amplificado en el tabaco silvestre ni en el infiltrado con el vector pMDC32. En la misma figura se puede observar que no se obtuvo amplificado en los controles de la reacción realizada sin transcripción reversa (S/RT), por lo que el amplificado obtenido en las muestras evaluadas proviene del cDNA sintetizado a partir del mRNA que se está transcribiendo en el tejido de tabaco y no del DNA remanente que podría haber quedado de la extracción de RNA. Estos resultados en conjunto indican que la construcción pMDC32/AS-*lcyb2* es transcripcionalmente funcional y por lo tanto fue utilizada para transformar zanahorias en forma estable.



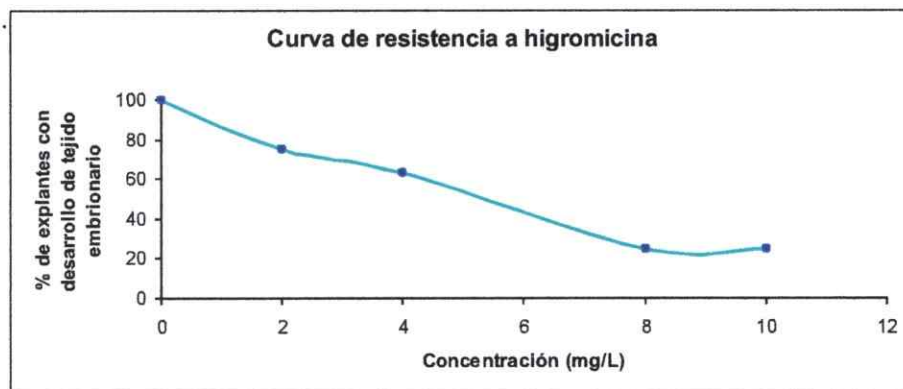
**Figura 16: Análisis de expresión mediante RT-PCR de los genes *lcyb2* y *18S* en las hojas de tabaco transformadas transitoriamente con la construcción pMDC32/AS-*lcyb2* mediante RT-PCR. 2.1, 2.2 y 2.3: 8  $\mu$ L del producto de PCR amplificando el cDNA de las hojas infiltradas con los clones de *A.tumefaciens* AC2.1, AC2.2 y AC2.3 portando la construcción pMDC32/AS-*lcyb2*. 2.C y wt: 8  $\mu$ L del producto de PCR amplificando el cDNA de una hoja infiltrada con el clon A2.C portando el vector pMDC32 y de una hoja sin infiltrar, respectivamente. S/RT: control del RT-PCR usando RNA como molde para el PCR. C+: control positivo de la reacción realizada con cDNA de *D.carota* silvestre. C-: control negativo de la reacción realizada sin DNA. PM: 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas). Geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio y corridos por 40 min a 100+/- 1 V.**

### 3.4 Obtención de las plantas transgénicas de *D.carota* que poseen las construcciones para el silenciamiento de los genes *lcyb1* y *lcyb2*.

#### 3.4.1 Establecimiento de la curva de resistencia a higromicina en *D. carota*.

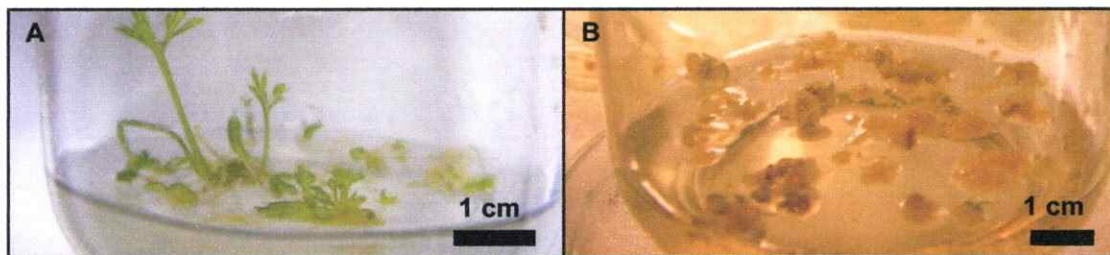
Antes de transformar los explantes de zanahoria y someterlos a embriogénesis somática para lograr su transformación estable, se determinaron las concentraciones de higromicina que permitieran el desarrollo embriogénico únicamente de los explantes transformados y no de los silvestres (sección 2.5.6). Primero, se construyó una curva de resistencia a higromicina utilizando segmentos de hipocótilos de zanahorias silvestres y con ésta se determinó la concentración mínima de higromicina en la que los explantes de las plantas silvestres no originan tejido embriogénico. Después de treinta días en medio con 2,4-D, se observó que en ausencia de higromicina todos los explantes presentaron desarrollo embriogénico y cuando la concentración de higromicina fue de 2, 4, 8 y 10 mg/L el número de explantes que se desarrolló disminuyó en promedio a 75%, 63%, 25% y 25% respectivamente (Figura 17). Con este experimento se determinó que la concentración de 2 mg/L de higromicina

es suficiente para seleccionar el tejido transgénico en la primera etapa de la embriogénesis somática (Medio I). Para aumentar la presión selectiva, la concentración de higromicina se duplicó en las etapas posteriores (4 mg/L en Medio II y 8 mg/L en Medio III. Sección 2.5.5)



**Figura 17: Curva de resistencia a higromicina para plantas de zanahorias silvestres.** Representación gráfica del porcentaje promedio de explantes con desarrollo embrionario versus la concentración de higromicina presente en el medio.

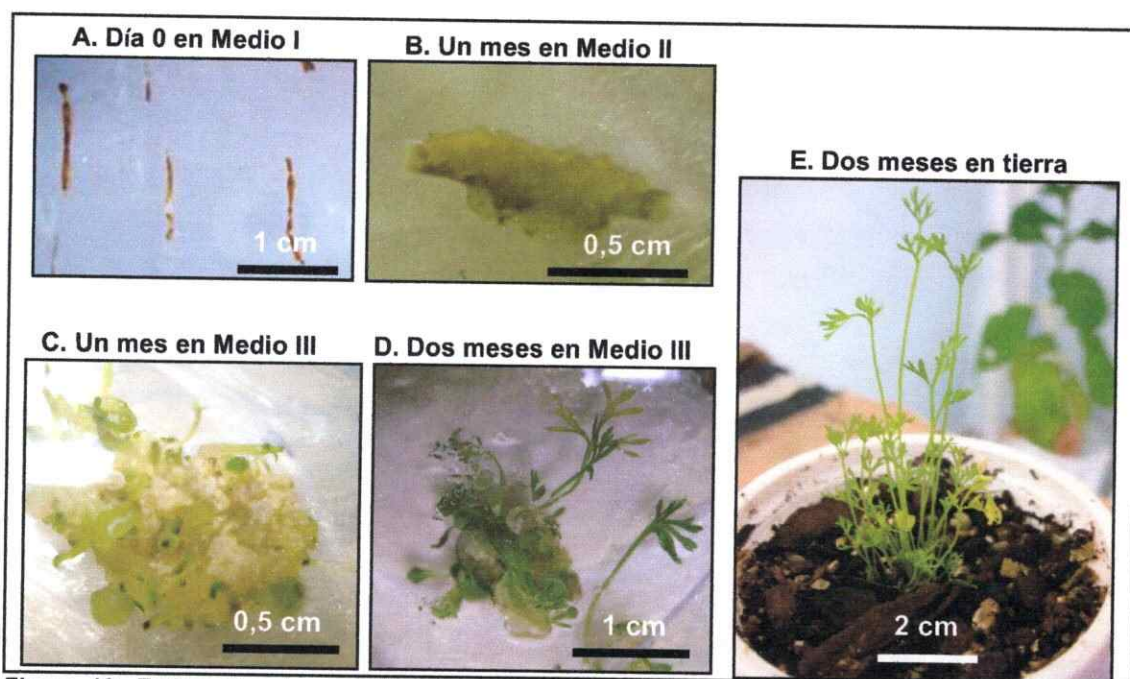
Luego, se realizó una curva equivalente a partir de los explantes que ya habían desarrollado tejido embriogénico. Estos explantes se pusieron en medio MS sin hormonas, para favorecer la maduración de los embriones y generar las plántulas. Para todas las concentraciones de antibiótico evaluadas (2, 4, 8 y 10 mg/L) la generación de las plántulas se retrazó, quedando la mayoría de los explantes en la etapa de embriones. Por el contrario, en el medio de cultivo sin higromicina, sí se generaron plántulas (Figura 18).



**Figura 18: Efecto del antibiótico higromicina en el desarrollo de plántulas de zanahorias silvestres.** A. Explantes de zanahorias silvestres después de un mes en medio MS sin hormona 2,4 D generan plántulas. B. Explantes de zanahorias silvestres después de un mes en medio MS sin hormona 2,4 D y con una concentración de 4 mg/L de higromicina no son capaces de generar plántulas y se encuentran aún en etapa embriogénica.

### 3.4.2 Transformación estable de *D.carota* silvestre y de una línea transgénica silenciada para el gen *lcyb1*.

Con las construcciones pMDC32/AS-*lcyb2* y pMDC32, se transformaron los explantes de las zanahorias silvestres y de una línea transgénica silenciada para *lcyb1* (transformada con el vector pBIN19/AS-*lcyb1*), los cuales fueron posteriormente sometidos a embriogénesis somática para generar las plantas transgénicas (sección 2.5.5). En la Figura 19 se muestran los explantes en las distintas etapas del procedimiento. En la Figura 19.A se presentan los explantes de los hipocotilos de zanahoria silvestres recién transformados con el clon A2.C (*A.tumefaciens* transformada con pMDC32). En la Figura 19.B se aprecia el engrosamiento del diámetro de los explantes después de un mes de cultivo *in vitro*, lo que refleja la acción de *A.tumefaciens* y de la hormona 2,4 D inductora de la embriogénesis. Por su parte, en la Figura 19.C se observa la generación de los embriones en estado globular sobre el explante inicial, además de algunos embriones con cotiledones que comienzan a elongar. Finalmente, en la Figura 19.D se presentan los cotiledones elongados y la formación de las plántulas fotosintéticamente activas. Después, las plántulas se pasaron a frascos con MS-agar sin hormonas para su enraizamiento y finalmente se llegó a la etapa de aclimatación en la tierra para mantenerlas en condiciones normales de cultivo en el invernadero con un foto-período de 16 h luz y 8 h oscuridad a 22°C (Figura 19.F). Así, se generaron las plántulas de zanahorias silvestres sin transformar y transformadas con los vectores pMDC32/AS-*lcyb2* y pMDC32. También se propagó la línea silenciada para *lcyb1* y se generaron las plántulas de esta línea transformada con los vectores pMDC32/AS-*lcyb2* y pMDC32. Por problemas con el incubador del invernadero, se contaminaron varios de estos cultivos y sólo se pudieron rescatar y pasar a tierra trece plantas silvestres transformadas con el vector pMDC32 (wt-pMDC32) y once plantas generadas de la transformación de la línea silenciada para *lcyb1* con el vector pMDC32/AS-*lcyb2* (AS-*lcyb1/2*), plantas doble silenciadas. De estas veinticuatro líneas transgénicas sobrevivieron a la aclimatación ocho líneas wt-pMDC32 y tres líneas AS-*lcyb1/2*.

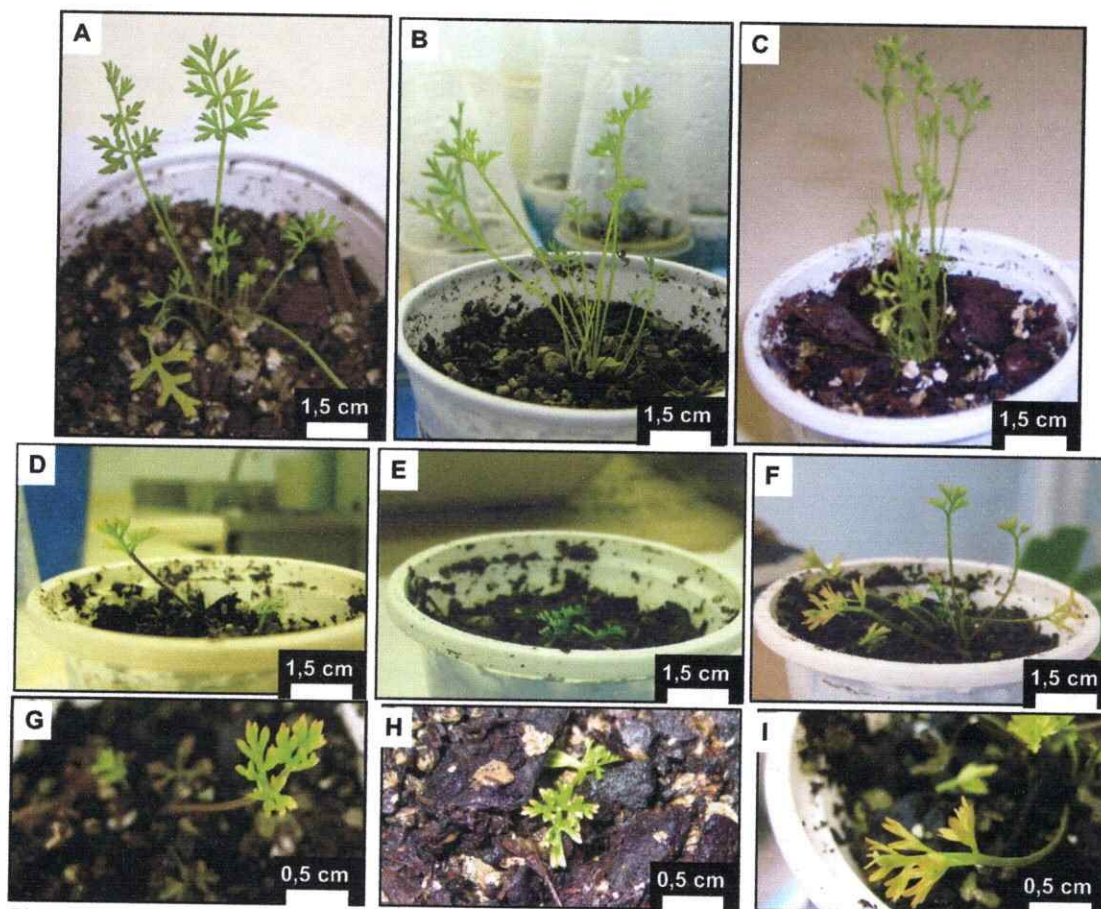


**Figura 19: Embriogénesis somática de la transformación de *D. carota* silvestre y de la línea transgénica silenciada para *lcyb1* con los vectores binarios pMDC32 y pMDC32/AS-*lcyb2*.** A. Los explantes luego de la transformación con *A. tumefaciens* puestos en el medio de inducción de los embriones (Medio I) en presencia de la hormona 2,4 D 1 mg/L y del agente de selección higromicina 2 mg/L. En este medio se mantuvieron por seis semanas y luego se cambiaron al Medio II. B. Los embriones en Medio II, compuesto de MS-agar con 0,5 mg/L de 2,4 D y 4 mg/L de higromicina, después de un mes ya se observa un claro desarrollo de tejido pre-embriogénico. C y D. Las plántulas de zanahoria en Medio III compuesto de MS-agar sin hormonas y con 8 mg/L de higromicina, aquí se observa la maduración de los embriones, elongación de los cotiledones y generación de pequeñas plántulas. D. Las plantas de zanahoria pasadas a tierra, ésta fotografía corresponde a una planta silvestre transformada con el vector pMDC32 (control).

Además de la mayor sobrevivencia de las líneas control (wt-pMDC32) en comparación con las líneas doble transformantes (AS-*lcyb1/2*), se observaron drásticas diferencias en sus fenotipos. Las líneas doble transformantes tuvieron un crecimiento y desarrollo de la raíz modificados reducidos en comparación con las líneas control. Las hojas de las líneas doble transformantes presentaron una pigmentación amarilla en sus bordes mientras que las plantas control presentaron una coloración verde y homogénea como la de una planta silvestre. Es interesante hacer notar que las plantas silenciadas únicamente para el gen *lcyb1*, presentaron un fenotipo similar a la de las plantas control, lo que alude a la importancia del gen *lcyb2* en el fenotipo obtenido. En la Figura 20 se muestra el fenotipo de las tres líneas doble transformantes



que sobrevivieron a la aclimatación y de tres líneas control que fueron escogidas al azar para el posterior análisis molecular (sección 3.4.3).



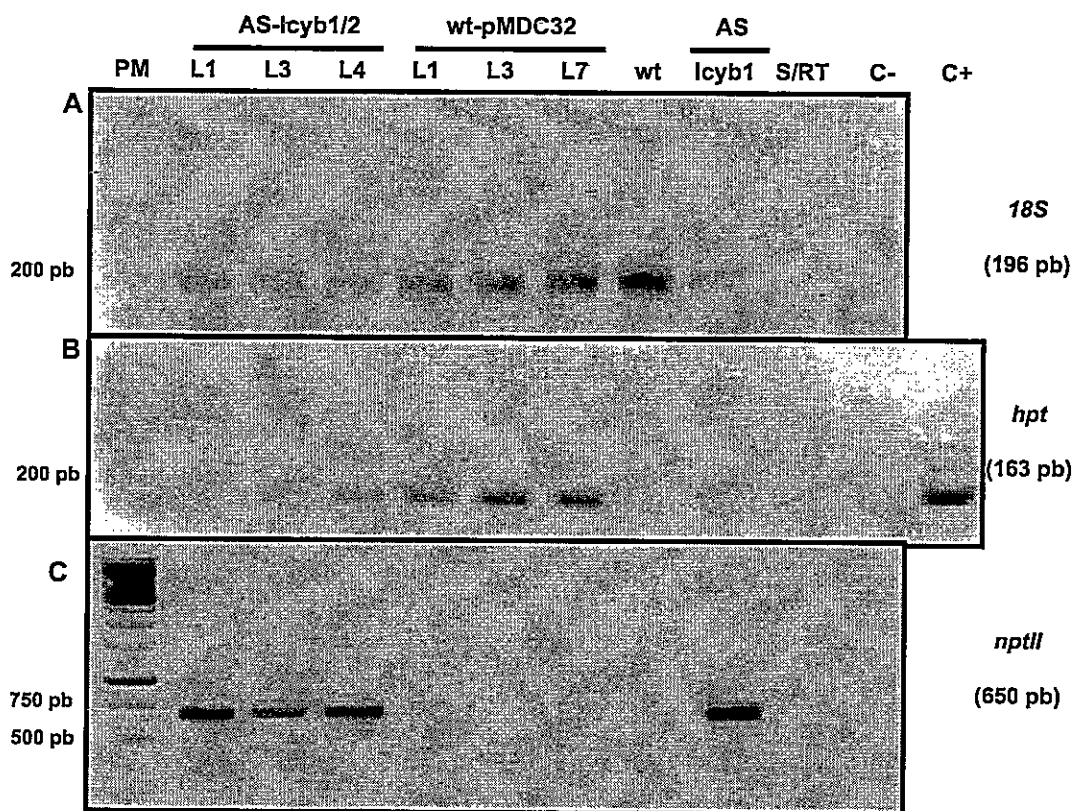
**Figura 20: Fenotipo de las líneas transformantes de *D.carota*.** A), B) y C): Fotografías de las plantas silvestres que fueron transformadas con el vector pMDC32, utilizadas como control de la transformación y denominadas líneas pMDC32 1, 3 y 7 respectivamente. D), E) y F): Fotografías de las plantas transgénicas silenciadas para *lcyb1* (portando la construcción pBIN19/AS-*lcyb1*), que fueron transformadas con la construcción para silenciar *lcyb2* (pMDC32/AS-*lcyb2*), denominadas líneas doble transformantes 1, 3 y 4 respectivamente. G), H) e I): Ampliación de la imagen de las hojas de las plantas doble transformantes 1, 3 y 4 respectivamente. Todas las plantas tienen 3 meses en tierra.

### 3.4.3 Análisis molecular de las líneas transgénicas de *D.carota* con la construcción pMDC32/AS-*lcyb2* y PBIN19/AS-*lcyb1*

Para confirmar la inserción y expresión de la construcción pMDC32/AS-*lcyb2* para el SGPT del gen *lcyb2* en el genoma de las plantas transformadas con este vector, se extrajo el RNA de las hojas de las zanahorias obtenidas a través de la embriogénesis somática (sección

2:5.5.). Con este RNA se realizó una transcripción reversa (sección 2.3.3.1) y el cDNA sintetizado se usó como molde para realizar un PCR con los partidores para el gen *hpt* (F-Hig y R-Hig, Tabla 1), que confiere resistencia a higromicina y es portado por la construcción pMDC32/AS-*lcyb2*. Además, en el caso en que se transformaron las plantas de la línea transgénica silenciada para *lcyb1* (que posee la construcción pBIN19/AS-*lcyb1*), este cDNA se utilizó como molde para realizar un PCR para el gen *nptII* (F-*nptII* y R-*nptII*, Tabla 1), que confiere resistencia a kanamicina y es portado por la construcción pBIN19/AS-*lcyb1*.

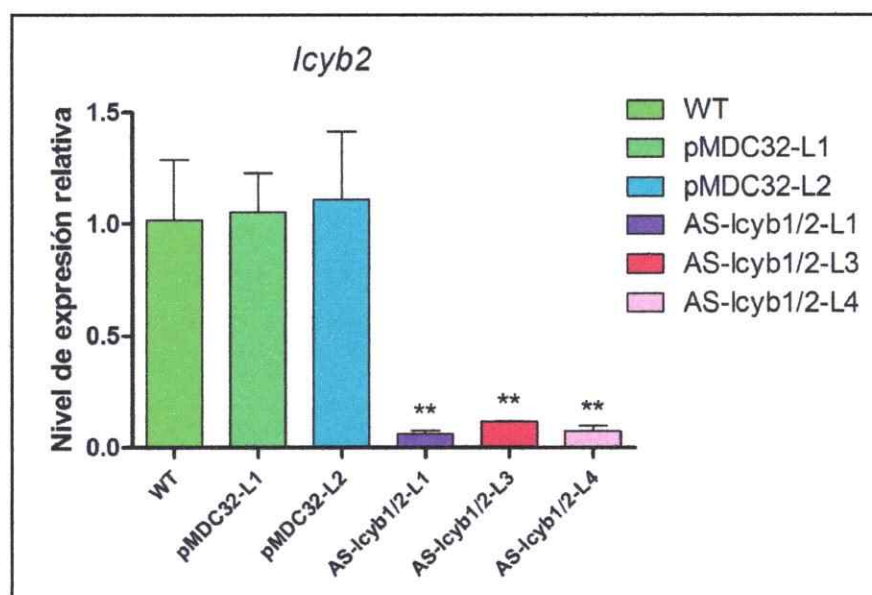
Como se muestra en la Figura 21.A, mediante el RT-PCR para el gen *18S* se obtuvo la banda del tamaño esperado de 196 pb en las ocho muestras analizadas, evidenciando la integridad del cDNA sintetizado. En la Figura 21.B se puede observar que se obtuvo un amplificado del tamaño esperado de 163 pb para el gen *hpt* en las seis líneas analizadas (tres transformadas con el vector pMDC32/AS-*lcyb2* y tres con el vector pMDC32) por lo que las plantas analizadas son transgénicas para la construcción para el SGPT de *lcyb2* o para el vector pMDC32 utilizado como control de la transformación. En la Figura 21.C se puede apreciar que se obtuvo el amplificado del tamaño esperado de 650 pb para el gen *nptII* en las tres líneas silenciadas para *lcyb1* y transformadas con el vector pMDC32/AS-*lcyb2*, confirmando que éstas también son transgénicas para la construcción pBIN19/AS-*lcyb1*. Como se esperaba también se obtuvo el amplificado para el gen *nptII* en la planta silenciada para *lcyb1* y no en las líneas silvestres transformadas con el vector pMDC32 ni en la planta de zanahoria silvestre sin transformar. En ninguno de los controles sin transcripción reversa (S/RT) se obtuvo amplificado, por lo que las bandas obtenidas para las muestras en los tres RT-PCR realizados provienen del cDNA sintetizado a partir del mRNA que se está transcribiendo en las hojas de las plantas analizadas.



**Figura 21: Análisis de la expresión de los genes *18S*, *hpt* y *nptII* en las hojas de las zanahorias transformadas con la construcción pMDC32/AS-*icyb2* y pMDC32 mediante RT-PCR. AS-*icyb1/2* L1, L3 y L4: cDNA de las hojas de zanahorias silenciadas para *icyb1* que fueron transformadas con la construcción pMDC32/*icyb2*. wt-pMDC32 L1, L3 y L7: cDNA de las hojas de zanahorias silvestres. AS-*icyb1*: cDNA de las hojas de la zanahoria transgénica silenciada para *icyb1*. S/RT: control del RT-PCR en que se utilizó RNA como molde para el PCR. C-: control negativo de la reacción realizada sin DNA. C+: control positivo de la reacción realizada con DNA plasmidial del clon MC2. A, B y C: RT-PCR de los genes *18S*, *hpt* y *nptII* respectivamente. PM: 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular de 100 pb (en A y B) y de 1 kb (en C), ambos de Fermentas. Geles de agarosa al 1,5% teñidos con GelRed™ de Biotium (A y B) y con bromuro de etidio (C), corridos por 50 min a 90 +/- 1 V.**

Adicionalmente, mediante RT-PCR en tiempo real se determinó el nivel de expresión de *icyb2* en las hojas de las líneas transgénicas generadas y se comparó con el encontrado en una planta silvestre (sección 2.3.9.2). El análisis estadístico indicó que las dos líneas control analizadas (PMDC32-L1 y L2) no presentaron diferencias significativas en la expresión de *icyb2* con respecto a la planta silvestre. Por el contrario, las líneas doble silenciadas (AS-*icyb1/2*-L1, L3 y L4) presentaron menor nivel de mRNA de *icyb2* que la planta silvestre (Figura 22). A partir

de la expresión relativa de *lcyb2* determinada en este análisis, se calculó el porcentaje de silenciamiento encontrado en las tres líneas doble transformantes. Considerando como el 100% de expresión al encontrado en la planta silvestre, se obtuvo que las líneas AS-*lcyb1/2*-L1, L2 y L3 presentaron un 94,2%, 88,4% y 92,8% de silenciamiento del gen *lcyb2* respectivamente.



**Figura 22. Nivel de mRNA de *lcyb2* en las hojas de las líneas de las zanahorias transformadas.** Expresión relativa del gen *lcyb2* respecto a la expresión del gen de expresión constitutiva 18S, en las hojas de las líneas control **pMDC32-L1** y **L2** (transformadas con el vector pMDC32) y de las líneas doble silenciadas **AS-*lcyb1/2*-L1**, **L3** y **L4** (línea transgénica silenciada para el gen *lcyb1* transformada con el vector pMDC32/AS-*lcyb2*). El calibrador utilizado en este gráfico corresponde al promedio de los valores de Ct determinados para la planta de zanahoria silvestre (**wt**). Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía ( $p < 0,05$ ) y posterior análisis de Tukey ( $p < 0,05$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los niveles de expresión, respecto a la planta silvestre. \*\*\* = extremadamente significativo ( $p < 0,001$ ), \*\* = muy significativo ( $0,001 < p < 0,01$ ) y \* = significativo ( $0,01 < p < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

Durante el desarrollo experimental de este seminario de título se determinó la expresión de los genes *lcyb1* y *lcyb2* que se postula codifican para enzimas con actividad licopeno- $\beta$  ciclasa en la raíz y las hojas de las zanahorias (Just y col, 2007). Además, para aportar mayores evidencias preliminares sobre la función del gen licopeno  $\beta$ -ciclasa 2 de *D. carota*, se construyó un vector para gatillar el silenciamiento génico post-transcripcional del gen *lcyb2* en las zanahorias y se obtuvieron líneas transgénicas estables. En trabajos futuros estos resultados preliminares permitirán definir el rol de este gen en la carotenogénesis de *D. carota*.

El análisis de expresión realizado mediante RT-PCR cuantitativo mostró que los genes *lcyb* de *D. carota* presentan una expresión diferencial en las hojas y en la raíz modificada, *lcyb1* se expresa preferentemente en las hojas jóvenes y adultas y *lcyb2* en la raíz modificada de las plantas adultas (Figura 9). El estado adulto del desarrollo de la raíz modificada se caracteriza por adquirir el mayor tamaño de crecimiento y por la acumulación de altos niveles de carotenoides en los cromoplastos de este órgano. La expresión diferencial de los genes *lcyb* ha sido reportada en otros modelos vegetales tales como el tomate (Ronen y col. 2000), el pimentón (Hugueney y col. 1995), la naranja (Alquézar y col., 2009), la papaya (Skelton y col., 2006; Blas y col., 2010; Devitt y col., 2010) y el azafrán (Ahrazem y col. 2010) en los que se ha descrito la presencia de un gen *lcyb2* con expresión preferencial en los tejidos ricos en cromoplastos como frutos y flores. Como se ha descrito que la principal forma de regulación de la ruta de síntesis de los carotenoides es a nivel transcripcional (Bramley, 2002, Cunningham, 2002; Howitt y Pogson, 2006; Römer y Fraser, 2005; Tanaka y col., 2008; Taylor y Ramsay, 2005), es de esperar que en la mayoría de las plantas esta expresión se encuentre asociada a la función de estos genes en estos órganos. Esta hipótesis fue comprobada en estudios hechos por Ronen y col. (2000), donde mediante SGPT, se determinó que *cycb* (*lcyb2*) se asocia específicamente a los frutos del tomate. Entonces, *lcyb2* de la zanahoria además de poseer alta identidad nucleotídica con otros genes *lcyb2* de otros vegetales (*cycb* de tomate, *ccs* de pimentón, *lcyb2* de papaya, *lcyb2* de naranja y *lcyb2* de azafrán) y de expresarse

predominantemente en el tejido con altos niveles de carotenoides como lo es la raíz modificada, es de esperar que cumpla una función importante actuando como LCYB en la raíz de la zanahoria.

Para validar estos antecedentes se decidió reducir los niveles de mRNA de *lcyb2* mediante ingeniería genética. Como estrategia se eligió el Silenciamiento Génico Post-Transcripcional (SGPT), por lo que se construyó un vector binario para inducir el SGPT del gen *lcyb2*, utilizando la tecnología Gateway® y los vectores de la familia pMDC (Curtis y Grossniklaus, 2003) El vector de expresión resultante pMDC32/AS-*lcyb2*, fue verificado mediante los análisis de PCR, restricción y secuenciación. Éste vector contiene el fragmento de 589 pb del gen *lcyb2* en orientación antisentido con respecto al doble promotor CaMV 35S, dicho fragmento posee un 97% de identidad con el gen *lcyb2* [DQ192191] de *D.carota* var. sativus disponible en la base de datos del NCBI, por lo que presentó algunos cambios de bases y deleciones con respecto a ésta secuencia. Estas diferencias se podrían explicar por error de la polimerasa en la amplificación por PCR o bien a un cambio a nivel génico propio de la variedad Nantes que fue la empleada en este seminario de título. Aunque estas fueran las razones de las diferencias entre la identidad nucleotídica de las secuencias, el SGPT de todas formas se gatillaría ya que la identidad nucleotídica entre la secuencia de *lcyb2* clonada y la endógena es superior al 80%, porcentaje mínimo necesario para gatillar el silenciamiento (Burton y col, 2000, Ingelbrecht y col, 1999; Mueller y cols, 1995; Schweizer y col, 2000). Es importante destacar que la secuencia utilizada para el silenciamiento de *lcyb2*, presenta sólo un 58% de identidad nucleotídica con *lcyb1* de *D.carota*, por lo que se descarta la posibilidad de gatillar el silenciamiento de este gen:

Mediante el análisis funcional de la construcción generada, se detectó el amplificado del tamaño esperado (589 pb) del gen *lcyb2* por RT-PCR (Figura 16) al usar como molde el cDNA de las hojas de tabaco infiltradas con los clones de *A.tumefaciens* que portaban la construcción pMDC32/AS-*lcyb2*. Se puede asegurar que este amplificado proviene exclusivamente de los

transcritos de la construcción de interés y no de un gen *lcyb* endógeno de tabaco o de alguna amplificación inespecífica a partir de secuencias del vector, ya que no se obtuvo amplificado al utilizar cDNA de las hojas de tabaco agroinfiltradas con el vector sin inserto (pMDC32), ni de las hojas sin infiltrar (wt) (Figura 16). Además, los controles sin transcripción reversa resultaron negativos, indicando que la amplificación proviene del cDNA y no del DNA remanente de la extracción de RNA y tratamiento con DNasa I. De esta forma se demostró que la construcción es transcripcionalmente activa en tabaco, por lo que se espera que también lo sea en nuestro modelo la zanahoria. Se ha reportado al promotor CaMV 35S como funcional en zanahoria (Wally *et al*, 2008; Jayaray y col., 2007; Jayaray y Punja, 2008 y Pizarro, 2008), por lo que es presumible que la construcción desarrollada haya sido capaz de inducir el silenciamiento génico de *lcyb2* en *D. carota*.

La generación de las líneas transgénicas de zanahoria se realizó mediante la transformación estable mediada por *A. tumefaciens*. Por medio de esta metodología se obtuvieron tres líneas transgénicas de *D. carota* doble transformadas con las construcciones pBIN19/AS-*lcyb1* y pMDC32/AS-*lcyb2*. Además, se obtuvieron ocho plantas transformadas con el vector sin inserto (pMDC32), que fueron utilizadas como control de la transformación.

La transformación mediada por *A. tumefaciens* permite la inserción al azar de las construcciones en el genoma vegetal, preferentemente en las regiones de eucromatina del genoma nuclear, pero existe una probabilidad menor de que la inserción ocurra en una región no activa del genoma (Gelvin y Kim, 2007), lo que se traduciría en una baja o nula expresión del gen. Es por esto que se debe contar con un sistema de selección adecuado de las plantas transformadas, de tal forma que sólo se seleccionen las líneas transformadas cuyas construcciones se expresen establemente. En este caso se utilizó como agente de selección el antibiótico higromicina, debido a que las construcciones utilizadas portaban el gen de resistencia a este antibiótico (*hpt*). Las concentraciones de higromicina que se utilizaron durante la embriogénesis somática de *D. carota* luego de la transformación de los explantes y que fueron

escogidas a partir de la curva de resistencia a este antibiótico elaborada en este seminario de título (sección 3.4.1), permitieron seleccionar eficientemente las líneas transgénicas generadas. Mediante RT-PCR se pudo detectar la amplificación de un fragmento del transgen *hpt*, en las seis líneas (tres líneas doble transformantes y tres líneas control) evaluadas. En el caso de las plantas doble transformantes también se pudo detectar la amplificación de un fragmento del transgen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina (Figura 21)

Considerando que la construcción de selección conformada por el doble promotor CaMV 35S, el gen *hpt* y el terminador Nos se encuentra junto con la construcción que permite el SGPT del gen *lcyb2* en el vector pMDC32/AS-*lcyb2*, es que se consideró la funcionalidad del gen *hpt* como indicativo directo de la funcionalidad de la construcción para el SGPT del gen *lcyb2* de *D. carota* en las líneas transgénicas analizadas. Por otra parte la línea silenciada para el gen *lcyb1* utilizada en el presente trabajo para generar las líneas doble transformantes, posee la construcción pBIN19/AS-*lcyb1*, que cuenta con el gen de resistencia a kanamicina (*nptII*) y con la construcción para el SGPT de *lcyb1* compuesta por el doble promotor CaMV 35S, un fragmento en antisentido del gen *lcyb1* y el terminador Nos (Pizarro, 2007). Por lo tanto, se espera que las tres líneas doble transformantes que resultaron positivas mediante el análisis de RT-PCR para los genes *hpt* y *nptII* expresen los fragmentos en antisentido de los genes *lcyb1* y *lcyb2* y eventualmente estén generando SGPT de ambos genes. Los resultados del análisis de RT-PCR cuantitativo mostraron que la expresión relativa de *lcyb2* se encuentra reducida en las hojas de las líneas doble transformantes en comparación con las de la planta silvestre, lo que sería consecuencia del SGPT de *lcyb2* en este tejido. Como el silenciamiento génico post-transcripcional opera en forma sistémica es de esperar que también se encuentren reducidos los niveles de mRNA de *lcyb2* en la raíz modificada de estas líneas, lo que queda por ser determinado en trabajos futuros.

Al comparar mediante inspección visual las plantas doble transformantes con las plantas control (transformadas con el vector pMDC32), se encontraron claras diferencias



fenotípicas (Figura 20). Las líneas doble transformantes tuvieron menor tasa de sobrevivencia a la aclimatación que las líneas control además de una menor altura y tamaño de la raíz modificada. Las plantas doble transformantes presentaron coloración amarilla en el borde de sus hojas mientras que las control presentaron una coloración verde y homogénea en toda la hoja, tal como las plantas silvestres y la línea silenciada para *lcyb1*, generada anteriormente en nuestro laboratorio (Pizarro, 2008).

En este contexto, la clorosis (decoloración) de las hojas es una característica común encontrada en las plantas que presentan mutación en algún gen carotenogénico o en las que se han silenciado alguno de estos genes y se atribuye a una deficiencia de carotenoides y clorofila en este tejido. En la literatura encontramos mutantes que presentan este fenotipo: mutantes para los genes *zds* y *pds* en *A.thaliana* (Dong y col., 2007; Qin y col., 2007), *zds* en girasol (Conti y col., 2004), *pds*, *zds* y *crts* en arroz (Fang y col., 2008) y también se ha observado en las plantas transgénicas silenciadas mediante VIGS (silenciamiento génico inducido por virus) para *pds* en California Poppy (Wege y col., 2007), tomate (Liu y col., 2002a) y tabaco (Liu y col., 2002b) y mediante RNAi para *lcyb* en arroz (Fang y col., 2008). Estos ejemplos validan que las plantas transgénicas generadas en este seminario de título presentarían una alteración en la síntesis de los carotenoides, que se traduciría en la clorosis de sus hojas.

El tamaño reducido de las plantas doble transformantes en relación a las plantas control en conjunto con el menor desarrollo de su raíz modificada también se podría atribuir a la interrupción de la ruta de biosíntesis de los carotenoides y a la acumulación de algún precursor que podría actuar como un regulador negativo sobre la expresión de los genes implicados en diversas rutas metabólicas como las vías de biosíntesis de los carotenoides, clorofilas y giberelinas. Bajos niveles de giberelina (GA) han sido propuestos como responsables del fenotipo enano de la mutante PDS3 de *A.thaliana*, en la cual mediante la aplicación de GA3 exógeno se ha logrado revertir parcialmente el fenotipo enano (Qin y col., 2007).

Por la función fotoprotectora de los carotenoides, las plantas privadas de estos pigmentos sufren daños como la ya mencionada foto-decoloración, especialmente bajo condiciones de alta intensidad lumínica (Niyogi, 1999; Sagar y col., 1988) y poseen una baja viabilidad. De esta forma, en la literatura encontramos que las plantas transgénicas de California Poppy con un alto porcentaje de silenciamiento del gen *pds* (Wege y col., 2007) así como las mutantes homocigotas del arroz en los genes *pds*, *zds* y *lcyb* no son viables (Fang y col., 2008). Por otra parte, las mutantes heterocigotas del arroz en estos mismos genes presentan una reducción en la producción de los carotenoides y del ABA, acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) acompañado de un aumento de las enzimas encargadas de la neutralización de ROS y un fenotipo deficiente de ABA caracterizado por la fotosensibilidad, la germinación temprana de las semillas (viviparismo) y la baja resistencia al estrés abiótico (Fang y col., 2008). Esto se debe a que la pérdida completa o casi completa de la actividad de alguna enzima de la ruta de síntesis de los carotenoides, afecta el ciclo de las xantófilas que participa en la fotoprotección de las células vegetales mediante la disipación térmica de energía por acción de la enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE) (Figura 1). Además, se traduce en una reducción de los precursores necesarios para la síntesis de la hormona vegetal ABA, que participa en importantes procesos de la fisiología vegetal tales como la germinación, la senescencia, la regulación de la apertura estomática y en la respuesta a estrés abiótico y biótico (Chen y col., 2008; Zeevaart y Creelman, 1988; Mauch-Mani, 2005). Cabe destacar que de las once líneas doble transformadas obtenidas sólo sobrevivieron al período de aclimatación tres (27% de sobrevivencia), mientras que de las trece líneas control sobrevivieron ocho (62% de sobrevivencia). Por los antecedentes antes mencionados, se propone que la menor sobrevivencia a la aclimatación (traspaso de las plantas desde el cultivo *in vitro* a tierra) de las plantas doble transformantes en comparación con las líneas control también se podría atribuir a una deficiencia de carotenoides.

Las líneas transgénicas silenciadas para *lcyb1* generadas anteriormente en el laboratorio (Pizarro, 2008), no presentaron clorosis en sus hojas, menor estatura, debilitamiento

o foto-sensibilidad como signo de una deficiencia considerable de carotenoides. Por lo que se planteó que el bajo nivel de transcrito de *lcyb1* detectado en las plantas silenciadas sería suficiente para mantener una producción basal de los carotenoides que permitiera la viabilidad de las plantas. A pesar de esto sí hubo una reducción del transcrito de *lcyb1* (con un promedio de 90% en las hojas y en la raíz modificada) y una disminución considerable de  $\beta$ -caroteno tanto en las hojas como en la raíz modificada (reducción promedio de 63 y 45% respectivamente). El porcentaje de reducción de  $\beta$ -caroteno fue mayor en las hojas que en la raíz modificada, a pesar de que el nivel de silenciamiento génico de *lcyb1* fue similar en ambos tejidos. Entre las posibles explicaciones para esto, se planteó la existencia de un segundo gen que sería capaz de suplir la función de *lcyb1* en la zanahoria, preferentemente en la raíz modificada. En este seminario de título se determinó que *lcyb2* se expresa preferentemente en la raíz modificada en una planta de zanahoria adulta y esto podría explicar el hecho de que la reducción de  $\beta$ -caroteno fue menor en la raíz que en las hojas producto del silenciamiento de *lcyb1*, ya que es probable que una enzima con actividad LCYB producto de la expresión de *lcyb2* tenga una actividad mayor en la raíz. Por otra parte las líneas transgénicas generadas en este seminario de título expresan las construcciones para el silenciamiento de *lcyb1* y *lcyb2* y sí presentan un fenotipo que sugiere una deficiencia considerable de los carotenoides en estas plantas, por lo que es probable que los genes *lcyb1* y *lcyb2* codifiquen para enzimas con la misma actividad y se encuentren actuando en forma conjunta para llevar a cabo la síntesis de  $\beta$ -caroteno en la zanahoria. Además, es importante mencionar que ensayos de complementación en *E.coli*, realizados recientemente en nuestro laboratorio mostraron que tanto *lcyb1* como *lcyb2* codifican para enzimas con actividad licopeno  $\beta$  ciclasa en este modelo heterólogo (Moreno, 2010).

Actualmente, se está trabajando en la obtención de líneas transgénicas que expresen únicamente la construcción para el SGPT del gen *lcyb2* y de un mayor número de líneas doble silenciadas (para *lcyb1* y *lcyb2*), ya que por la contaminación de los cultivos *in vitro* ocurrida durante la realización de este seminario de título, no se pudieron obtener líneas simple

silenciadas para *lcyb2* y el número de líneas doble silenciadas fue muy bajo. Las tres líneas que sobrevivieron a la aclimatación fueron sacrificadas para su análisis molecular durante este seminario de título y el material no fue suficiente para analizar mediante HPLC la composición de los carotenoides.

Para poder confirmar todas las hipótesis planteadas acerca del fenotipo de las líneas transgénicas y determinar si efectivamente poseen alguna alteración a nivel fisiológico y molecular, principalmente en la ruta de biosíntesis de los carotenoides, en trabajos futuros se proyecta realizar un análisis del contenido y composición de los carotenoides mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa y también analizar el nivel de acumulación de los transcritos de los genes *lcyb1* y *lcyb2* mediante RT-PCR en tiempo real, como también de otros genes involucrados en la ruta de síntesis de los carotenoides.

Otra proyección que se genera a partir de los resultados obtenidos en este seminario de título, es la obtención y el estudio del promotor del gen *lcyb2*. Esto debido a que se determinó que *lcyb2* se expresa tanto en las hojas como en la raíz modificada de la zanahoria y presenta una expresión preferencial en este último tejido, en una zanahoria adulta. Por lo tanto, este gen debe poseer un sistema de regulación de su expresión que permita su transcripción tanto en condiciones de oscuridad (raíz) como en presencia de la luz (hojas).

La construcción de un vector para el silenciamiento génico de un gen como el generado en este seminario de título permite esclarecer la función de genes esenciales para la planta que por medio de otras estrategias como la mutagénesis sería más difícil de determinar. En trabajos previos la estrategia de SGPT ha sido evaluada en la zanahoria como una herramienta adecuada para el estudio de la función del gen *lcyb1* (Pizarro, 2008), por lo que se espera permita dilucidar el rol que cumple el gen *lcyb2* en este mismo modelo.

Con este trabajo se inicia el estudio del gen *lcyb2* en *D.carota* y se continúa con la investigación que apunta a conocer la compleja regulación de la biosíntesis de los carotenoides

en este modelo. En un futuro los conocimientos adquiridos permitirán dirigir la investigación hacia los puntos claves de regulación de esta ruta, probablemente llegando a identificar entre otros elementos, promotores órgano-específicos (hojas o raíz modificada) en esta planta. A largo plazo también se proyecta la realización de mejoramientos genéticos tanto en la zanahoria como en otros modelos que posean interesantes características comerciales, nutricionales y fisiológicas.

## 5. CONCLUSIONES

- Mediante RT-PCR cuantitativo, se determinó que los genes *lcyb1* y *lcyb2* de *D.carota* tienen una expresión diferencial en las hojas y la raíz modificada. La expresión de *lcyb1* se asocia preferentemente al tejido rico en cloroplastos (hojas de plantas jóvenes y adultas) y la de *lcyb2* al tejido rico en cromoplastos (raíz modificada de una planta adulta).
- Mediante la tecnología Gateway®, se construyó el plásmido pMDC32/AS-*lcyb2* para generar el SGPT del gen *lcyb2* de *D.carota* y su funcionalidad fue demostrada mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco.
- Con los vectores pMDC32/AS-*lcyb2* y pMDC32 (vector sin inserto), se logró transformar en forma estable *D.carota* y se obtuvieron ocho líneas transgénicas control (transformadas con pMDC32) y tres líneas doble transformadas (líneas transgénicas silenciadas para *lcyb1* que fueron transformadas con pMDC32/AS-*lcyb2*).
- Las líneas doble transformantes presentaron un fenotipo distinto al de las líneas control, caracterizado por la clorosis en el borde de sus hojas, menor sobrevivencia, menor altura y menor desarrollo de la raíz modificada. Este fenotipo se podría asociar a una alteración en la ruta de biosíntesis de los carotenoides.
- Mediante RT-PCR se comprobó que en las líneas transgénicas doble transformadas se expresa la construcción para gatillar el SGPT de *lcyb1* (pBIN19/AS-LCYB1) y de *lcyb2* (pMDC32/AS-*lcyb2*) ya que en las tres líneas evaluadas se observó el amplificado de los genes *nptII* y *hpt* que confieren resistencia a los antibióticos de selección portados por estas construcciones.
- Mediante RT-PCR cuantitativo se determinó que las tres líneas doble transformadas, AS-*lcyb1/2*-L1, L3 y L4, presentan reducido el nivel de transcrito del gen *lcyb2* en las hojas, por lo que en estas líneas estaría operando el SGPT del gen *lcyb2*.

## 6. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

### Presentación a congresos:

**Ocares N., Rosas C., Moreno J.C., Pizarro L. y Stange C. (2009).** Molecular strategies to study the function of lycopene  $\beta$ -cyclase genes (*lcyb1* and *lcyb2*) in the biosynthesis of  $\beta$ -carotene in *Daucus carota* (carrot). IV REUNIÓN-DE BIOLOGÍA-VEGETAL (4 al 16 de Octubre). La Serena, Chile.

## 7. REFERENCIAS

**Ahrzazem O., Rubio-Moraga A., López-RC., Gómez-Gómez L. 2010.** The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors. *J Exp Bot.* **61**(1):105-19.

**Al Babil S., Von Lintig J., Haubruck H. y Beyer P. 1996.** A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is Hsp70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation. *Plant J.*, **9**(5): 601-612.

**Alquézar B., Zacarías L. y Rodrigo MJ. 2009.** Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene b-cyclase from Citrus and its relation to lycopene accumulation. *J Exp Bot.* **60**(6):1783-1797.

**Armstrong G.A. y Hearst J.E. 1996.** Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* **10**: 228-237.

**Bang H, Kim S, Leskovaar D y King S. 2007.** Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in lycopene b-cyclase (LCYB) gene. *Mol Breeding.* **20**:63-72.

**Bartley GE. y Scolnik PA. 1995.** Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. *Plant Cell.* **7**:1027-1038.

**Baulcombe D. 2004.** RNA silencing in plants. *Nature* **431**:356-363.

**Blas AL., Ming R., Liu Z., Veatch OJ., Paul RE., Moore PH., Yu Q. 2010.** Cloning of papaya chromoplast specific lycopene {beta}-cyclase, CpCYC-b, controlling fruit flesh color reveals conserved microsynteny and a recombination hotspot. *Plant Physiol.* [Epub ahead of print].

**Bonk M., Hoffmann B., von Lintig J., Schledz M., al Babil S., Hobeika E., Kleining H. y Beyer P. 1997.** Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes invitro reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. *Eur J Biochem.* **247**: 942-950.

**Botella Pavia, P. y Rodríguez Concepción, M. 2006.** Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiol .Plant,* **126**(3): 369-381.

**Bouche FB., Marquet-Blouin E., Yanagi Y., Steinmetz A., Muller CP. 2003.** Neutralising immunogenicity of a polyepitote antigen expressed in transgenic food plant: a novel antigen to protect against measles. *Vaccine.* **21**:2065-2072.

**Bouvier F., Hugueney P., d'Harlingue A., Kuntz M. y Camara B. 1994.** Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant Journal.* **6**: 45-54.

- Bouvier F., Keller Y., d'Harlingue A. y Camara B.** 1998. Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Biochim. Biophys. Acta*, **1391**(3): 320-328.
- Bouvier F., Suire C., Mutterer J., Camara B.** 2003. Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD- and CsZCD genes involved in *Crocus* secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell*, **15**(1):47-62.
- Bramley P.** 2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J Exp Bot*, **53**(377): 2107-2113.
- Breimer LH.** 1990. Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: The role of dna base damage. *Mol carcinog*, **3**:188-197.
- Breitenbach J., Zhu CF. y Sandmann G.** 2001. Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. *J. Agr. Food Chem.*, **49**(11): 5270-5272.
- Britton, G.** 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*, **9**:1551-58.
- Burton RA, Gibeaut DM, Bacic A, Findlay K, Roberts K, Hamilton A, Baulcombe DC, Fincher GB.** 2000. Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. *Plant Cell* **12**: 691-706.
- Camara B. y Bouvier F.** (2004). Oxidative remodeling of plastid carotenoids. *Arch Biochem Biophys*, **430**(1): 16-21.
- Chen W. y Punja Z.** 2002. Transgenic herbicide and disease tolerant carrot (*Daucus carota* L.) plants obtained through *Agrobacterium* -mediated transformation. *Plant Cell Rep*, **20**: 929-935.
- Chen H., Zhang J., Neff M.M., Hong S., Zhang H., Deng X. y Xiong L.** 2008. Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *PNAS* (105), **11**: 4495-4500.
- Clotault J., Peltier D., Berruyer R., Thomas M., Briard M. y Geoffriau E.** 2008. Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *J Exp Bot*, **59**: 3563-3573.
- Conti A., Pancaldi S., Fambrini M., Michelotti V., Bonora A., Salvini M., Pugliesi C.** 2004. A deficiency at the gene coding for zeta-carotene desaturase characterizes the sunflower non dormant-1 mutant. *Plant Cell Physiol*, **45**(4):445-55.
- Corona V., Aracri B., Kosturkova G.E., Bartley L., Pitto L., Giorgetti P.A., Scolnik P.A. y Giuliano G.** 1996. Regulation of carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development. *Plant J*, **9**(4): 505-512.
- Cunningham FX. Jr.** 2002. Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure Appl Chem*, **74**: 1409-1417.
- Cunningham FX. y Gantt E.** 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **49**: 557-83.
- Curtis MD., Grossniklaus U.** 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol*, **133**(2):462-9.
- Demming-Adams, B., Gilmore, AM. y Adams WW III.** 1996. Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *FASEB J*, **10**:403-12.
- Devitt LC., Fanning K., Dietzgen RG., Holton TA.** 2010. Isolation and functional characterization of a lycopene beta-cyclase gene that controls fruit colour of papaya (*Carica papaya* L.). *J Exp Bot*, **61**(1):33-9.



- Diretto G., Welsch R., Tavazza R., Mourgues F., Pizzichini D., Beyer P., Giuliano G.** 2007. Silencing of beta-carotene hydroxylase increases total carotenoid and beta-carotene levels in potato tubers. *BMC Plant Biol.* **2**: 7-11.
- Dong H., Deng Y., Mu J., Lu Q., Wang Y., Xu Y., Chu C., Chong K., Lu C. y Zuo J.** 2007. The Arabidopsis Spontaneous Cell Death1 gene, encoding a z-carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. *Cell Res.* **17**: 458-470.
- Fang J., Chai C., Qian Q., Li C., Tang J., Sun L., Huang Z., Guo X., Sun C., Liu M., Zhang Y., Lu Q., Wang Y., Lu C., Han B., Chan F., Cahng Z., Chu C.** 2008. Mutations of genes in synthesis of carotenoid precursors of ABA lead to pre-harvest sprouting and photo-oxidation. *Plant J.* **54**: 177-189.
- Flores C.** 2009. Desarrollo de estrategias moleculares para el estudio de la función de los genes  $\zeta$ -caroteno desaturasa (zds1 y zds2) en *Daucus carota* (zanahoria). Seminario de título para optar al título de Ing. en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Flores C.** 2010. Estudio de la función de los genes zds1 y zds2 de *Daucus carota* (zanahoria). Tesis de Magister en Ciencias, mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Fraser P. D. y Bramley, P.** 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog.Lipid Res.* **43**(3): 228-265.
- Fraser P., Kiano J., Truesdale M., Schuch W., Bramley P.** 1999. Phytoene synthase-2 activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening. *Plant Mol Biol.* **40**: 687-698.
- Fraser P., Truesdale M., Bird C., Schuch W., Bramley P.** 1994. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development (Evidence for Tissue-Specific Gene Expression). *Plant Physiol.* **105**: 405- 413.
- Fuentes P.** 2009. Efecto del desarrollo y de la luz en los niveles de RNA mensajero de seis genes de la ruta carotenogénica en *Daucus carota* L. (zanahoria). Seminario de título para optar al título de Ing. en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Galpaz N., Ronen G., Khalfa Z., Zamir D. y Hirschberg J.** 2006. A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus. *Plant Cell.* **18**(8): 1947-1960.
- Gelvin S., Kim S.** 2007. Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1769**: 410-421.
- Gibeaut D., Hulett J., Cramer G. y Seemann J.** 1997. Maximal Biomass of *Arabidopsis fha/iana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. *Plant Physiol.* **115**: 317-319.
- Gilbert MO., Zhang YY., Punja ZK.** 1996. Introduction and expression of chitinase encoding genes in carrot following *Agrobacterium*-mediated transformation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* **32**:171-178
- Giuliano G., al Babilí S. y von Lintig J.** 2003. Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. *Trends Plant Sci.* **8**(4): 145-149.
- Giuliano G., Bartley G.E. y Scolnik P.A.** 1993. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell.* **5**: 379-387.
- Gruszecki, W. I. y Strzalka, K.** 2005. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim Biophys Acta.* **1740**(2):108-115.
- Ha SH., Kim JB., Park JS., Lee SW. y Cho KJ.** 2007. A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *J Exp Bot.* **58**(12):3135-3144.

- Hamilton AJ, Brown S, Yuanhai H, Ishizuka M, Lowe A, Solis A, Grierson D.** 2002. A transgene with repeated DNA causes high frequency, post-transcriptional suppression of ACC-oxidase gene expression in tomato. *Plant J.* **15:** 737-746.
- Handelman GJ.** 2001. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition.* **17:**818-822.
- Helliwell C., Waterhouse P.** 2003. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods* **30:**289-295.
- Hirschberg J.** 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol.* **4(3):** 210-218.
- Hirschberg J., Cohen M., Harker M., Lotan T., Mann V, y Pecker I.** 1997. Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Pure & Appl Chem.* **69(10):** 2151-2158.
- Howitt CA. y Pogson B.J.** 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ.* **29(3):** 435-445.
- Hugueney P., Badillo A., Chen H., Klein A., Hirschberg J., Camara B. y Kuntz M.** 1995. Metabolism of cyclic carotenoides: a model for the alteration of biosynthetic pathway in *Capsicum annuum*. *Plant J.* **8:** 417-424.
- Hugueney P, Bouvier F, Badillo A, Quennemet J, d'Harlingue A, Camara B.** 1996. Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits. *Plant Physiol.* **111:** 619-626
- Ingelbrecht IL, Irvine JE, Mirkov TE.** 1999. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. *Plant Physiol.* **119:** 1187-1198.
- Jayaraj J., Devlin R., Punja Z.** 2008. Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants. *Transgenic Res.* **17(4):**489-501.
- Jayaraj J., Punja ZK.** 2007. Combined expression of chitinases and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens. *Plant Cell Rep.* **26:**1539-1546
- Jayaraj J., Punja ZK.** 2008. Transgenic carrot plants accumulating ketocarotenoids show tolerance to UV and oxidative stresses. *Plant Physiol Biochem.* **46(10):**875-883.
- Just B.J., Santos CAF., Fonseca MEN., Boitex LS., Oliozia BB., Simon PW.** 2007. Carotenoids biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theory Applied Genetic.* **114:** 693-704.
- Jyonouchi H., Sun S., Koji Iijima y Gross MD.** 2000. Antitumor Activity of Astaxanthin and Its Mode of Action. *Nutr Cancer.* **36(1):**59-65.
- Kato M., Ikoma Y., Matsumoto H., Sugiura M., Hyodo H. y Yano M.** 2004. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol.* **134:** 824-837.
- Kita M, Kato M, Ban Y, Honda C, Yaegaki H, Ikoma Y, Moriguchi T.** 2007. Carotenoid accumulation in japanese apricot (*Punus mume* Siebold & Zucc): Molecular análisis of carotenogenic gene expresión and ethylene regulation. *J Agric Food Chem.* **55(9):** 3414-3420.
- Kumar S., Dhingra A., Daniell H.** 2004. Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol.* **136:**2843-2854.
- Laule O, Fürholz A, Chang H, Zhu T, Wang X, Heifetz P y Grisse W.** 2003. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100:** 6866- 6871.

- Lewinsohn, E., Sitrit Y., Bar E., Azulay Y., Ibdah M., Meir A., Yosef E., Zamir D. y Tadmor Y. 2005. Not just colors-carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma in tomato and watermelon fruit. *Trends Food Sci Tech.* **16**(9): 407-415.
- Li L., Lu S., Cosman KM., Earle ED., Garvin DF. y O'Neill J. 2006.  $\beta$ -Carotene accumulation induced by the cauliflower Or gene is not due to an increased capacity of biosynthesis. *Phytochemistry.* **67**(12): 1177-1184.
- Li L., Paolillo DJ., Parthasarathy MV., Dimuzio EM. y Garvin DF. 2001. A novel gene mutation that confers abnormal patterns of  $\beta$ -carotene accumulation in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). *Plant J.* **26**(1): 59-67.
- Li F, Vallabhaneni R, Wurtzel L. 2008. PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiol.* **146**: 1333-1345.
- Lichtenthaler H, Schwender J, Disch A y Rohmer M. 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* **400**: 271-274.
- Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar SP. 2002a. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* **31**(6):777-86.
- Liu Y., Schiff M., Marathe R., Dinesh-Kumar SP. 2002b. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* **30**(4):415-29.
- Marquet-Blouin E., Bouche FB., Steinmetz A., Muller CP. 2003. Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)-derived measles virus hemagglutinin. *Plant Mol Biol.* **51**:459-469.
- Masaya K., Yoshinori I., Hikaru M., Minoru S., Hiroshi H. y Masamichi Y. 2004. Accumulation of Carotenoids and Expression of Carotenoid Biosynthetic Genes during Maturation in Citrus Fruit. *Plant Physiol.* **134**:824-837.
- Matthew L. 2004. RNAi for plant functional genomics. *Comparative and Functional Genomics. Comp Funct Genomics.* **5**: 240-244
- Mauch-Mani B., Mauch F. 2005. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol.* **8**: 409-414.
- Mayne ST. 1996. Beta-carote, carotenoids and disease prevention humans. *FASED J.* **10**:690-701.
- Melchers LS. y Stuiver MH. 2000. Novel genes for disease-resistance breeding. *Curr Opin Plant Biol* **3**:147-152
- Moreno JC. 2010. Evaluación de la funcionalidad de la licopeno  $\beta$ -ciclase de *Daucus carota* L. (zanahoria) mediante complementación heteróloga. Seminario de título para optar al título de Ing. en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Mueller E, Gilbert J, Davenport G, Brignetti G, Baulcombe D. 1995. Homology-dependent resistance: transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. *Plant J.* **7**: 1001-1013.
- Naik P. S., Chanemougasoundharam A., Paul Khurana S. M. y Kalloo G. 2003. Genetic manipulation of carotenoid pathway in higher plants. *Current Science.* **85**(10):1423-1430.
- Nambara E y Marion-Poll A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolismo. *Annu Rev Plant Biol.* **56**: 165-185.
- Nelson JL., Bernstein PS., Schmidt MC., Von Tress MS. y Askew EW. 2003. Dietary Modification and Moderate Antioxidant Supplementation Differentially Affect Serum Carotenoids, Antioxidant Levels and Markers of Oxidative Stress in Older Humans. *J Nutr.* **133**(10):3117-3123.

- Niyogy K.** 1999. Photoprotection Revisited: Genetic and Molecular Approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **50**: 333-359
- Nishino H.** 1998. Cancer prevention by carotenoids. *Mut Res.* **402**:159-163.
- Ohmiya A., Kishimoto S., Aida R., Yoshioka S. y Sumitomo K.** 2006. Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in Chrysanthemum petals. *Plant Physiol.* **142** (3): 1193-1201.
- Pecker I., Gubbay R., Cunningham Jr. FX., Hirshberg J.** 1996. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene  $\beta$ -cyclase from tomato reveal a decrease in its expression during tomato ripening. *Plant Mol Biol.* **30**: 806-819.
- Pfaffl M.W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**(9): 2002-2007.
- Pizarro L.** 2007. Construcción de vectores para Silenciamiento Génico Post-Transcripcional de la familia de genes que codifican para la enzima lycopeno  $\beta$  ciclase de *Daucus carota*. Seminario de título para optar al título de Ing. en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Pizarro L.** 2008. Estudio de la función del gen lycopeno  $\beta$ -ciclase (*lcyb*) en la biosíntesis de carotenoides en *Daucus carota*. Tesis de Magister en Ciencias, mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Qin G., Gu H., Ma L., Peng Y., Deng X.W., Chen Z. y Qu L.J.** 2007. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid and gibberellins biosynthesis. *Cell Res.* **17**: 471-482.
- Rodrigo M., Marcos J., Zacarías L.** 2004. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus senensis* L) during fruit development and maturation. *J Agric Food Chem.* **52**: 6724-6731.
- Römer S. y Fraser PD.** 2005. Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta* **221**: 305-308.
- Ronen G., Carmel-Goren L., Zamir D., 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 11102-11107.
- Ronen G., Cohen M., Zamir D. y Hirshberg J.** 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of gene for lycopene epsilon cyclase is down regulated during ripening and is elevated in the mutant delta. *Plant J.* **17**: 341-351.
- Sagar A.D., Horwitz B.A., Elliott R.C., Thompson W.F. y Briggs, W.R.** 1988. Light effects on several chloroplast components in norflurazon-treated pea seedlings. *Plant Physiol.* **88**: 340-347.
- Schledz M., al Babilí S., von Lintig J., Haubruck H., Rabbani S., Kleinig H. y Beyer P.** 1996. Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering. *Plant J.* **10**(5): 781-792.
- Schweizer P, Pokorný J, Schulze-Lefert P, Dudler R.** 2000. Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. *Plant J.* **24**: 895- 903.
- Schwender J., Zeidler J., Gröner R., Müller C., Focke M., Braun S., Lichtenthaler F. y Lichtenthaler H.** 1997. Incorporation of 1-deoxy-D- xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. *FEBS Lett.* **414**:129-134.
- Shibukawa T., Yazawa K., Kikuchi A., Kamada H.** 2009. Possible involvement of DNA methylation on expression regulation of carrot LEC1 gene in its 5'-upstream region. *Gene.* **437**(1-2):22-31

- Simkin AJ., Schwartz SH., Auldridge M., Taylor MG. y Klee HJ.** 2004a. The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles  $\beta$ -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant J.* **40**(6):882-892.
- Simkin AJ., Underwood BA., Auldridge M., Loucas, HM., Shibuya K., Schmelz E., Clark DG. y Klee, HJ.** 2004b. Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of  $\beta$ -ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiol.* **136**(3):3504-3514.
- Simkin AJ, Zhu C, Kuntz M, Sandmann G.** 2003. Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*) leaves. *J Plant Physiol.* **160**(5):439-443.
- Skelton RL., Yu Q., Srinivasan R., Manshardt R., Moore PH. y Ming R.** 2006. Tissue differential expression of lycopene b-cyclase gene in papaya. *Cell Res.* **16**(8):731-9.
- Snodderly DM.** 1995. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am.J.Clin.Nutr.* **14**:1448S-1461S.
- 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. *Biol Res.* **41**(3):289-301
- Susi P., Hohkuri M., Wahroos T., Kilby N.** 2004. Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Mol Biol.* **54**: 157-174.
- Takaichi M. y Oeda K.** 2000. Transgenic carrots with enhanced resistance against two major pathogens, *Erysiphe heraclei* and *Alternaria dauci*. *Plant Sci.* **153**:135-144
- Tanaka T., Makita H., Ohnishi M., Mori H., Satoh K. y Hara A.** 1995. Chemoprevention of Rat Oral Carcinogenesis by Naturally Occurring Xanthophylls, Astaxanthin and Canthaxanthin. *Cancer Res.* **55**: 4059-4064.
- Tanaka Y., Sasaki N. y Ohyima A.** 2008. Biosynthesis of plants pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* **54**: 733-749.
- Tang G, Reinhart BJ, Bartel D, Zamore PD.** 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* **17**: 49-63
- Taylor M. y Ramsay G.** 2005. Carotenoid biosynthesis in plant storage organs: recent advances and prospects for improving plant food quality. *Physiol Plant.* **124**: 143-151.
- Telfer A.** 2005. Too much light? How beta-carotene protects the photosystem II reaction centre. *Photochem Photobiol Sci.* **4**: 950-956.
- Tian L. y DellaPenna D.** 2001. Characterization of a second carotenoid  $\beta$ -hydroxylase gene from *Arabidopsis* and its relationship to the LUT1 locus. *Plant Mol Biol.* **47**(3): 379-388.
- Tian L., Magallanes Lundback M., Muttterer J., y DellaPenna D.** 2003. Functional analysis of  $\beta$  and  $\epsilon$  ring carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **15**: 1320-1332.
- Van Blockland R, Van der Geest N, Mol JNM, Kooter JM.** 1994. Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase RNA turnover. *Plant J.* **6**: 861-877
- Vishnevetsky, M., Ovadis, M. y Vainstein, A.** 1999. Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci.* **4**(6): 232-235.
- Voinnet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC.** 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**: 177-187.

**Wally O., Jayaraj J., Punja ZK.** 2008. Comparative expression of beta-glucuronidase with five different promoters in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) root and leaf tissues. *Plant Cell Rep.* **27**(2):279-287.

**Wege S., Scholz A., Gleissberg S., Becker A.** 2007. Highly efficient virus-induced gene silencing (VIGS) in California poppy (*Eschscholzia californica*): an evaluation of VIGS as a strategy to obtain functional data from non-model plants. *Ann Bot.* **100**(3):641-9.

**Welsch R., Beyer P., Huguenev P., Kleinig H. y von Lintig J.** 2000. Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta.* **211**(6): 846-854.

**Welsch R, Wüst F, Bär C, Al-Babili S, Beyer P.** 2008. A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiol.* **147**: 367-380

**Woitsch S, Römer S.** 2003. Expression of xanthophylls biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation. *Plant Physiol.* **132**: 1508-1517.

**Zeb A., Mehmood S.** 2004. Carotenoids contents from various sources and their potential health applications. *Pakistan Journal of Nutrition* **3**(3):199-204.

**Zeevaart JAD. y Creelman RA.** 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **39**:439-473.

Catalogo Gateway® Technology Invitrogen. A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. Números 12535-019 y 12535-027.

Introduction to Quantitative PCR: Methods and application guide. Stratagene®. 11011 North Torrey Pines Road La Jolla, CA 92037 USA

Thermo Fisher Scientific Inc. 2008. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.6 User's Manual.