

UCH-FC
Biotecnología
A174
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

**“EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS
GENES FITOENO SINTASA (*PSY1* Y *PSY2*) DE
DAUCUS CAROTA EN EL MODELO VEGETAL
NICOTIANA TABACUM”**

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

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Facultad de Ciencias

ORLANDO ANDRÉS ACEVEDO ACEVEDO

Julio, 2011

Santiago – Chile

Director de Seminario de Título: Dra. Claudia Stange Klein



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 el **SR. ORLANDO ANDRÉS ACEVEDO ACEVEDO**.

“Evaluación De la funcionalidad de los genes fitoeno sintasa (*psy1* y *psy2*) de *Daucus carota* en el modelo vegetal *Nicotiana tabacum*”

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

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Claudia Stange', written over a horizontal line.

Dr. Michael Handford
Co-Director Seminario de Título

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Michael Handford', written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación

Dra. Lorena Norambuena
Presidente Comisión

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Lorena Norambuena', written over a horizontal line. To the right of the signature is a circular stamp that reads 'FACULTAD DE CIENCIAS', 'BIBLIOTECA CENTRAL', and 'UNIVERSIDAD DE CHILE'.

Dr. Manuel paneque
Corrector

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Manuel Paneque', written over a horizontal line.

Santiago de Chile, diciembre de 2011

BIOGRAFÍA



Nací en Santiago un día 3 de Julio de 1987. Mi niñez la viví en aquel importante pasaje en el centro de Santiago junto a mi madre Rosa, mi abuela Gladys y mis 2 tíos: Jaime y Eduardo. Mi educación Básica, hasta quinto básico, fue en el colegio Manuel Jose Irarrázaval frente a la Parroquia del Perpetuo Socorro. En este colegio nació mi interés por la guitarra y las ciencias biológicas. En sexto básico viajamos mi madre y yo a la lejana ciudad de Punta arenas donde conocí a gente muy especial. Mi educación Media fue realizada en el Instituto Nacional Jose Miguel Carrera, lugar del que tengo muy buenos recuerdos tanto de profesores como de amistades que formé. En este colegió conocí la Biotecnología y decidí que era el camino a seguir para mí. En el año 2006 ingrese a la Facultad de Ciencias lugar en el que he vivido grandes experiencias y conocí gente muy importante. Para el futuro, espero seguir aprendiendo tanto de la vida como la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mi madre que me ha apoyado durante estos años de estudio, desde sus inicios en la educación básica, hasta ahora que ya finaliza el proceso, en la educación superior. También es importante para mi, agradecer a mi abuela y a mis tíos por estar presentes y brindarme el apoyo necesario durante estos años de largo esfuerzo y dedicación.

También quiero agradecer a la gente del Laboratorio que me ha enseñado y orientado desde un principio para trabajar. Al Seba por su buen sentido del humor y a la Ange por su buena disposición para responder mis preguntas y hacernos la vida mas grata. A Lore que siempre se ha dado el tiempo de escuchar mis dudas igualmente que JuanK y Charlie. Por otra parte, quiero agradecer a la Dra Claudia Stange que me ha orientado y aconsejado durante la realización de este seminario de Título siendo para mí una excelente e imprescindible guía.





TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE TABLAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Carotenoides: Estructura y función.....	1
1.2. Biosíntesis de carotenoides.....	3
1.3. Regulación transcripcional de los genes carotenogénicos	6
1.4. El gen fitoeno sintasa, <i>psy</i>	7
1.5. Los genes <i>psy1</i> y <i>psy2</i> en <i>Daucus carota</i>	9
2. OBJETIVOS.....	12
3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
4.1. Reactivos	15
4.2. Material Biológico.....	15
4.3. Plásmidos	16
4.4. Medios de cultivo	17

4.4. Medios de cultivo	17
4.4.1. Medios de cultivo para crecimiento bacteriano	17
4.4.2. Medios de cultivo para crecimiento de explantes transformados	17
4.5. Partidores.....	18
4.6. Metodología	18
4.6.1. Extracción de ADN genómico (ADNg) de plantas de silvestres y transformadas con la construcción <i>pGWB2/psy1</i>	19
4.6.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	20
4.6.3. Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).....	20
4.6.4. Extracción de ARN de <i>N. tabacum</i>	23
4.6.5. RT-PCR del gen <i>psy1</i>	24
4.6.5.1. Tratamiento del ARN de las líneas de <i>N. tabacum</i> silvestres y transformadas con la construcción <i>pGWB2/psy1</i> con DNAsa I.	24
4.6.5.2. Transcripción Reversa para sintetizar ADNc	24
4.6.6. Determinación de la concentración de Carotenoides en las plantas de <i>N. tabacum</i> transformadas con la construcción <i>pGWB2/psy1</i> y silvestres	25
4.6.6.1. Extracción de Carotenoides.	25
4.6.6.2. Cuantificación de carotenoides totales mediante espectrofotometría	26
4.6.6.3. Determinación de la composición de carotenoides mediante HPLC.....	27
4.6.7. Purificación de ADN desde los geles de agarosa	27
4.6.8. Generación de la construcción <i>pCR8/psy2</i>	27

4.6.9. Generación de la construcción <i>pGWB2/psy2</i>	28
4.6.10. Quimiocompetencia de células.....	30
4.6.10.1. Quimiocompetencia de la cepa de <i>E. coli</i> DH5 α	30
4.6.10.2. Quimiocompetencia de la cepa de <i>A. tumefaciens</i> GV3101	30
4.6.11. Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α quimiocompetentes.....	31
4.6.12. Extracción del ADN plasmidial de células de <i>E. coli</i> Dh5 α	32
4.6.13. Digestión enzimática de las construcciones <i>pCR8/psy2</i> y <i>pGWB2/psy2</i> ..	32
4.6.14. Secuenciación de las construcciones <i>pCR8/psy2</i> y <i>pGWB2/psy2</i>	33
4.6.15. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 con la construcción <i>pGWB2/psy2</i>	33
4.6.16. Transformación estable de explantes de <i>N. tabacum</i> con la construcción <i>pGWB2/psy2</i>	34
4.6.17. Transformación estable de explantes de <i>D. carota</i> con la construcciones <i>pGWB2/psy1</i> y <i>pGWB2/psy2</i>	35
5. RESULTADOS	35
5.1. Análisis de la transgénesis de las líneas de <i>N. tabacum</i> transformadas con la construcción <i>pGWB2/psy1</i> mediante PCR y RT-PCR.....	35
5.2. Evaluación de la función del gen <i>psy1</i> de <i>D. carota</i> mediante análisis bioquímico de las líneas transformadas.	40
5.3. Generación de las construcción <i>pCR8/psy2</i>	43
5.4. Generación de la construcción <i>pGWB2/psy2</i>	46

5.4.1. Análisis de la construcción <i>pGWB2/psy</i>	47
5.5. Obtención de clones transformantes de <i>A. tumefaciens</i> con la construcción <i>pGWB2/psy2</i>	49
5.6. Transformación estable de explantes de <i>N. tabacum</i> con la construcción <i>pGWB2/psy2</i>	50
5.7. Transformación estable de explantes de <i>D. carota</i> con la construcción <i>pGWB2/psy2</i>	54
6. DISCUSIÓN	55
6.1. Construcciones genéticas	55
6.2. Transformación estable de <i>N. tabacum</i> con la construcción <i>pGWB2/psy2</i>	55
6.3. Transformación estable de explantes de <i>D. carota</i> con las construcciones <i>pGWB2/psy1</i> y <i>pGWB2/psy2</i>	56
6.4. Análisis de secuencia de la construcción <i>pCR8/psy2</i>	56
6.5. Análisis molecular y bioquímico de las líneas de transformadas con la construcción <i>pGWB2/psy1</i>	57
7. CONCLUSIONES	60
8. PROYECCIONES	61
9. REFERENCIAS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Representación de la biosíntesis de carotenoides en plantas.....	5
Figura 2	Amplificación del gen <i>18S</i> a partir del ADNg de las líneas silvestres y transgénicas	37
Figura 3	Amplificación mediante PCR del gen <i>hpt</i> en 8 líneas de <i>N. tabacum</i> transformadas con el gen <i>psy1</i> de <i>D. carota</i>	38
Figura 4	PCR para amplificar el gen <i>18S</i> a partir del ADNc sintetizado obtenido de las líneas transgénicas	39
Figura 5	Amplificación mediante RT-PCR del gen <i>psy1</i> de <i>D. carota</i> en las líneas transgénicas	40
Figura 6	Niveles de pigmentos en las plantas examinadas en este Seminario de Título	41
Figura 7	Amplificación del ADNc de <i>psy2</i> mediante PCR de colonia de las células de <i>E. coli</i> transformadas con la construcción <i>pCR8/psy2</i>	45
Figura 8	Digestión con la enzima BstEII de los clones para la construcción <i>pCR8/psy2</i>	46
Figura 9	PCR direccional para determinar la orientación del ADNc de <i>psy2</i> en el vector <i>pGWB2</i>	48
Figura 10	Digestión enzimática con la enzima NdeI de <i>pGWB2/psy2</i> para determinar la orientación del ADNc de <i>psy2</i>	49
Figura 11	PCR de colonia para determinar los clones de <i>A. tumefaciens</i> exitosamente transformados con la construcción <i>pGWB2/psy2</i>	50
Figura 12	Organogénesis somática de <i>N. tabacum</i>	51

Figura 13 Plantas de <i>N. tabacum</i> silvestres y transformadas con la construcción <i>pGWB2/psy2</i>	53
Figura 14 Embriogénesis somática de <i>D. carota</i>	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Partidores utilizados en este Seminario de Título.....	18
Tabla 2A	PCR para amplificar el gen <i>18S</i> con el fin de evaluar la calidad de los ADN _g extraídos y los ADN _c sintetizados	21
Tabla 2B	PCR para amplificar los genes <i>psy1</i> y <i>psy2</i> de <i>D. carota</i>	21
Tabla 2C	PCR de colonia para amplificar los genes <i>psy1</i> y <i>psy2</i> de <i>D. carota</i>	22
Tabla 2D	PCR para amplificar el gen <i>hpt</i>	22
Tabla 3	Porcentajes, en promedio, de aumento y/o disminución de los pigmentos detectados en plantas de <i>N. tabacum</i> transformadas con la construcción <i>pGWB2/psy1</i> respecto a plantas silvestres.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

35S:	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.
ABA:	Ácido Abscísico.
ADN:	Ácido desoxiribonucleico.
ARN:	Ácido ribonucleico.
BrEt:	Bromuro de Etidio.
C β HX:	β caroteno hidroxilasa.
C ϵ HX:	ϵ caroteno hidroxilasa.
ADNc:	ADN complementario.
ADNg:	ADN genómico.
CTAB:	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.
DEPC:	Dietilpirocarbonato.
D.O.:	Densidad óptica.
DMAPP:	Dimetil alil pirofosfato.
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético.
GGPPS:	Geranilgeranil pirofosfato sintasa.
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución.
IPI:	Isopentenil pirofosfato isomerasa.
IPP:	Isopentenil pirofosfato.
LB:	Luria Bertani.
LCYB:	Licopeno β ciclasa.
LCYE:	Licopeno ϵ ciclasa.
ARNm:	ARN mensajero.
nm:	nanometro.

MS: Medio basal Murashige & Skoog.

pb: pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDS: Fitoeno desaturasa.

PSY: Fitoeno sintasa.

rpm: Revoluciones por minuto.

RT: Transcripción Reversa.

RT-PCR: Transcripción reversa acoplada a reacción de cadena de la polimerasa.

UV: Ultra-violeta.

WT: planta silvestre.

ZEP: Zeaxantina epoxidasa.

μL: Microlitro.

°C: Grados Celsius.

RESUMEN

Los carotenoides son compuestos lipídicos isoprenoides, que cumplen funciones vitales tanto en organismos vegetales como animales. En plantas participan en la fotosíntesis, fotoprotección y síntesis de ácido abscísico (ABA). En animales, los carotenoides son precursores de la vitamina A y actúan como antioxidantes, propiedad que está determinada por su estructura de dobles enlaces conjugados.

En plantas superiores la síntesis de carotenoides se inicia por la generación de fitoeno a partir del geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) proceso realizado por la enzima fitoeno sintasa (*PSY*) cuya actividad representa un punto clave de regulación de la ruta. En *Daucus carota*, nuestro modelo de estudio, se han descrito dos genes *psy* (*psy1* y *psy2*) y se ha demostrado que ambos genes se expresan tanto en hojas como en la raíz de reserva durante el desarrollo de esta planta. Además, estudios realizados en nuestro laboratorio indican que el gen *psy1* codifica para una enzima funcional lo cual fue determinado mediante complementación en un modelo heterólogo bacteriano. Respecto a *psy2* no ha sido posible evaluar su funcionalidad en un sistema bacteriano.

Para continuar con la caracterización de los genes fitoeno sintasa de *D. carota*, en este seminario de título se evaluó la funcionalidad del gen *psy1* mediante análisis bioquímico y molecular de plantas de *N. tabacum* transformadas con una construcción para expresar *psy1*.

Además se generaron líneas de *N. tabacum* transformadas con una construcción para expresar el gen *psy2*. De esta manera se espera obtener plantas transgénicas que serán analizadas en el futuro, para evaluar la funcionalidad de ambos genes en este organismo. Adicionalmente, se transformaron de manera estable

explantes de *D. carota* con una construcción para sobre-expresar *psy2* con el fin de continuar con la caracterización de ambos genes *psy* en nuestro modelo de estudio.

ABSTRACT

Carotenoids are lipophilic isoprenoids molecules that play vital functions in living organisms such as vegetals and animals. In plants, carotenoids are involved in photosynthesis, photoprotection and in abscisic acid (ABA) production. In animals, carotenoids are precursors of vitamin A and act as antioxidants, property determined by their structure of conjugated double bonds.

In higher plants, the biosynthesis of carotenoids begins with the generation of phytoene from two molecules of geranylgeranyl pirophosphate (GGPP) by the action of the enzyme phytoene synthase (*psy*) whose activity represents a key point in the regulation of this pathway. In carrot, our study model system, two *psy* genes (*psy1* and *psy2*) have been described and it we demonstrated that both genes are expressed both in the leaves as in the storage root during plant development. Moreover, experimental data of our investigation demonstrates that *psy1* encodes a functional enzyme through heterologous complementation in a bacterial system.

In order to determine if the gene product of *psy1* is functional in a vegetal model system, in the current thesis *N. tabacum* plants transformed with carrot *psy1* gene were evaluated in order to determine the functionality of the carrot *psy1* through molecular and biochemical analysis of the transgenic tobacco lines.

Regarding to *psy2*, it was not possible to evaluate their function in a bacterial model system. For this reason, in this work, a set of transformed tobacco lines with a construction to over-express the *psy2* gene in *N. tabacum* and *D. carota* were achieved. These plants will be analyzed in the future to continue with the characterization of both *D. carota psy* genes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Carotenoides: Estructura y función

Los carotenoides son un grupo abundante de pigmentos isoprenoides ampliamente distribuidos en la naturaleza (Maoka, 2009; Premvardhan y cols., 2009). Estas moléculas están conformadas por una cadena de polieno que posee entre 3 y 40 moléculas de carbono. La gran cantidad de enlaces conjugados presentes en esta molécula le brindan la capacidad de actuar como cromóforo, es decir como una molécula capaz de absorber luz y generar color (Christensen y cols., 2004; Polli y cols., 2004).

Los carotenoides se dividen en 2 grupos: aquellos formados solo por átomos de carbono e hidrógeno, los que se denominan carotenos y aquellos que poseen átomos de oxígeno en sus anillos, denominados xantófilas (Bhosale y Bernstein, 2005).

Estos pigmentos son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos (plantas, algas y cianobacterias) y algunas bacterias y hongos no fotosintéticos. En plantas y algas los carotenoides son sintetizados en los plastidios, tales como cloroplastos y cromoplastos. En los cloroplastos, los carotenoides en conjunto con otros pigmentos, tales como la clorofila *a* y *b*, se localizan y acumulan en las membranas tilacoidales (Apel y Bock, 2009; Guo y cols., 2009; Maass y cols., 2009), específicamente cerca del centro de reacción del fotosistema II en los complejos captadores de luz (CCL). Los carotenoides actúan como pigmentos accesorios en los CCL en donde absorben luz en un amplio rango del espectro azul (400-500 nm) y transfieren la energía absorbida a la clorofila *a* durante la fotosíntesis (Ritz y cols., 2000; Hobe y cols., 2006; Dall'Osto y cols., 2007; Bode y cols., 2009).

Por otra parte, los carotenos y xantófilas se acumulan en cuerpos lipídicos o en estructuras cristalinas en los cromoplastos de florés, frutas y raíces de reserva (Ampomah-Dwamena y cols., 2009; Kopsell y cols., 2009; Maass y cols., 2009).

Además, los carotenoides son precursores en la biosíntesis del ABA, una fitohormona involucrada en la dormancia de semillas, maduración y diferenciación de células vegetales embrionarias, apertura y cierre estomático y en la tolerancia al estrés abiótico (North y cols., 2007; Barrero y cols., 2008; Galpaz y cols., 2008). Los carotenoides también protegen a las células vegetales del daño foto-oxidativo neutralizando especies reactivas de oxígeno generadas en el centro de reacción del fotosistema II (Sies y Stahl, 2004; Stahl y Sies, 2005; Dall'Osto y cols., 2007; Stahl y Sies, 2007). Por otra parte, los carotenoides participan en la captura de la energía lumínica y otorgan color a flores y frutos haciéndolos atractivos a aquellos animales que participan en la dispersión del polen y las semillas, cumpliendo de esta manera un rol importante en la polinización (Bouvier y cols., 2005; Tanaka y cols., 2008; Rodriguez-Villalon y cols., 2009).

En animales, tales como aves, peces y crustáceos los carotenoides están involucrados en la pigmentación y nutrición. Por ejemplo, el cetocarotenoide astaxantina es responsable del color anaranjado de la carne de salmón y los caparzones de la langosta (McGraw y Nogare, 2004; Wade y cols., 2009). Los carotenoides también sirven como pigmentos en plantas ornamentales y en la industria cosmética y alimenticia (Das y cols., 2007; Giuliano y cols., 2008). En la nutrición humana algunos pigmentos carotenoides (por ejemplo β -caroteno, α -caroteno o criptoxantina) son convertidos a vitamina A después de ser clivados y reducidos. Otros carotenoides (por ejemplo licopeno, luteína y zeaxantina) funcionan como poderosos

antioxidantes y han sido asociados en la reducción de la probabilidad de desarrollar ciertos tipos de cáncer, enfermedades vasculares y trastornos visuales (Krisinsky y Johnson, 2005).

Sin embargo, los animales no pueden sintetizar carotenoides y debido a que éstos son una fuente esencial de retinoides y vitamina A, deben ser incorporados en la dieta a través de las frutas y verduras (Fierce y cols., 2008; Rehak y cols., 2008).

Debido a la importancia de los carotenoides para la salud animal y vegetal, la regulación de la biosíntesis de carotenoides ha sido estudiada por los últimos 40 años tanto a nivel básico como aplicado y la mayoría de los genes carotenogénicos en diversas especies de plantas han sido identificados y caracterizados (Yan y cols.; Cunningham y Gantt, 1998; Howitt y Pogson, 2006; Vasanthaiah y cols., 2006; Li y cols., 2008; Ji y cols., 2009). El conocimiento adquirido por estos estudios ha sido utilizado para aumentar el valor nutricional de múltiples plantas incrementando los niveles de β -caroteno y cetocarotenoides a través de la ingeniería metabólica (Shewmaker y cols., 1999; Diretto y cols., 2007; Fraser y cols., 2007; Aluru y cols., 2008; Lamers y cols., 2008).

1.2. Biosíntesis de carotenoides

La ruta de biosíntesis de carotenoides se encuentra altamente conservada y la mayoría de los genes involucrados en este proceso han sido descritos (Cunningham y Gantt, 1998; Lichtenthaler, 1999; Saakov, 2003; Zhu y cols., 2004).

Los genes carotenogénicos se localizan en el genoma nuclear y una vez que los productos génicos son sintetizados, las proteínas traducidas son destinadas a los

plastidios como pre-proteínas, lugar en que se modifican post-traduccionalmente a través del corte proteolítico de su extremo amino-terminal que funciona como una señal de destinación e importación a estos organelos (Soll y Schleiff, 2004).

La biosíntesis de carotenoides ocurre en los plastidios y comienza con la síntesis de isopenetenil pirofosfato (IPP) a través de la ruta del metileritritol pirofosfato (MEP) (Cunningham y Gantt, 1998; Lichtenthaler, 1999; Stange y cols., 2008). Las moléculas de IPP sintetizadas en los plastidios son isomerizadas a dimetilalilpirofosfato (DMAPP) por acción de la IPP isomerasa (IPI).

Tres moléculas de IPP se condensan con una molécula de DMAPP generando una molécula de 20 carbonos denominada geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), reacción catalizada por la enzima GGPP sintasa (GGPPS). Posteriormente, la enzima fitoeno sintasa (PSY) cataliza la unión cola-cola de dos moléculas de GGPP dando lugar al fitoeno, molécula de 40 carbonos que es el primer carotenoide de la ruta carotenógena (von Lintig y cols., 1997; Fraser y cols., 1999; Lois y cols., 2000; Li y cols., 2008; Rodriguez-Villalon y cols., 2009). La biosíntesis de carotenoides continúa con una serie de desaturaciones e isomerizaciones sobre la molécula de fitoeno para producir el pigmento licopeno de color rojo. Estas reacciones son catalizadas por la fitoeno desaturasa (PDS) que forma ζ -caroteno a partir de fitoeno, ζ -caroteno desaturasa (ZDS) la cual sintetiza pro-licopeno a partir de ζ -caroteno y la caroteno isomerasa (CRTISO) que transforma el pro-licopeno en licopeno. A continuación, el licopeno es transformado en diferentes moléculas bicíclicas. La enzima licopeno β -ciclaza (LCYB), convierte el licopeno en β -caroteno y la licopeno ϵ -ciclaza (LCYE) en conjunto con la LCYB generan α -caroteno. El β -caroteno sintetizado es utilizado como sustrato por la enzima β -caroteno hidroxilasa (C β Hx) para producir zeaxantina,

mientras que la hidroxilación del α -caroteno por la ϵ -caroteno hidroxilasa ($C\epsilon$ -Hx) y $C\beta$ Hx resulta en la formación de luteína (Stange y cols, 2008). La zeaxantina es convertida en violoxantina por acción de la zeaxantina epoxidasa y esta última es la molécula precursora para la síntesis de ABA, que ocurre en el citoplasma (Figura 1).

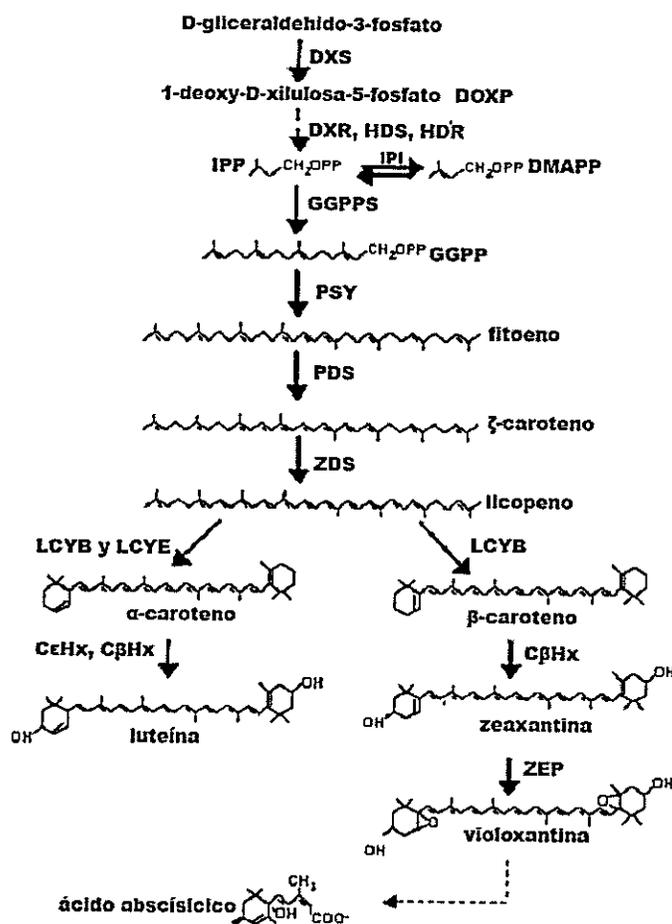


Figura 1. Representación de la biosíntesis de carotenoides en plantas. En la figura se muestran las enzimas y principales productos de esta ruta metabólica. Las enzimas que participan en la biosíntesis de carotenoides son: DXS: deoxy-xilulosa-5-fosfato sintasa. DXR: DOXP reductoisomerasa, HDS: HBMPP sintasa, HDR: HBMPP reductasa IPI: isopentenil pirofosfato isomerasa, GGPPS: geraniogeraniil pirofosfato sintasa PSY: fitoeno sintasa, PDS: fitoeno desaturasa, ZDS: ζ-caroteno desaturasa, CRTISO: caroteno isomerasa, LCYE: licopeno ϵ -ciclasa, LCYB: licopeno β -ciclasa, C β Hx: β -caroteno hidroxilasa, C ϵ Hx: ϵ -caroteno hidroxilasa y ZEP: zeaxantina epoxidasa. Modificado de Stange y cols, 2008.

Existe una atractiva hipótesis que postula que la carotenogénesis ocurre en un complejo multienzimático que estaría asociado a la membrana de los plastidios. Según esta hipótesis, existen tres enzimas solubles que catalizan la formación de fitoeno: IPP isomerasa (IPI), geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS) y fitoeno sintasa (PSY), las cuales han sido aisladas en complejos multienzimáticos (Cunningham y Gantt, 1998). En contraste, las enzimas fitoeno desaturasa (PDS), ζ -caroteno desaturasa (ZDS), licopeno β -ciclaza (LYCB) y licopeno ϵ -ciclaza (LYCE), que participan en la desaturación y ciclación de los carotenoides, conformarían un complejo multienzimático en la membrana del tilacoide (Bonk y cols., 1997; Cunningham y Gantt, 1998).

1.3. Regulación transcripcional de los genes carotenogénicos

La regulación a nivel transcripcional ha sido propuesta como el principal punto de regulación de la ruta carotenogénica. Entre los factores más estudiados, capaces de regular la expresión de los genes carotenogénicos a nivel transcripcional, se encuentra el proceso de desarrollo y el efecto de la luz sobre éstos. (Bramley, 2002; Howitt y Pogson, 2006; Tanaka y cols., 2008; Ito y cols., 2009). Durante el desarrollo de los órganos como las hojas, las flores y los frutos se observa un cambio de morfología, coloración y tamaño. Al respecto, existe una correlación directa entre la expresión de los genes carotenogénicos como *psy*, *lcyb*, y *cbhx* con la síntesis de los pigmentos en las variedades naranjas de damascos (Kita y cols., 2007) y cítricos (Kato y cols., 2004). En frutos de tomate, los carotenoides totales aumentan durante el desarrollo, con una concomitante disminución de los niveles de clorofila. La acumulación de carotenoides en frutos de tomate durante la maduración está determinada por la expresión diferencial de los genes que codifican las enzimas carotenogénicas. Durante

este proceso, los niveles de transcrito de los genes *psy1*, *pds*, *zds*, y *crts* aumentan (Giuliano y cols., 1993; Fraser y cols., 1994), mientras que los genes *lcyb* y *lcyf* dejan de transcribirse (Ronen y cols., 1999) originando una masiva acumulación de licopeno (Kato y cols., 2004). En relación a la regulación por luz se ha descrito que durante la de-etiolación de plántulas de *Arabidopsis*, proceso en el que ha sido reportado un importante incremento en los niveles de carotenoides y clorofila (requeridos para una transición al metabolismo fotosintético), se observa un incremento en los niveles del gen *psy* (Rodríguez-Villalón y cols., 2009; Toledo-Ortiz et al., 2010).

1.4. El gen fitoeno sintasa, *psy*

La primera reacción involucrada con la síntesis de carotenoides propiamente tal, comprende la participación de la enzima fitoeno sintasa (*PSY*) y ha sido propuesta como una enzima clave en la ruta carotenogénica (Cazzonelli y Pogson; Hirschberg, 2001; Giuliano y cols., 2008)

En plantas, fitoeno sintasa fue purificada por primera vez desde cromoplastos de *Capsicum annuum* en 1988 por Dogbo y cols. Posteriormente, en frutos de tomate, se identificó una fitoeno sintasa funcional mediante complementación heteróloga en bacterias (Bartley y cols., 1992). Un año después, se identificó y caracterizó el transcrito de un segundo gen *psy*: *psy2*, específico de hojas de tomate (Bartley y Scolnik, 1993).

A través de los años, el gen *psy* ha sido estudiado y caracterizado en distintas especies tales como *Arabidopsis thaliana* (Scolnik y Bartley, 1994), maíz (Buckner y cols., 1996), melón (Karvouni y cols., 1995), narciso (Schledz y cols., 1996), pimentón

(Romer y cols., 1993), tomate (Bartley y cols., 1992; Bartley y Scolnik, 1993) entre otras plantas superiores.

Por otro lado, se ha descrito que diversas especies de plantas tales como tabaco, tomate, zanahoria, arroz, maíz y genciana, poseen más de un gen *psy*. En tomate los parálogos de *psy* cumplen funciones órgano-específica; *psy1* es responsable principalmente de la biosíntesis de carotenoides en frutos y *psy2* en hojas y flores (Bartley y Scolnik, 1993; Fraser y cols., 1999). En arroz y maíz, la expresión de *psy1* y *psy2* es inducida por luz en órganos fotosintéticos, mientras que *psy3* es inducido por estrés hídrico y ABA (Li y cols., 2008; Welsch y cols., 2008).

El gen *psy* juega un importante papel en la síntesis de carotenoides durante el desarrollo de frutos y flores. En ambos procesos se ha descrito una directa relación entre los niveles de transcrito de *psy* con la acumulación de carotenoides.

Por ejemplo, se observó que los niveles de transcrito de *psy* aumentaban junto con los niveles de carotenoides en frutos de tomate (Fraser y cols., 1999) y frutos de cítricos (Ikoma y cols., 2001; Kato y cols., 2004). Además, el análisis de expresión de genes carotenogénicos de *G. lutea* durante el desarrollo floral y en diferentes órganos de la planta, revelaron que la expresión del gen *psy* se correlaciona directamente con la síntesis de carotenoides (Zhu y cols., 2002; Zhu y cols., 2003).

No obstante, también se ha descrito que la expresión del gen *psy* puede conducir a una disminución en la acumulación de carotenoides. Al sobre-expresar el gen *psy1* endógeno de plantas de *N. tabacum* se observó que líneas con elevados niveles de expresión de este gen presentaban, en algunos casos, una reducción en la acumulación de carotenoides. Además, al examinar el contenido de carotenoides en la

progenie de estas plantas, se observó que las líneas homocigotas para la inserción presentaban un contenido de carotenoides menor al detectado en plantas silvestres mientras que las heterocigotas poseían mayores niveles de carotenoides que las plantas silvestres (Busch et al., 2002).

Por otra parte, en plantas de *O. sativa* se reportó que un aumento en los niveles de transcrito del gen *Ospys3* durante estrés hídrico, se correlacionaba con una disminución en la acumulación de carotenoides y un aumento en los niveles de ABA (Welsch y cols., 2008).

Estos resultados destacan la importante función del gen *psy* en la carotenogénesis de diversos organismos vegetales y la capacidad de los respectivos productos proteícos de modificar el contenido de carotenoides ya sea de manera positiva o negativa dependiendo de la especie vegetal en estudio y los mecanismos de regulación subyacentes.

1.5. Los genes *psy1* y *psy2* en *Daucus carota*

Daucus carota (zanahoria) es una planta dicotiledónea bienal que sintetiza carotenoides tanto en su raíz modificada como en las hojas. La zanahoria es una de las mejores fuentes de carotenoides, en particular β -caroteno, contribuyendo aproximadamente el 17% de su ingesta en nuestra dieta (Alasalvar, 2001). Nuestros estudios indican que los niveles de carotenoides aumentan en paralelo al estado del desarrollo de la raíz modificada de *D. carota*, desde 16,6 $\mu\text{g/g}$ de peso a las 4 semanas hasta 968 $\mu\text{g/g}$ de peso seco a las 12 semanas (Pizarro, 2008).

En *D. carota* existen dos genes para varias de las enzimas carotenogénicas, entre ellas *PSY*. En la base de datos de NCBI se encuentran disponibles dos marcos de lectura abiertos para *PSY1* (DQ192186) y *PSY2* (DQ192187), sin embargo hasta la fecha no existen reportes sobre la funcionalidad de estos genes. Para comenzar a estudiar la regulación de la síntesis de carotenoides en *D. carota*, en nuestro laboratorio demostramos que durante el desarrollo de las hojas de *D. carota* variedad Nantes (de color naranja) ocurre un aumento en el nivel de ARNm del gen *psy1* y una disminución de ARNm de *psy2*, no obstante el contenido de carotenoides se mantiene constante durante el desarrollo. En contraste, durante el desarrollo de la raíz modificada ocurre un aumento en los niveles del ARNm de los genes *psy1* y *psy2* que se correlaciona con un aumento en los niveles de carotenoides (Pizarro 2008, Fuentes, 2009). Además, hemos determinado recientemente, que ABA induce la expresión del gen *psy2* y reprime la de *psy1* en plántulas de zanahoria, lo cual sugiere que las hormonas relacionadas con el crecimiento de la raíz están regulando la expresión de estos genes carotenogénicos.

Estudios realizados por otro grupo de investigación, reportaron la expresión diferencial de algunos de estos genes entre zanahorias blancas, amarillas, y rojas (Clotault y *co/s.*, 2008). En este estudio se observó que la expresión de los genes se correlacionó con la cantidad de pigmento en las raíces de las variedades coloreadas durante el desarrollo. Sin embargo, en la variedad cuya raíz modificada es blanca (Blanche), los genes carotenogénicos se expresan a pesar de no haber acumulación de los carotenoides. Este resultado indica que algunos de los genes carotenogénicos no siempre codifican enzimas funcionales. Por esta razón es necesario diseñar estrategias moleculares para verificar la funcionalidad de los genes carotenogénicos y

de esta manera aportar al entendimiento de la regulación de la síntesis de carotenoides en plantas.

Estudios realizados en nuestro laboratorio indicaron mediante complementación heteróloga en *E. coli* que el gen *psy1* de *D. carota* es funcional (Carvajal, 2010). Sin embargo, la funcionalidad del gen *psy2* aun no ha sido establecida. La complementación fue realizada en una cepa bacteriana que posee los genes carotenogénicos para la síntesis de β -caroteno pero con el gen *crfB* (*psy*) mutado. Debido a que el contexto funcional de las bacterias es totalmente diferente a la ruta metabólica de carotenoides en una planta, es importante determinar la función de estos genes en un sistema vegetal. Para cumplir este objetivo, en este seminario de título se evaluó molecular y bioquímicamente líneas de *N. tabacum* que expresaban el gen *psy1* de *D. carota*, se generaron líneas de *N. tabacum* transformadas con una construcción para expresar el gen *psy2* y se transformaron de manera estable explantes de *D. carota* con construcciones para sobre-expresar ambos genes de manera independiente. El desarrollo de estas estrategias moleculares permitió verificar que el gen *psy1* de *D. carota* es funcional en el modelo vegetal *N. tabacum* y próximamente se evaluará la funcionalidad de *psy2* en *N. tabacum* y de ambos genes *psy* en nuestro modelo de estudio. Ambos trabajos servirán como base para futuras aplicaciones biotecnológicas dado que la expresión heteróloga de estos genes en especies vegetales de interés comercial podría conducir a un aumento en la acumulación de carotenoides y con ello aumentar su valor comercial y nutricional.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Estudiar la funcionalidad del gen fitoeno sintasa 1 de *D. carota* (*psy1*) mediante la expresión en plantas de *N. tabacum* y desarrollar la metodología de expresión de *psy2* en *N. tabacum*.

2.2. Objetivos Específicos.

- Desarrollar el análisis molecular de las líneas de *N. tabacum* transformadas con la construcción *pGWB2/psy1*.
- Determinar el contenido de carotenoides en las plantas de *N. tabacum* transformadas con la construcción *pGWB2/psy1*.
- Generar la construcción *pGWB2/psy2* para la expresión de *psy2* de *D. carota* en *N. tabacum*.
- Obtener plantas de *N. tabacum* transformadas con la construcción *pGWB2/psy2*

2.3. Objetivo Adicional

- Transformar de manera estable explantes de *D. carota* con las construcciones *pGWB2/psy1* y *pGWB2/psy2* de manera independiente.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para analizar las líneas de *N. tabacum* transformadas con la construcción *pGWB2/psy1*, se extrajo ADN genómico (ADNg) y se amplificó mediante PCR los genes 18S y *hpt* (gen de resistencia a higromicina presente en el vector *pGWB2*) para verificar la calidad del ADN aislado y la transgénesis de las líneas de *N. tabacum*, respectivamente. Posteriormente, se realizó un RT-PCR del gen *psy1* para evaluar la expresión de este gen en las líneas transgénicas. Finalmente, se determinó el contenido de carotenoides de 3 líneas de *N. tabacum* silvestre y 8 líneas de *N. tabacum* T₀ transgénicas mediante espectrofotometría y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Para llevar a cabo la transformación de explantes de *N. tabacum* y *D. carota* con el ADN complementario (ADNc) de *psy2*, se generó el vector de entrada, *pCR8/psy2*. La construcción *pCR8/psy2* se utilizó para transformar células de *E. coli* quimiocompetentes y a través de PCR de colonia, digestión enzimática y secuenciación se verificó el éxito de la clonación. Posteriormente, este vector fue recombinado con el vector de destinación *pGWB2* para generar la construcción *pGWB2/psy2* que se utilizó para transformar células DH5 α quimiocompetentes. Luego de los análisis mediante PCR de colonia, PCR direccional, digestión enzimática y secuenciación para verificar la correcta clonación del ADNc de *psy2* en el vector *pGWB2*, se extrajo ADNp de uno de los clones para transformar la cepa de *A. tumefaciens* GV3101. Los clones de *A. tumefaciens* obtenidos, se analizaron mediante PCR de colonia para el gen *psy2* obteniéndose 1 clon positivo con el cual se realizó la transformación estable de explantes de *N. tabacum* y *D. carota*. Actualmente, en condiciones de invernadero, se tienen: 6 líneas de *N. tabacum* transformadas con la

construcción *pGWB2/psy2*; 3 líneas de *N. tabacum* transformadas con el vector *pGWB2* sin inserto y por último; 2 líneas de *N. tabacum* silvestre no transformado. Respecto a la transformación de explantes de *D. carota*; en la actualidad se tienen 14 explantes transformados con la construcción *pGWB2/psy1* 20 explantes transformados con la construcción *pGWB2/psy2* y 11, explantes transformados con el vector *pGWB2* sin inserto mantenidos en MSI desde hace 4 semanas

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos

Se utilizaron reactivos de calidad apropiada para desarrollar las técnicas de biología molecular requeridas. Estos productos se obtuvieron de empresas y marcas registradas tales como Promega, Invitrogen, Fermentas, Axygen y Merck.

4.2. Material Biológico

- ***Escherichia coli* DH5 α** : *gyrA96*, Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15), *recA1*, *hsdR17*, *endA1*, *thi-1*, *relA1* *supE44*. Fue transformada con las construcciones de interés con el fin de multiplicarlas y posteriormente aislarlas y analizarlas mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación.
- ***Agrobacterium tumefaciens***: Cepa GV3101. Gen^R, Rif^R. Esta cepa se utilizó para la transformación estable de explantes de .
- ***Nicotiana tabacum* (cultivar Xanthi NN)**: En esta variedad de fue insertado el gen *psy1* y *psy2* de *D. carota* mediante transformación mediada por *A. tumefaciens*
- ***Daucus carota* (variedad Nantes)**: De esta variedad se obtuvieron explantes que fueron transformados con las construcciones para sobre-expresar los genes *psy1* y *psy2* endógenos

4.3. Plásmidos

- **pCR8/GW/TOPO (Invitrogen)**: Vector de clonamiento o vector de entrada de tipo Gateway® que permite el clonamiento de productos de PCR amplificados con la enzima Taq ADN polimerasa. El clonamiento está mediado por la enzima Topoisomerasa asociada al vector. Luego del clonamiento el gen de interés queda flanqueado por los sitios de recombinación attL1 y attL2 que hacen posible la recombinación del gen de interés a un vector de destinación. El vector pCR8 posee un origen de replicación pUC y resistencia a espectinomicina.
- **pGWB2**: Es un vector de destinación de tipo binario que permite la expresión constitutiva de un gen de interés bajo el promotor constitutivo 35S. Posee el gen de resistencia a higromicina (*hpt*) para seleccionar plantas exitosamente transformadas y además el gen que codifica la resistencia a kanamicina (*nptII*) para seleccionar tanto bacterias como plantas exitosamente transformadas. Este vector posee los sitios de recombinación attR1 y attR2 los cuales recombinan con los sitios attL1 y attL2 presentes en el vector de entrada dando origen a los sitios attB1 y attB2 que flanquean al gen de interés después de la reacción de recombinación. Su peso molecular es 17,2 Kb aproximadamente. Es importante mencionar que en general, el gen de interés conserva su orientación en el vector de destinación luego de la reacción de recombinación entre el vector de entrada y el vector de destinación.

4.4. Medios de cultivo

4.4.1. Medios de cultivo para crecimiento bacteriano

Para el crecimiento bacteriano se utilizaron los medios de cultivo cuyo nombre y composición se detallan a continuación:

- **LB líquido:** NaCl 0,8% (p/v), Triptona 1% (p/v) y extracto de levadura 0,5% (p/v).
- **LB-agar :** NaCl 0,8% (p/v), Triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v) y agar 1,6% (p/v) .

4.4.2. Medios de cultivo para crecimiento de explantes transformados

a) Para el crecimiento y organogénesis de los explantes de *N. tabacum* transformados se utilizaron los siguientes medios:

1. **MS-agar:** MS (Medio basal Murashige & Skoog con vitaminas, PhytoTechnology Laboratories TM) 0,44% p/v, myo-inositol 100 ppm, sacarosa 20% p/v. pH = 5,8.
2. **MSI:** Medio MS-agar, cefotaxima 300 mg/L, IBA 1mg/L, BAP 5mg/L, kanamicina 25mg/L.
3. **MSII:** Medio MS-agar, kanamicina 50 mg/L, cefotaxima 300 mg/L.
4. **MSIII:** Medio MS-agar, kanamicina 100 mg/L, cefotaxima 150 mg/L.
- 5.

b) Para el crecimiento y embriogénesis de los explantes de zanahoria transformados los medios utilizados fueron:

1. **MSI:** Medio MS-agar, cefotaxima 300 mg/L, 2,4 D 1 mg/L, kanamicina 25mg/L.

2. **MSII:** Medio MS-agar, cefotaxima 300 mg/L, 2,4 D 0,5 mg/L, kanamicina 50 mg/L.
3. **MSIII:** Medio MS-agar, cefotaxima 150 mg/L, kanamicina 100 mg/L.

4.5. Partidores

Los partidores empleados en esta tesis fueron sintetizados en ADT&IDT (Promega). Los partidores fueron resuspendidos en agua nanopura y se mantuvieron a una concentración de 250 μ M a -20 °C. Para las reacciones de PCR todos los partidores fueron utilizados a una concentración de 10 μ M. Las características principales de los partidores empleados se detallan a continuación (Tabla 1).

Tabla 1: Partidores utilizados en este seminario de Título. La letra F hace referencia al partidor sentido mientras que la letra R denota al partidor en antisentido. Además se muestra la secuencia para amplificar la región 5' del promotor (p) 35S presente en el vector pGWB2

Gen Objetivo	Partidores	Secuencia (5'→3')	Tm Partidor (°C)	Fragmento esperado (pb)
18S	18S-F	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT	55	180
	18S-R	ACAATGATCCTTCCGCAGGT	55	
<i>psy1</i>	<i>psy1</i> -F	ACTAGTATGGCTTGTAATTTTGCT	59	1197
	<i>psy1</i> -R	CACGTGCTATCTTACAGTAGAAGG	59	
<i>psy2</i>	<i>psy2</i> -F	CGCACGTGTCATGTTTTCAGAAACG	58	1317
	<i>psy2</i> -R	GGACTAGTAATGTCAGTTGCTATGTC	58	
<i>hpt</i>	<i>hpt</i> -F	TTTGTGTACGCCGACAGT	55	624
	<i>hpt</i> -R	TCGGTTTCAGGCAGGTCTT	55	
35S (P)	35S-F	AGAACTCGCGTAAAGAGTG	55	612

4.6. Metodología

En esta sección se detallarán los procedimientos realizados para el análisis molecular y bioquímico de las plantas de *N. tabacum* transformadas con la construcción *pGWB2/psy1*. La transformación de estas plantas fue realizada en el Seminario de Título de Romina Carvajal (Carvajal, 2010). Posteriormente, se mencionarán los procedimientos realizados con el fin de generar y analizar molecularmente las construcciones necesarias para sobre-expresar el gen *psy2* de *D. carota* en plantas de *N. tabacum* y *D. carota*. Finalmente, se detallará el proceso de transformación, organogénesis y selección de las plantas transformadas.

4.6.1. Extracción de ADN genómico (ADNg) de plantas de silvestres y transformadas con la construcción *pGWB2/psy1*

Se tomaron 100 mg de hojas de plantas de *N. tabacum* de 3 meses de edad los cuales fueron congelados con N₂ líquido y posteriormente macerados. El macerado fue transferido a un tubo Eppendorf que contenía una mezcla de 600 µL de tampón Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y 4 µL de β-mercaptoetanol precalentado a 60 °C durante 30 min y luego fue incubado a 60° C por 30 min. Posteriormente, se añadió 400 µL de tampón CTAB y se incubó a 70 °C por 15 min. Luego, se agregó 400 µL de una mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión 3 veces. La mezcla fue centrifugada a 13.000 rpm por 10 min a 4 °C. El 50% de la fase superior fue recuperada en tubos Eppendorf estériles. Se agregó 700 µL de isopropanol mantenido a 4 °C y se dejó por 30 min a -20 °C para favorecer la precipitación del ADN. Luego se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se añadió 700 µL de etanol 70 %. Se centrifugó a 13.000 rpm por 5

min y en seguida se secaron las muestras a temperatura ambiente por 20 min. El ADNg fue resuspendido en 20 μ L de agua nanopura. Este protocolo fue aplicado para 8 líneas transformadas con la construcción *pGWB2/psy1* y 1 planta de *N. tabacum* silvestre (control no transformado).

4.6.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

Los ácidos nucleicos fueron visualizados en geles de agarosa al 1% y 1,5% en tampón de corrida TAE 1X (ácido acético glacial 19 mM, Tris-base 40 mM, EDTA 1 mM) y posteriormente teñidos en una solución de bromuro de etidio (BrEt) 20 mg/L, agente que se intercala en el ADN, por 20 min. Las muestras fueron mezcladas con el tampón de carga (azul de bromofenol 0,25%, xilencianol 0,25% y glicerol 80%) previo a ser cargadas en el gel. Para la migración electroforética se utilizó 5 V/cm durante 45 min para separar moléculas de ADN y 3,5 V/cm durante 35 min para ARN. Las bandas de ácidos nucleicos fueron visualizadas por la fluorescencia emitida por el BrEt al ser expuesto a luz UV. Las imágenes fueron capturadas con el equipo Dark Room Multigenius Syngene a través del programa Gene Snap de Syngene. La fluorescencia fue cuantificada utilizando el programa ImageJ.

4.6.3. Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).

4.6.3.1. Protocolo general.

Para amplificar los genes *psy1*, *psy2*, *18s* y *hpt* a partir de ADNg, ADNp, ADNc y de colonias transformantes, se mezclaron 2,5 μ L del tampón correspondiente a la enzima utilizada para la reacción (Elongasa[®], Taq, Paq), 1 μ L de MgCl₂ 50 mM

(Bioline), 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 0,5 µL partidor sentido y antisentido 10 µM, 1U de la enzima ADN polimerasa además de ADN (30 a 50 ng) y agua libre de nucleasas suficiente para completar 25 µL de reacción. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador MyCycler™ de BIO RAD.

Los detalles para la amplificación de cada uno de los genes mencionados se detallan en las tablas 2A, 2B, 2C y 2D.

Tabla 2A. PCR para amplificar el gen 18S con el fin de evaluar la calidad de los ADNg extraídos y los ADNc sintetizados

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NUMERO DE CICLOS
Denaturación inicial	94	3 min	1
Denaturación	94	45 segundos	35
Hibridación	55	45 segundos	
Extensión	72	45 segundos	
Extensión Final	72	10 min	1
Mantención	10	∞	1

Tabla 2B. PCR para amplificar los genes *psy1* y *psy2*

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NUMERO DE CICLOS
Denaturación inicial	95	3 min	1
Denaturación	94	50 segundos	35
Hibridación	59 (<i>psy1</i>) y 58 (<i>psy2</i>)	40 segundos	
Extensión	72	1' 35 segundos	
Extensión Final	72	10 min	1
Mantención	10	∞	1

Tabla 2C. PCR de colonia para amplificar los genes *psy1* y *psy2*

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Denaturación inicial	95	5 min	1
Denaturación	94	50 segundos	35
Hibridación	59 (<i>psy1</i>) y 58 (<i>psy2</i>)	40 segundos	
Extensión	72	1' 35 segundos	
Extensión Final	72	10 min	1
Mantención	10	∞	1

Tabla 2D. PCR para amplificar el gen *hpt*

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Denaturación inicial	95	4 min	1
Denaturación	94	30 segundos	35
Hibridación	59 (<i>psy1</i>) y 58 (<i>psy2</i>)	45 segundos	
Extensión	72	40 segundos	
Extensión Final	72	10 min	1
Mantención	10	∞	1

4.6.3.2. PCR de colonia.

Para verificar si el gen *psy2* fue clonado en los vectores de entrada y destinación, es decir pCR8 y pGWB2 respectivamente, se amplificó mediante PCR colonia el gen *psy2* de *D. carota* a partir de colonias transformantes.

Para ello, se disolvió un inóculo de las colonias de *E. coli* Dh5 α transformadas con la construcciones *pCR8/psy2* y *pGWB2/psy2* en una alícuota de 10 μ L de agua nanopura estéril. De esta mezcla se tomó 1 μ l y se agregó como ADN a la mezcla. El

protocolo para realizar la amplificación fue descrito previamente (PCR protocolo general). En las reacciones de PCR fue incluido un control positivo en el cual se utilizó como molde ADN previamente verificado. Además, se realizó un control negativo en el cual no se agregó ADN.

4.6.4. Extracción de ARN de *N. tabacum*.

La extracción de ARN total de *N. tabacum* fue realizada empleando el reactivo Trizol[®] de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Se extrajo ARN de las 8 plantas transformadas con la construcción *pGWB2/psy1* y de 3 plantas de silvestres. El tejido del cual fue extraído el ARN fue obtenido desde 3 hojas distintas de similar edad y tamaño para las plantas transformadas y de una hoja de cada una de las líneas silvestres analizadas.

De cada una de las hojas se tomaron 33 mg de modo que la cantidad de tejido que se utilizó para cada extracción fue 99 mg. El tejido fue colocado en un mortero previamente esterilizado y frío y se congeló utilizando N₂ líquido. Posteriormente, se maceró el tejido y se añadió 1 mL del reactivo Trizol[®] mezclando inmediatamente el reactivo con el tejido pulverizado. El homogeneizado obtenido se incubó por 5 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de complejos nucleoproteicos y luego se añadió 0,2 mL de cloroformo mantenido a 4 °C. La mezcla se agitó manualmente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. A continuación las muestras se centrifugaron a 12.000g por 15 min a 4 °C y se traspasó el 60 % de la fase acuosa, a tubos Eppendorf estériles. Se agregó 0,5 mL de isopropanol y luego se resuspendió por inversión 3 veces. La solución resultante se

incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g por 10 min a 4 °C para precipitar el ARN. El sobrenadante se eliminó y se añadió 1 mL de etanol 75 % v/v disuelto en agua tratada con DEPC. Se agitó vigorosamente y se centrifugó a 7000 g por 5 min a 4° C. Posteriormente el ARN fue secado a temperatura ambiente casi completamente y finalmente, fue resuspendido en 20 µL de agua tratada con DEPC.

4.6.5. RT-PCR del gen *psy1*

4.6.5.1. Tratamiento del ARN de las líneas de *N. tabacum* silvestres y transformadas con la construcción *pGWB2/psy1* con DNAsa I.

Se tomaron 2 µg del ARN de cada una de las líneas de interés y se añadieron 50 unidades de DNAsa I libre de RNAsa (Fermentas), 1 µL de tampón DNAsa 10X, 0,5 µL de inhibidor de RNAsa y se completó hasta 10 µL con agua previamente tratada con Di-etil-piro-Carbonato (DEPC). Esta mezcla se incubó durante 15 min a 37 ° C y luego se puso en hielo por 3 min. Finalmente, se agregó 1 µL de EDTA 25 mM disuelto en agua DEPC con el fin de inactivar la enzima DNAsa I.

4.6.5.2. Transcripción Reversa para sintetizar ADNc

Se tomaron 5,5 µL de la reacción tratada con DNAsa (que corresponde a 1 µg de ARN) y se añadió 1 µL de Oligo AP (5'TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGCTTCG3') 10 µM. Esta solución se incubó en el termociclador durante 5 min a 70° C y luego se puso en hielo por 3 min. Posteriormente, se añadió 13,5 µL de una mezcla que contenía: 0,5 µL de inhibidor de RNAsa I, 4 µL de tampón 5X Improm II, 2,5 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de dNTPs 10 µM disueltos en agua tratada con DEPC, 4,5 µL de agua tratada con DEPC y 1 µL de la enzima RT Improm II (Promega). La mezcla se incubó a 25 °C por 5

min para la hibridación del partidor Oligo AP con el ARN. Luego, se elevó la temperatura a 42 °C por 60 min para la extensión de la cadena de ADNc y finalmente se mantuvo a 70 °C por 15 min para inactivar la enzima transcriptasa reversa.

Para verificar la integridad del ADNc generado se amplificó mediante RT-PCR el gen 18S utilizando 1µL del ADNc sintetizado como molde. Posteriormente, se amplificó el gen *psy1* de *D. carota* a partir de 1 µL de cada uno de los ADNc sintetizados. Para investigar la presencia de ADN en las extracciones de ARN se realizó un control denominado sin RT en el cual se utilizó el ARN tratado con DNAsa como molde en lugar del ADNc correspondiente a dicho ARNm. El ARN se degrada durante el proceso de amplificación mediante PCR, específicamente durante el paso de desnaturalización. En consecuencia, si se obtiene el producto de amplificación esperado utilizando ARN como molde, queda de manifiesto la presencia de ADN genómico contaminante.

4.6.6. Determinación de la concentración de Carotenoides en las plantas de *N. tabacum* transformadas con la construcción *pGWB2/psy1* y silvestres

4.6.6.1. Extracción de Carotenoides.

Para cada una de las líneas transgénicas analizadas se tomaron aproximadamente 100 mg de tejido obtenido de 3 hojas de similar tamaño y edad. En el caso de las líneas silvestres, las hojas fueron obtenidas de 3 plantas distintas pero las hojas fueron también similares en tamaño y edad. De cada una de las hojas recolectadas se tomaron aproximadamente 33 mg de tejido. El tejido recolectado fue macerado en un mortero previamente esterilizado y frío en presencia de N₂ líquido.

Posteriormente, se agregó 4 mL de una solución de hexano/acetona/etanol (2/1/1 v/v) para luego homogeneizar. El homogeneizado se traspasó a tubos Eppendorf, se agitó en vortex durante 2 min y se mantuvo en hielo y oscuridad por otros 2 min. Luego, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C. Los carotenoides se recuperaron de la fase superior, recolectándolos en un tubo falcon de 15 mL.

Durante todo el proceso de extracción el homogeneizado y extracto se mantuvieron en oscuridad y hielo. Finalmente, la solución que contenía los carotenoides extraídos fue secada con N₂ gaseoso.

4.6.6.2. Cuantificación de carotenoides totales mediante espectrofotometría

Los pigmentos extraídos y secados previamente con N₂ gaseoso fueron resuspendidos en 2 mL de éter de petróleo. Luego, se midió la concentración total de carotenoides de esta solución en un espectrofotómetro (Shimadzu) a 474 nm.

Para este fin, se tomó una alícuota de 100 µL de los carotenoides resuspendidos y se añadieron 400 µL de éter de petróleo. Esta mezcla se trasladó a una cubeta de cuarzo y se midió su absorbancia a 474 nm. Luego de determinar este parámetro, la mezcla fue devuelta al tubo falcon del cual provenían los pigmentos y se secó la extracción nuevamente utilizando N₂ gaseoso. Las muestras fueron guardadas a -80 °C para su posterior análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa. La ecuación que se utilizó para determinar la concentración de carotenoides totales es la siguiente:

$$C. \text{ de carotenoides} = \frac{\text{Volumen de Resuspensión [mL]} \times \text{Absorbancia} \times 100}{21 \times 0,11 \left[\frac{\text{g}}{\text{g peso fresco}} \right] \times \text{cantidad de tejido [mg]}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde C. de carotenoides representa la concentración de carotenoides expresada en [$\mu\text{g/g}$ peso seco].

4.6.6.3. Determinación de la composición de carotenoides mediante HPLC.

La fracción de carotenoides se resuspendió en 200 μL de acetona (MERCK). Se utilizaron 20 μL de esta solución para el análisis mediante HPLC en fase reversa. Este análisis fue realizado en una columna Hipersy C18 de fase reversa de 15 cm. La fase móvil utilizada fue acetonitrilo/metanol/isopropanol (85/10/5 v/v), con un flujo de 1 mL/min. Mediante el análisis de los cromatogramas detectados a 474 nm, específicamente según los tiempos de retención y los espectros de absorción obtenidos, se determinaron los carotenoides presentes de manera predominante en las muestras.

4.6.7. Purificación de ADN desde los geles de agarosa

El ADN fue purificado desde geles de agarosa utilizando el kit ADN Wizard® (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se utilizó para la reacción de ligación en el vector pCR8 del ADNc correspondiente al gen *psy2* de *D. carota*.

4.6.8. Generación de la construcción pCR8/psy2

Previamente estaba disponible en el laboratorio la construcción *pCR8/psy2* (Carvajal, 2010). Sin embargo, el ADNc correspondiente a *psy2* estaba en antisentido respecto al sitio de recombinación attL1 presente en este vector. Esta construcción daría origen a una clonación en antisentido en el vector de destinación pGWB2 de

acuerdo a la tecnología Gateway® empleada y no sería útil para el desarrollo del resto de estrategias moleculares contempladas en este seminario de título. Por esta razón el ADNc de *psy2* fue amplificado mediante PCR utilizando como molde ADN plasmidial correspondiente a la construcción *pCR8/psy2* en antisentido y la enzima Elongasa® como ADN polimerasa. El producto de PCR fue purificado desde un gel de agarosa (sección 5.6.7) y fue nuevamente clonado en el vector pCR8 utilizando el protocolo de clonamiento pCR8/GW/TOPO® TA (Kit de Clonamiento de Invitrogen). Este vector posee una enzima del tipo topoisomerasa unida covalentemente al sitio de clonamiento múltiple que tiene la capacidad de ligar las hebras de ADN, generadas mediante PCR con el vector de entrada. Luego de que la clonación ocurre, la enzima se escinde del vector. En la reacción se utilizó 150 ng del fragmento purificado, 50 ng de vector, 1 µL de solución salina (0,2 M de NaCl y 0,01 M de MgCl₂) y agua nanopura hasta completar el volumen final de 6 µL. Luego, la reacción se incubó a temperatura ambiente por 3 horas para en seguida transformar células de *E. coli* Dh5α quimiocompetentes. Las células se plaquearon en medio LB sólido con espectinomicina 100 mg/L y luego de 16 horas de cultivo a 37° C se identificaron las colonias exitosamente transformadas mediante PCR de colonia para el gen *psy2*. Aquellas colonias positivas para este PCR se crecieron en medio LB líquido y se les extrajo ADN plasmidial (Sección 4.6.12.12). Mediante análisis con enzimas de restricción se determinaron los clones que presentaban el ADNc de *psy2* en sentido respecto al sitio de recombinación attL1 del vector pCR8. Los clones positivos se guardaron a -80°C con glicerol (300 µL de glicerol 80 % y 500 µl de células). Posteriormente uno de los clones positivos se envió a secuenciar.

4.6.9. Generación de la construcción pGWB2/psy2

La construcción pGWB2/psy2 fue generada mediante la tecnología Gateway®, la cual se basa en una reacción de recombinación entre un sustrato con los sitios de recombinación attL (incorporados en el vector de entrada) y un sustrato con los sitios attR (presentes en el vector de destinación). Esta reacción es catalizada por la enzima LR Clonasa™ (Invitrogen). Para ingresar la secuencia de interés a la plataforma de clonación Gateway®, se utilizó el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) que contenía el gen *psy2* de *Daucus carota* (pCR8/psy2) y como vector de destinación, el vector pGWB2 (Invitrogen). El 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 ADN girasa de *E. coli*, inhibiendo el crecimiento de las cepas de *E. coli* comúnmente empleadas en el laboratorio (Ej: DH5α). En consecuencia, después de transformar las células con el producto de la recombinación, no serán capaces de sobrevivir aquellas que posean el vector de destinación sin recombinar. Este hecho facilita el análisis posterior de las colonias generadas (Catálogo Gateway® Technology Invitrogen).

La reacción de recombinación se realizó en 10 µL totales los cuales contenían 50 ng del vector de entrada pCR8/psy2 obtenido de un clon en que el gen se encontraba en orientación sentido con respecto al sitio de recombinación attL1), 150 ng del vector de destinación pGWB2 y tampón Tris-EDTA pH 8. La mezcla se incubó en hielo durante 2 min y luego se agitó suavemente durante unos segundos. Luego, se agregó 2 µL de LR Clonasa™ II (Invitrogen) y se dejó incubando toda la noche a 25°C. Para detener la reacción se agregó 1 µL de Proteínasa K (Invitrogen) y se incubó por 10 min a 37 °C. Finalmente, se transformaron las células quimiocompetentes de *E. coli*

DH5 α (Sección 5.6.11) con 50 ng del producto de la recombinación y se seleccionaron los clones transformantes en placas de LB sólido con kanamicina 100 mg/L.

4.6.10. Quimiocompetencia de células

4.6.10.1. Quimiocompetencia de la cepa de *E. coli* DH5 α

Para obtener células DH5 α aptas para ser transformadas, se realizó el protocolo de quimiocompetencia. Para ello, se creció un preinóculo de células en 5 mL de medio LB líquido con ácido nalidíxico 100 mg/L durante la noche y posteriormente se tomó 1 mL de este cultivo y se inoculó en 100 mL de medio LB líquido con ácido nalidíxico 100 mg/L. Las células fueron crecidas hasta densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0,3. Luego el cultivo fue repartido en 2 tubos falcon de 50 mL previamente enfriados y se centrifugó a 3000 g por 15 min a 4 °C para precipitar las células. Se descartó el sobrenadante y en cada tubo las células fueron resuspendidas suavemente en 5 mL de tampón CCMB80 a 4°C (KOAc 10 mM pH 7,0, CaCl₂.2H₂O 80 mM, MnCl₂.4H₂O 20 mM, MgCl₂.6H₂O 10 mM y glicerol a una concentración final de 10 % v/v, pH 6,4).

Luego, se añadió más tampón CCMB80 a cada tubo hasta completar 20 mL y se juntó en un solo tubo el total de células resuspendidas. Posteriormente, se centrifugó a 3.000 g por 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió las células en 5 mL de tampón CCMB80 frío. Las células se repartieron en tubos Eppendorf fríos en alícuotas de 50 μ L por tubo y se congelaron inmediatamente en N₂ líquido después de repartir. Finalmente, las células se guardaron a -80 °C para su posterior utilización.

4.6.10.2. Quimiocompetencia de la cepa de *A. tumefaciens* GV3101

Se creció una única colonia de *A. tumefaciens* cepa GV3103 en 10 mL de medio LB líquido con los antibióticos rifampicina 10 mg/L y gentamicina 100 mg/L durante la noche a 28 ° C. Posteriormente 1 mL del cultivo fue inoculado en 100 mL de medio LB con los antibióticos rifampicina 10 mg/L y gentamicina 100 mg/L y se dejó crecer a 28 °C con agitación constante hasta una DO_{600} de 0,5. Luego, se centrifugó el cultivo a 10.000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y las células precipitadas fueron resuspendidas en 20 mL de $CaCl_2$ 0,1M. A continuación las células fueron nuevamente centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y las células precipitadas fueron resuspendidas en 5 mL de $CaCl_2$ 0,1M. Las células se repartieron en tubos Eppendorf fríos en alícuotas de 50 μ L por tubo y se congelaron inmediatamente en N_2 líquido después de repartir. Finalmente, las células se guardaron a -80 °C para su posterior utilización.

4.6.11. Transformación de *E. coli* DH5 α quimiocompetentes

Para transformar las células DH5 α con los vectores *pCR8/psy2* y *pGWB2/psy2* se empleó el siguiente protocolo: Se descongeló una alícuota de *E. coli* DH5 α quimiocompetente en hielo, se añadió 50 ng de la ligación correspondiente y se mantuvo en hielo por 30 min. Luego, las células fueron sometidas a shock térmico a 42 °C por 30 segundos y se dejaron en hielo por 2 min. Posteriormente, se agregó 1 mL de LB líquido sin antibiótico y se dejó crecer las células por una hora a 37 ° C en agitación constante. Finalmente, las células fueron centrifugadas a 4000 rpm por 5 min, resuspendidas en 100 μ L de sobrenadante y plaqueadas en medio LB sólido con el antibiótico adecuado (espectinomicina 100 mg/L para la construcción *pCR8/psy2* y

kanamicina 50 mg/L para la construcción *pGWB2/psy2*). En cada transformación se incluyeron 3 controles: 1) células no transformadas sometidas al proceso de transformación y plaqueadas en medio sin antibiótico 2) células no transformadas sometidas al proceso de transformación y plaqueadas en el medio LB con el antibiótico correspondiente 3) células transformadas con el vector correspondiente sin inserto y plaqueadas en medio con el antibiótico adecuado. Estos controles fueron realizados para 1) verificar la viabilidad de las células luego de la transformación, 2) descartar la presencia de algún microorganismo contaminante y 3) verificar la competencia de las células utilizadas.

4.6.12. Extracción del ADN plasmidial de células de *E. coli* Dh5 α

Para la extracción del ADN plasmidial se utilizó el kit Axyprep™ de Axygen siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. El ADN plasmidial se empleó para realizar los procedimientos de ligación, transformación, análisis de digestión enzimática y secuenciación.

4.6.13. Digestión enzimática de las construcciones *pCR8/psy2* y *pGWB2/psy2*

La construcción *pCR8/psy2* fue digerida con la enzima BstEII (Fermentas) para verificar la orientación del gen *psy1* en el vector pCR8. La reacción contenía 200 ng de ADN plasmidial de los clones positivos por PCR de colonia, 1X del tampón de BstEII, 5U de BstEII y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 20 μ L. La mezcla fue incubada por 1 hora a 37 °C en un baño termostático. La construcción *pGWB2/psy2* fue digerida con la enzima NdeI (Fermentas) siguiendo el mismo

procedimiento descrito para verificar la orientación de *psy2* en el vector pCR8 y verificar así los clones en sentido.

4.6.14. Secuenciación de las construcciones pCR8/*psy2* y pGWB2/*psy2*

Los clones de *E. coli* positivos para las construcciones *pCR8/psy2* y *pGWB2/psy2* identificados mediante análisis de PCR de colonia y digestión enzimática fueron enviados a secuenciar a Macrogen Co. (USA), utilizando los partidores del fago M13 (-20) Sentido y M13 (-40) Antisentido para la construcción *pCR8/psy1*. Para la construcción *pGWB2/psy2* se utilizaron los partidores del promotor 35S-F y *psy1-R* disponibles en el laboratorio (Tabla 1). El objetivo de la secuenciación fue verificar posibles cambios en el marco de lectura del gen de interés o mutaciones generadas luego de la amplificación por PCR de esta secuencia.

4.6.15. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 con la construcción pGWB2/*psy2*

Para la transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*, se descongeló una alícuota de 100 µL en hielo la cual fue mezclada con 500 ng de la construcción *pGWB2/psy2*. Luego, la mezcla se congeló en nitrógeno líquido durante 5 min. Transcurrido el tiempo, se descongeló a temperatura ambiente durante 15 min. Se añadió 1 mL de medio LB líquido y se crecieron las células a 28 °C durante toda la noche con agitación constante. Finalmente, las células fueron plaquedas en medio LB sólido con los antibióticos rifampicina 10 mg/L, gentamicina 100mg/L y kanamicina 100 mg/L. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 horas.

Las colonias obtenidas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 fueron analizadas mediante PCR de colonia para determinar si poseían el gen *psy2*.

4.6.16. Transformación estable de explantes de *N. tabacum* con la construcción *pGWB2/psy2*

Para la transformación de explantes de *N. tabacum* se seleccionó un clon positivo de *Agrobacterium tumefaciens* para la construcción *pGWB2/psy2* mediante PCR de colonia para el gen *psy2* de *D. carota* y 100 μ L de éste se inocularon en 15 mL de LB líquido con los antibióticos adecuados (rifampicina 10 mg/L, gentamicina 100mg/L y kanamicina 100 mg/L). El cultivo se incubó a 28 °C durante 16 horas con agitación constante. A continuación, se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 min para precipitar las células. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron resuspendidas en 25 mL de medio MS líquido con acetosiringona (100 μ M). Las células fueron crecidas en este medio hasta DO_{600} de 0,5. Posteriormente, este cultivo fue depositado en una placa de Petri estéril bajo flujo laminar. En esta placa se incubaron explantes de *N. tabacum* (trozos de hojas de 1 cm² aproximadamente, de plantas cultivadas *in vitro*) estériles a las cuales se les hizo incisiones durante 10 min para permitir la infección de *A. tumefaciens*. A continuación, los explantes fueron secados en papel estéril y depositados en placas con medio MS-Agar (sección 5.4.2.a.1). Estas placas se incubaron durante 2 días en oscuridad a 22 °C.

Transcurridos los 2 días, los explantes fueron lavados con agua estéril para eliminar posible contaminación con *A. tumefaciens* , secados y trasladados a placas con Medio I (MSI medio de inducción, Sección 5.4.2.a.2) y cultivados bajo fotoperíodo de 16 hrs luz a 22 °C. Luego de 4 semanas, los explantes fueron trasladados al Medio

II (MSII, Sección 5.4.2.a.3) para la elongación de los brotes y luego de tres semanas los brotes fueron separados y trasladados al Medio III (MSIII, Sección 5.4.2.a.4). Luego de aproximadamente 4 semanas en Medio III, las líneas se comenzaron a trasladar a tierra hasta su evaluación.

4.6.17. Transformación estable de explantes de *D. carota* con la construcciones *pGWB2/psy1* y *pGWB2/psy2*

Para la transformación de explantes de *D. carota* con las construcciones *pGWB2/psy1* y *pGWB2/psy2* se crecieron clones de *A. tumefaciens* positivos para ambas construcciones mediante PCR de colonia de la manera descrita en la sección 5.6.3.2. Los explantes de *D. carota* que fueron transformados corresponden a trozos de hipocótilo de 1 cm de longitud obtenidos de plántulas crecidas in-vitro. El protocolo de transformación de estos explantes fue descrito previamente (Sección 5.6.16). Luego de 2 días de co-cultivo con *A. tumefaciens* en oscuridad a 22 ° C los explantes fueron traspasados a Medio I (MSI, medio de inducción, Sección 5.4.2.b.1)

5. RESULTADOS

5.1. Análisis de la transgénesis de las líneas de *N. tabacum* transformadas con la construcción *pGWB2/psy1* mediante PCR y RT-PCR.

Para analizar las líneas de *N. tabacum* transformadas con el vector *pGWB2/psy1*, previamente seleccionadas en medio MS con kanamicina 100 mg/L, se extrajo ADNg de 8 de las 12 líneas T₀ transformadas con la construcción *pGWB2/psy1* mantenidas en invernadero por 13 semanas. Estas líneas se denominaron L1A, L2A, L4A, L6A, L1B, L4B, L5B, L6B y fueron elegidas ya que contaban con al menos 2 hojas de un tamaño aproximado de 2 cm² cantidad de tejido suficiente para realizar las extracciones de ADN. Adicionalmente se extrajo ADNg de una planta silvestre mantenida en invernadero denominada WT. Utilizando el ADNg extraído y partidores específicos, se amplificó un fragmento del gen ribosómico 18S de 180 pb . La amplificación del fragmento del gen 18S fue realizada para determinar la calidad del ADNg extraído de cada una de las líneas analizadas. En todas las líneas estudiadas el fragmento del gen 18S de 180 pb fue amplificado con éxito (Figura 2, carriles L1A, L2A, L4A, L6A, L1B, L4B, L5B, L6B y WT) , lo cual indica que el ADNg extraído estaba en óptimas condiciones para los siguientes análisis. En la reacción de PCR se incluyó un control negativo sin agregar ADNg.

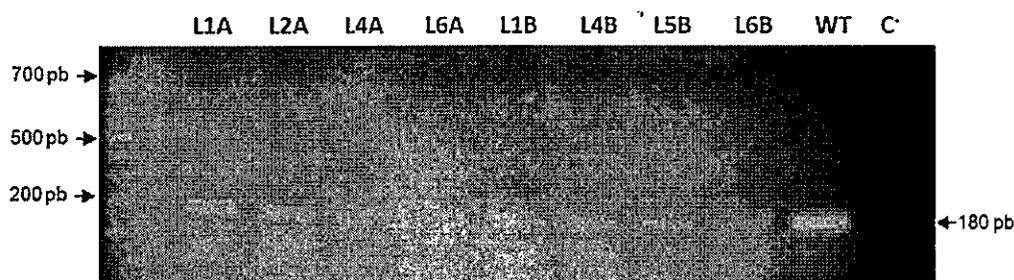


Figura 2. Amplificación del gen 18S a partir del ADNg de las líneas L1A, L2A, L4A, L6A, L1B, L4B, L5B Y L6B. PM: Estándar de peso molecular de 1Kb. C+: control positivo utilizando ADNg de una planta de silvestre. C⁻: control negativo, sin agregar ADN. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt.

Posteriormente, con el fin de evaluar la transgénesis de las líneas estudiadas, se realizó una reacción de PCR (a partir de los ADNg previamente extraídos) para amplificar un fragmento del gen *hpt* que se encuentra en la región de ADN transferida a la planta. La amplificación de este fragmento fue también positiva para todas las líneas transformadas con la construcción *pGWB2/psy1* seleccionadas, obteniéndose para cada una la banda esperada de 624 pb (Figura 3, carriles L1A, L2A, L4A, L6A, L1B, L4B, L5B y L6B). Además, cuando se utilizó ADNg de una planta silvestre no se obtuvo amplificación (carril WT) Este resultado muestra que estas 8 líneas, son efectivamente transgénicas, lo cual sugiere que éstas también poseen el gen *psy1* de *D. carota* integrado en el genoma bajo el promotor 35S. En esta reacción se incluyó un control positivo en cual se utilizó ADNp correspondiente a la construcción *pGWB2/psy1* (carril C⁺) y un control negativo (carril C⁻ en el cual no se agregó ADN).

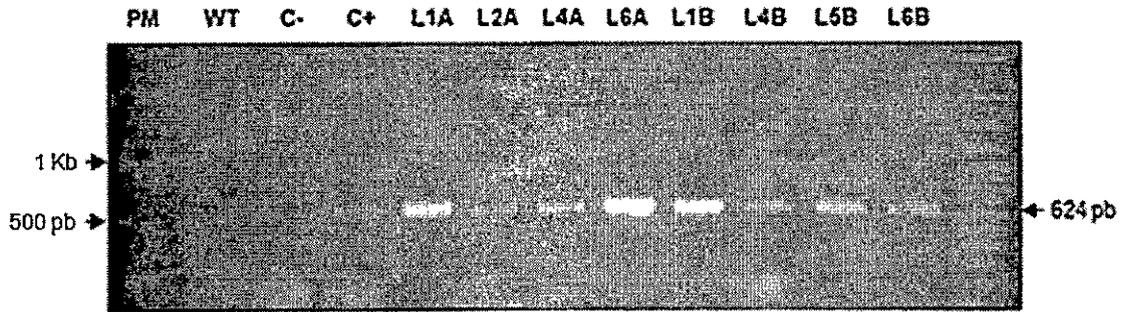


Figura 3. Amplificación mediante PCR del gen *hpt* en 8 líneas de *N. tabacum* transformadas con el gen *psy1* de *D. carota*. PM: Estándar de peso molecular de 100 pb plus. C+: control positivo, se utilizó ADNp correspondiente al vector pGWB2. C-: control negativo, sin agregar ADN. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con BrEt.

A continuación, con el fin de verificar la expresión del gen *psy1* de *D. carota* en las plantas de *N. tabacum* transgénicas y la funcionalidad de la construcción *pGWB2/psy1* se realizó RT-PCR del gen *psy1* de *D. carota*. Para este análisis se realizó una extracción de ARN de las 8 líneas transformadas con la construcción *pGWB2/psy1* (Sección 5.6.4) y a continuación se realizó transcripción reversa del ARNm extraído para sintetizar ADNc (Sección 5.6.5.2). Para verificar la calidad del ADNc sintetizado, se realizó un PCR del gen 18S para cada una de las líneas analizadas (Sección 5.6.3.1, Tabla 2A) y como control se realizó un PCR utilizando ARNm (denominado control sin RT) para establecer si había presencia de ADNg en conjunto con ADNc. Además se incluyó un control positivo utilizando ADNg de *N. tabacum* silvestre y un control negativo en el cual no se agregó ADN. El resultado del RT-PCR indica que la síntesis de ADNc fue exitosa pues para cada una de las líneas analizadas se obtuvo la banda esperada de 180 pb correspondiente al fragmento del gen 18S (Figura 4, carriles L1A, L2A, L4A, L6A, L1B, L4B, L5B y L6B) y además no

había presencia de ADNg en las muestras dado que no se obtuvo amplificación en los respectivos controles sin RT (carriles s/RT).

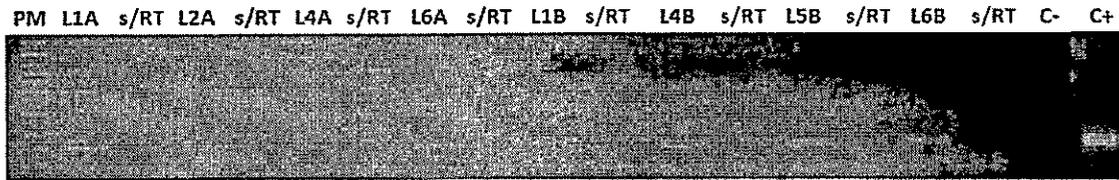


Figura 4. PCR para amplificar el gen 18S a partir del ADNc sintetizado obtenido de las líneas transgénicas L1A, L2A, L4A, L6A, L1B, L4B, L5B, y L6B. En los carriles s/RT se cargaron los respectivos controles sin RT en los cuales se utilizó ARNm de las líneas analizadas como molde en la reacción de PCR para determinar la presencia de ADNg en las muestras. C⁻: Control negativo, sin agregar ADN. C⁺: Control positivo utilizando ADNg de silvestre. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt.

Posteriormente, se llevo a cabo la amplificación mediante PCR del gen *psy1* a partir del ADNc sintetizado (Sección 5.6.3.1, Tabla 2B). Como control negativo de la reacción de PCR se utilizó ADNg extraído de una planta silvestre y como control positivo, se incluyó la amplificación de *psy1* de *D. carota* utilizando como molde ADNg de zanahoria. Los resultados del RT-PCR indican que el gen *psy1* de *D. carota* se expresa en todas las líneas transgénicas analizadas al obtenerse para cada una de éstas una banda de 1,2 kb que corresponde al tamaño esperado para la secuencia codificante del gen *psy1* y demuestran que la construcción *pGWB2/psy1* es funcional en el modelo *N. tabacum* (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.5, arriles L1A, L2A, L4A, L6A, L1B, L4B, L5B y L6B). Adicionalmente, es importante destacar que los partidores empleados para amplificar el gen *psy1* de *D. carota* no hibridaron en ninguno de los genes de *N. tabacum* , pues al utilizar ADN genómico proveniente de una planta silvestre como molde para el PCR no se obtuvo amplificación (carril WT). Por último la banda obtenida al utilizar ADNg de zanahoria

fue de 1,5 Kb, que corresponde al tamaño esperado para el marco abierto de lectura del *psy1* de *D. carota* reportado en la base de datos de NCBI.

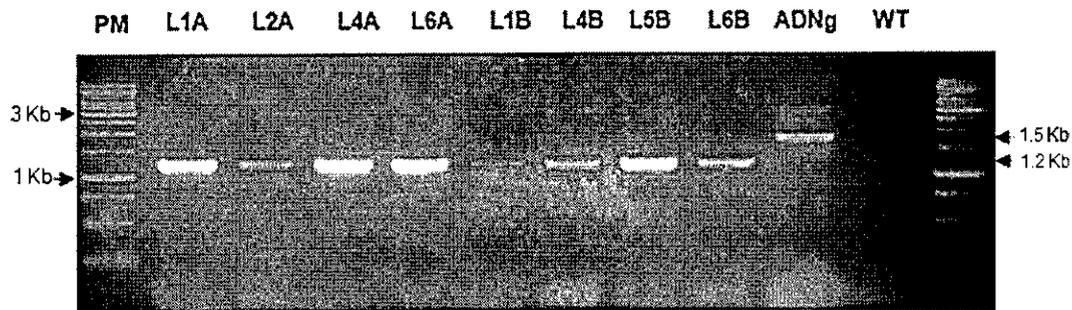


Figura 5. Amplificación mediante RT-PCR del gen *psy1* de *D. carota* en las líneas transgénicas L1A, L2A, L4A, L6A, L1B, L4B, L5B y L6B. ADNg: control positivo, se utilizó ADN genómico de *D. carota*. WT: amplificación utilizando ADNg proveniente de *N. tabacum* silvestre (control negativo). PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt.

5.2. Evaluación de la función del gen *psy1* de *D. carota* mediante análisis bioquímico de las líneas transformadas.

Para evaluar a nivel bioquímico el efecto producido al introducir el gen *psy1* de *D. carota* en *N. tabacum*, se determinó la composición de carotenoides en 3 líneas de *N. tabacum* silvestres y 8 líneas transformadas con la construcción *pGWB2/psy1* mediante espectrofotometría y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa. Para ello, se extrajo carotenoides de cada una de las líneas analizadas (Sección 5.6.6.1) y los carotenoides totales fueron cuantificados mediante

espectrofotometría a 474 nm, longitud de onda a la cual absorben los carotenoides (Sección 5.6.6.2).

Posteriormente, mediante HPLC se determinó la composición de carotenoides de cada una de las muestras (Sección 4.6.66.3). Para cada una de las extracciones se realizaron 3 réplicas técnicas.

En plantas silvestres los pigmentos detectados en tejido fotosintético fueron β -caroteno, luteína y clorofila. Esta composición fue observada también en las plantas transgénicas (Figura 6).

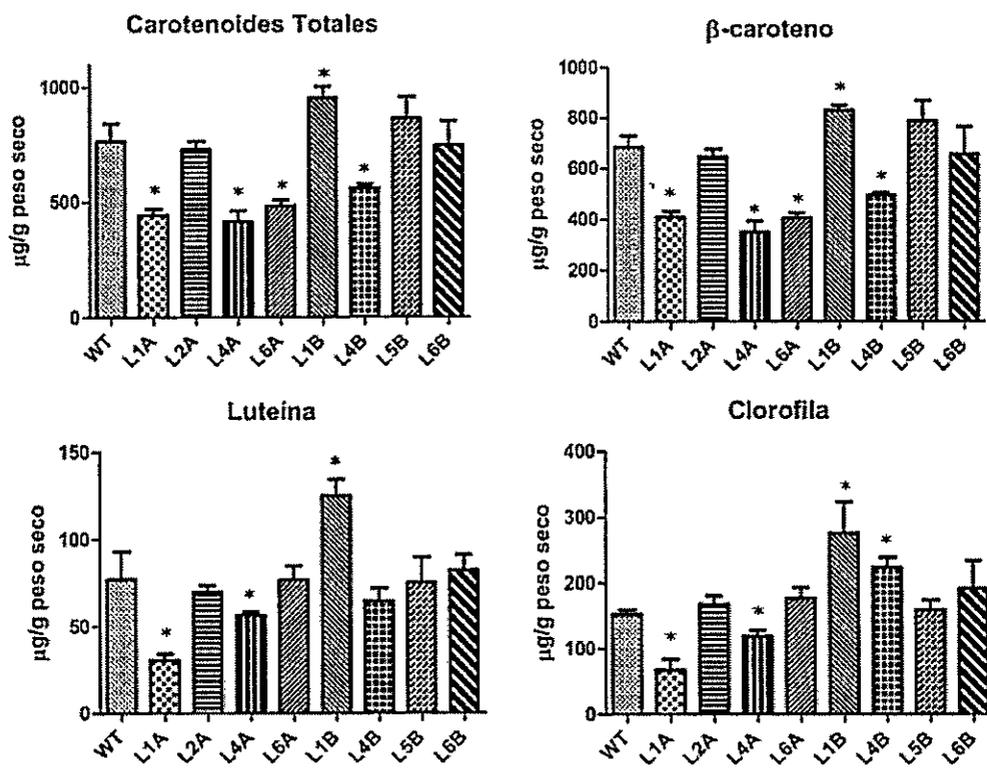


Figura 6. Niveles de pigmentos en las plantas examinadas en este seminario de título. A) Niveles de Carotenoides totales B) Niveles de β -caroteno . C). Niveles de luteína D) Niveles de clorofila. WT: Nivel de pigmentos en las plantas de silvestre. Las líneas transgénicas que se analizaron fueron: L1A, L2A, L4A, L6A, L1B, L4B, L5B Y L6B. Las barras representan el error estándar para cada una de las muestras, realizadas en triplicado. Con asteriscos (*) se destacan las diferencias significativas. * indica $P < 0.05$, respecto a las plantas silvestres (prueba de t de Mann-Whitney).

En base a los niveles de carotenoides totales detectados se identificaron 3 grupos de plantas transgénicas : Plantas transgénicas con niveles de carotenoides totales menores (grupo 1), similares (grupo 2) y superiores (grupo 3) a las plantas silvestres que serán descritos a continuación (el porcentaje, en promedio, de aumento y/o disminución de cada línea respecto a plantas silvestres se detalla en la tabla 3):

a) Los niveles de carotenoides totales están disminuidos de manera significativa en las líneas L1A, L4A, L6A y L4B (grupo 1), presentando además diferencias estadísticamente significativas respecto a las plantas silvestres en los niveles de β -caroteno (Figura 6A y 6B). Este resultado indica que la expresión de *psy1* de *D. carota* en plantas de *N. tabacum* es capaz de reducir de manera global los niveles de carotenoides así como los niveles de β -caroteno que es producido a través de una de las posibles ramificaciones de la ruta. Por otra parte, las líneas L1A y L4A presentan también una reducción significativa en los niveles de luteína y clorofila respecto a plantas silvestres (figura 6C). Este resultado indica que la expresión de *psy1* de *D. carota* en *N. tabacum* puede de afectar la carotenogénesis en el otro punto de ramificación de la ruta además de la producción de clorofila de manera negativa. Por último la línea 4B presenta niveles de luteína similares a plantas silvestres y un aumento en los niveles de clorofila respecto a éstas (figura 6C y 6D). Este resultado indica que el la expresión de *psy1* de *D. carota* puede, en contraposición al resultado anterior, afectar de manera positiva la acumulación de clorofila.

b) En segundo lugar las líneas L2A, L5B y L6B no presentan cambios significativos en ninguno de los pigmentos detectados (grupo 2, figura 6A,6B, 6C y 6D). Este resultado indica que la expresión de *psy1* de *D. carota* no necesariamente

conduce a una modificación en el contenido de pigmentos de *N. tabacum*, hecho que podría ser explicado por la regulación a la que está sujeta esta ruta metabólica.

c) En tercer lugar, en la línea 1B (grupo 3) se observó un incremento significativo en los niveles de carotenoides totales β -caroteno, luteína y clorofila respecto a plantas silvestres (figura 6A y 6B). Este resultado indica que la expresión de *psy1* de *D. carota* en *N. tabacum* puede incrementar de manera global la acumulación de carotenoides.

Tabla 3. Porcentajes, en promedio, de aumento y/o disminución de los pigmentos detectados en plantas de *N. tabacum* transformadas con la construcción *pGWB2/psy1* respecto a plantas silvestres. Los cambios estadísticamente significativos se destacan con un asterisco (*). * $p < 0,05$ (prueba de t de Mann-Whitney).

Línea	C. totales %	β -caroteno %	Luteína %	Clorofila %
L1A	-42*	-40*	-60*	-56*
L2A	-5	-6	-9	10
L4A	-46*	-49*	-27*	-22*
L6A	-37*	-41*	-1	16
L1B	24*	21*	62*	81*
L4B	-27*	-28*	-16	47*
L5B	13	15	-3	4
L6B	-3	-4	6	26

De los resultados anteriormente mencionados se desprende que la expresión de *psy1* de *D. carota* en líneas independientes de *N. tabacum* puede modificar significativamente la acumulación de carotenoides y por lo tanto es funcional en este modelo.

En las siguientes secciones se detallarán los procedimientos realizados para el desarrollo de las herramientas moleculares que permitirán a futuro la expresión del gen *psy2* de *D. carota* en plantas de *N. tabacum* y la sobre-expresión de ambos genes *psy* en plantas de *D. carota*.

5.3. Generación de la construcción pCR8/psy2

Para generar la construcción *pCR8/psy2* que fue recombinada con el vector de destinación pGWB2, se aisló ADN plasmidial de células DH5 α transformadas con la construcción *pCR8/psy2* disponible en el laboratorio (Carvajal, 2010) que poseía el ADNc de *psy2* en orientación antisentido. Posteriormente, este ADNp fue cuantificado y utilizado para amplificar mediante PCR el ADNc de *psy2*. El producto de PCR fue separado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Sección 5.6.2). A continuación, el producto de PCR fue purificado desde el gel de agarosa (sección 06.7). A continuación, se realizó una reacción de ligación entre el ADNc de *psy2* purificado y el vector de entrada pCR8 (Sección 5.6.8). En la reacción de ligación se utilizó 50 ng del vector de entrada y 150 ng del ADNc de *psy2* purificado. Posteriormente, se utilizó 50 ng del producto de la ligación realizada para transformar células de *E. coli* quimiocompetentes (Sección 5.6.11). Producto de la transformación se obtuvieron 3 colonias las cuales fueron analizadas mediante PCR de colonia para el gen *psy2*. El PCR resultó ser positivo para este gen, obteniéndose para cada uno de los clones analizados la banda esperada de 1,3 Kb (Figura 7, carriles C1, C2 y C3) por lo cual las tres colonias fueron crecidas en medio LB líquido con espectinomicina 100 mg/L para las siguientes evaluaciones moleculares. Para realizar el control positivo de

la reacción de PCR (Carril C⁺) se utilizó ADNp de la construcción *pCR8/psy2* en antisentido y se incluyó un control negativo en el cual no se agregó ADN (carril C⁻).

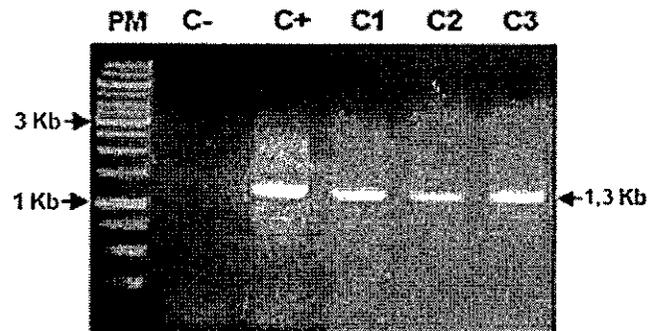


Figura 7. Amplificación del ADNc de *psy2* mediante PCR de colonia de las células de *E. coli* transformadas con la construcción *pCR8/psy2*. PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb. C⁻ : Control negativo, sin agregar ADN. C⁺: control positivo, se utilizó ADNp de la construcción *pCR8/psy2* en antisentido. Se observa en los carriles C1, C2 y C3, el PCR de colonia correspondiente. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt.

De cada una de las colonias obtenidas se guardó un stock en glicerol y se extrajo ADN plasmidial. Se utilizó 200 ng de ADN plasmidial para ser digeridos con la enzima BstEII con el objetivo de encontrar clones portadores de la construcción *pCR8/psy2* en sentido, necesaria para obtener posteriormente la construcción *pGWB2/psy2* en sentido mediante la tecnología Gateway[®]. En un gel de agarosa se visualizó el producto de la digestión con BstEII de cada uno de los ADN plasmidial extraídos (Figura 8A). Los sitios de restricción de esta enzima están presentes en el inserto (en la posición 1026) y en el vector pGWB2 (en la posición 1441) (Figura 8B). En 2 de las 3 colonias analizadas el ADNc de *psy2* resultó estar en orientación sentido respecto al sitio de recombinación attL1 del vector pCR8, ya que se obtuvieron las bandas de 3,0 Kb y 1,1 Kb esperadas para una orientación sentido (Figura 8A, carriles

C2 y C3, ver esquema en 8C), mientras que la colonia 1 liberó los fragmentos de 2,5 Kb y 1,6 Kb correspondientes a la clonación de *psy2* en antisentido respecto a *attL1* (Figura 8A, carril C1, ver esquema en D). Se utilizó el ADN plasmidial del clon 2 para realizar la reacción de recombinación entre los vectores *pCR8/psy2* y *pGWB2* y obtener así el vector de destinación *PGWB2/psy2*.

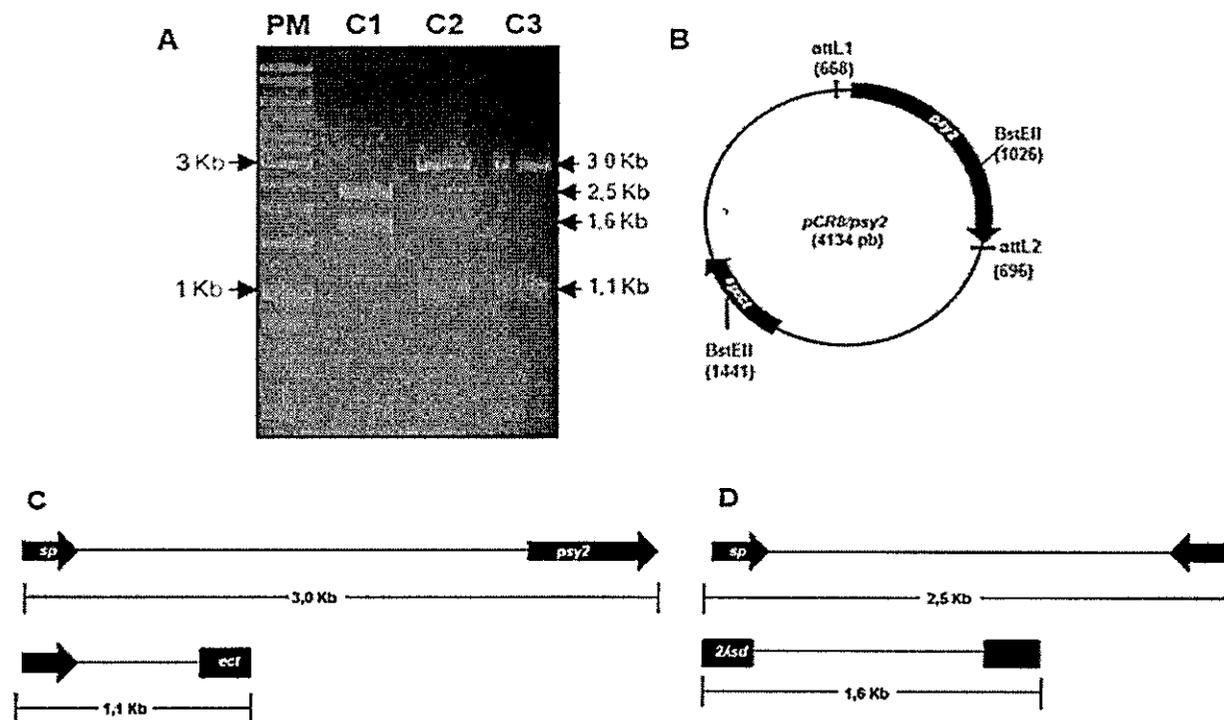


Figura 8. Digestión con la enzima BstEII de los clones para la construcción *pCR8/psy2*. A) Producto de la digestión del ADNp. PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb. En los carriles C1, C2 y C3 (que corresponden a los clones 1 al 3) se observan las bandas obtenidas luego de la digestión. B) Esquema de los sitios de restricción de la enzima BstEII presentes en la construcción *pCR8/psy1*. En paréntesis se indica la posición en que está ubicado el sitio de restricción en el vector *pCR8* y el ADNc de *psy2*. C) Fragmentos esperados de la digestión con BstEII para una clonación en sentido. D) Fragmentos esperados de la digestión con BstEII para una clonación en antisentido. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt.

5.4. Generación de la construcción pGWB2/psy2

Para la generación de plantas transgénicas de *N. tabacum* con el gen *psy2* de *D. carota*, se generó la construcción *pGWB2/psy2*. Para lograr este objetivo se realizó la clonación de *psy2* en el vector de destinación *pGWB2* mediante una reacción de recombinación (Sección 4.6.9) entre *pGWB2* y *pCR8/psy2* obtenido previamente. *pGWB2* es un vector de la línea Gateway® que posee el promotor constitutivo y fuerte 35S. Posteriormente, se utilizó el producto de la recombinación para transformar células de *E. coli* DH5α competentes. Los clones obtenidos fueron analizados mediante PCR de colonia y digestión enzimática (Sección 4.6.13), como se describe a continuación.

5.4.1. Análisis de la construcción pGWB2/psy

Luego de la transformación de *E. coli* DH5α con la construcción *pGWB2/psy2* se obtuvo ADNp. Para determinar la orientación del ADNc de *psy2* en el vector *pGWB2* se realizó un PCR direccional utilizando como molde el ADNp extraído. Los partidores que se utilizaron para realizar este PCR fueron 35S sentido (hibrida en el promotor 35S) y *psy2* antisentido (hibrida en el extremo 3' del gen). Se incluyó en esta reacción un control negativo al cual no se agregó ADN. En esta reacción de PCR se esperaba obtener una única banda de 1,9 Kb solo en los clones que poseían el ADNc de *psy2* clonado en orientación sentido. En los 3 clones analizados se obtuvo la banda esperada de 1,9 Kb además una serie de bandas inespecíficas de menor peso molecular (figura 9A, carriles C1, C2 y C3). Para descartar que las bandas obtenidas de 1,9 Kb fueran producto de una amplificación inespecífica, se realizó una reacción de PCR usando el mismo ADN plasmidial como molde pero utilizando los partidores

35S sentido y *psy2* sentido. Los clones 1 y 2 fueron positivos para esta segunda reacción de PCR obteniéndose los fragmentos esperados de 1,9 Kb (Figura 9A y 9B, carriles C1 y C2) y afortunadamente con el clon 3 solo se obtuvo la banda esperada de 1,9 Kb cuando se utilizaron los partidores 35S-sentido y *psy2*-antisentido (Figura 9B, carril C3). El resultado de estos experimentos sugirió que el clon 3 está transformado con la construcción *pGWB2/psy2* en orientación sentido.

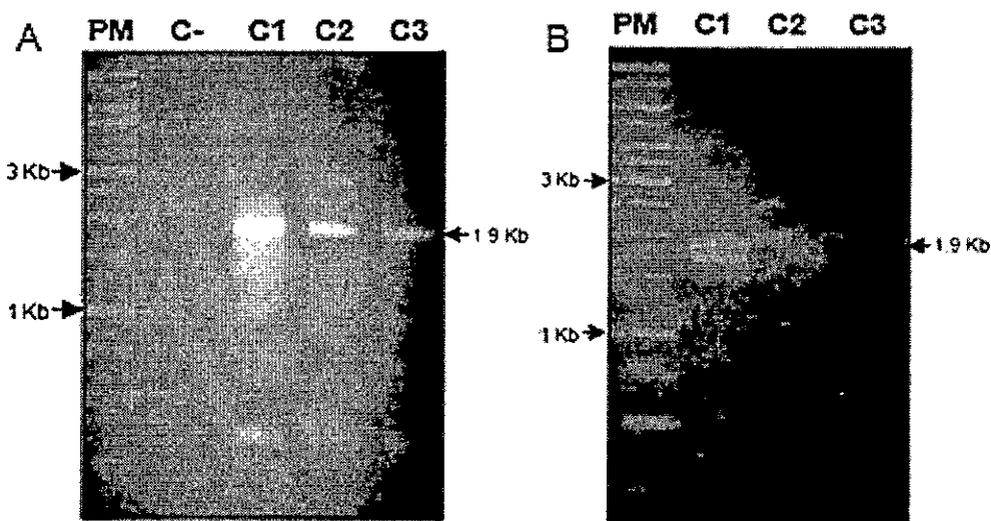


Figura 9. PCR direccional para determinar la orientación del ADNc de *psy2* en el vector *pGWB2*. A) PCR utilizando los partidores 35S(P) sentido y *psy2* antisentido. B) PCR utilizando los partidores 35S(P) sentido y *psy2* sentido. PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt.

Para confirmar la orientación de la clonación de *psy2* en el vector de destino, el ADNp del clon 3 fue digerido con la enzima *NdeI*. El producto de la digestión fue visualizado en un gel de agarosa 1 % y las bandas obtenidas de 11,5 kB, 3,4 kB y 2,1 kB esperadas para una clonación en orientación en sentido del cDNA de *psy2* de *D. carota* en el vector de destino *pGWB2* (Figura 10A, carril C3 ver esquema en 10C) indicaron el éxito de la clonación. No se analizó el resto de los clones por digestión

enzimática debido a que luego de la secuenciación se verificó que el ADNc de *psy2* fue correctamente clonado en el vector pGWB2 en el clon 3.

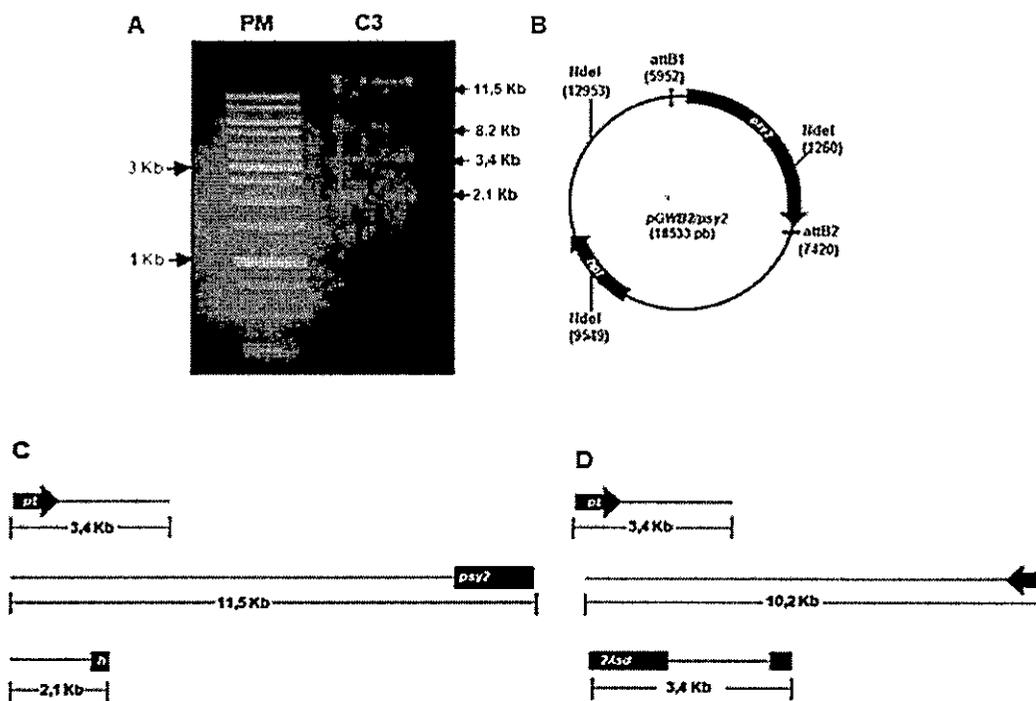


Figura 10. Digestión enzimática con la enzima *NdeI* de *pGWB2/psy2* para determinar la orientación del ADNc de *psy2*. A) Producto de la digestión del ADNp. PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb. C3: Producto de la digestión con la enzima *NdeI* del ADN plasmidial del clon 3 de *E. coli*. Las bandas obtenidas de 11,5 Kb, 3,4 Kb y 2,1 Kb indican que el ADNc de *psy2* fue clonado en orientación sentido en el vector pGWB2. B) Esquema de los sitios de restricción para la enzima *NdeI* presentes en la construcción *pGWB2/psy2*. C) Representación de los fragmentos de ADN obtenidos luego de la digestión si la clonación del ADNc de *psy2* ocurre en sentido. B) Resultados para la digestión con el ADNc de *psy2* clonado en antisentido. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt.

5.5. Obtención de clones transformantes de *A. tumefaciens* con la construcción *pGWB2/psy2*

El ADNp del clon 3 portando el vector *pGWB2/psy2* se usó para transformar *A. tumefaciens* (sección 4.6.15). Se analizaron 8 colonias de *Agrobacterium tumefaciens*

mediante PCR de colonia para el gen *psy2*, obteniéndose uno positivo para el cual se observa una única banda, de aproximadamente 1,3 Kb tamaño esperado para la secuencia codificante de *psy2* de *D. carota* (Figura 11). Para la reacción de PCR se utilizó un control positivo empleando ADN plasmidial correspondiente a la construcción *pCR8/psy2* y un control negativo sin agregar ADN.

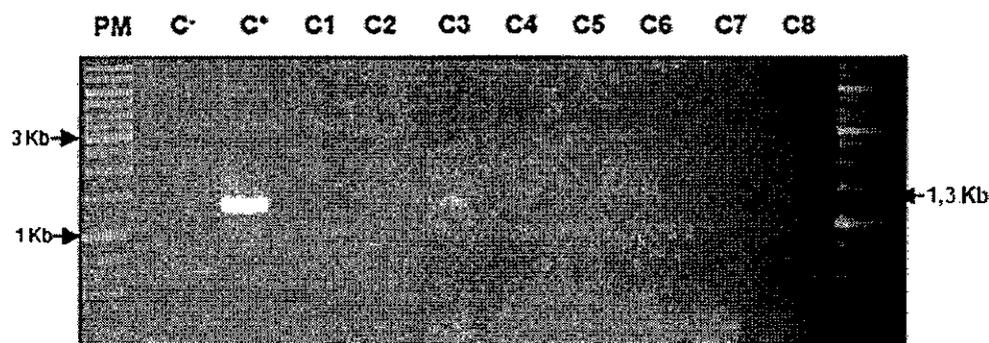


Figura 11. PCR de colonia para determinar los clones de *A. tumefaciens* que fueron exitosamente transformados con la construcción *pGWB2/psy2*. PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb. C-: control negativo, se utilizó agua nanopura. C+: Control positivo se utilizó ADNp de la construcción *pCR8/psy2*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt.

5.6. Transformación estable de explantes de *N. tabacum* con la construcción *pGWB2/psy2*

El clon 3 de *A. tumefaciens*, positivo para el PCR de colonia, se usó para la transformación estable de explantes de *N. tabacum*. Una vez realizado el procedimiento (Sección 5.6.16), los explantes se trasladaron a placas con medio MS sólido y se incubaron durante 2 días en oscuridad. Una vez transcurrido este período, los explantes se trasladaron al medio de inducción en el cual permanecieron 4 semanas (MSI, sección 5.4.2.a.2, Figura 12A). Posteriormente, los explantes se

trasladaron al Medio II (MSII, sección 5.4.2.a.3, Figura 12B). Transcurridas 2 a 4 semanas en el Medio II, los explantes se traspasaron al Medio III (MSIII, sección 5.4.2.a.4, Figura 12C).



Figura 12. Organogénesis somática de *N. tabacum*. A) Explantes de *N. tabacum* transformados con la construcción *pGWB2/psy2* en el medio de inducción durante 1 semana. B) Explantes de *N. tabacum* transformados con la construcción *pGWB2/psy2* mantenidos en medio II durante 3 semanas. C) Plántulas de *N. tabacum* mantenidas en medio III durante 1 semana.

Luego de 4 semanas en medio III las plántulas desarrollaron raíces y fueron transferidas a maceteros en tierra (Figura 13). Actualmente, en condiciones de invernadero, se tienen: a) 6 líneas de *N. tabacum* transformadas con la construcción *pGWB2/psy2* que serán analizadas molecular y bioquímicamente para verificar la trasngénesis, expresión del transgen y contenido y composición de carotenoides (Figura 13C y 13D, denominadas L1, L2, L3, L4, L5 y L6); b) 3 líneas de *N. tabacum* transformadas con el vector *pGWB2* sin inserto que servirán como control de la transformación con *A. tumefaciens* (Figura 13A, línea S.I.1 y 13B, líneas S.I.2 y S.I.3) y por último: 2 líneas de *N. tabacum* silvestre no transformado (figura 13A, líneas WT1 y WT2) que serán comparadas con las plantas transformadas con el vector sin inserto respecto al contenido y composición de carotenoides para establecer si el proceso de

transformación y organogénesis somática afecta de manera significativa estos parámetros. Las líneas silvestres han permanecido en condiciones de invernadero durante 12 semanas al igual que la línea S.I.1. Las líneas S.I.2 y S.I.3 fueron traspadas al invernadero hace 2 semanas al igual que las líneas L4, L5 y L6. En contraste las líneas L1, L2 y L3 fueron traspadas al invernadero hace 4 semanas a pesar de que se transformaron de manera conjunta con las líneas L4, L5, L6, S.I.1 y S.I.2. Esta diferencia se debe a que el proceso de organogénesis de estas líneas (L1, L2 y L3) fue más rápido que el resto; en particular, las líneas L1, L2 y L3 estaban aptas para ser traspadas a MSIII luego de 2 semanas en medio MSII a diferencia de las otras líneas que debieron permanecer en medio MSII por 4 semanas antes de ser traspadas al medio MSIII.

Por último, es importante destacar que el proceso de organogénesis fue capaz de originar plantas capaces de aclimatarse a las condiciones de invernadero y a través de su análisis será posible determinar si el gen *psy2* de *D. carota* es funcional en el modelo vegetal *N. tabacum*.

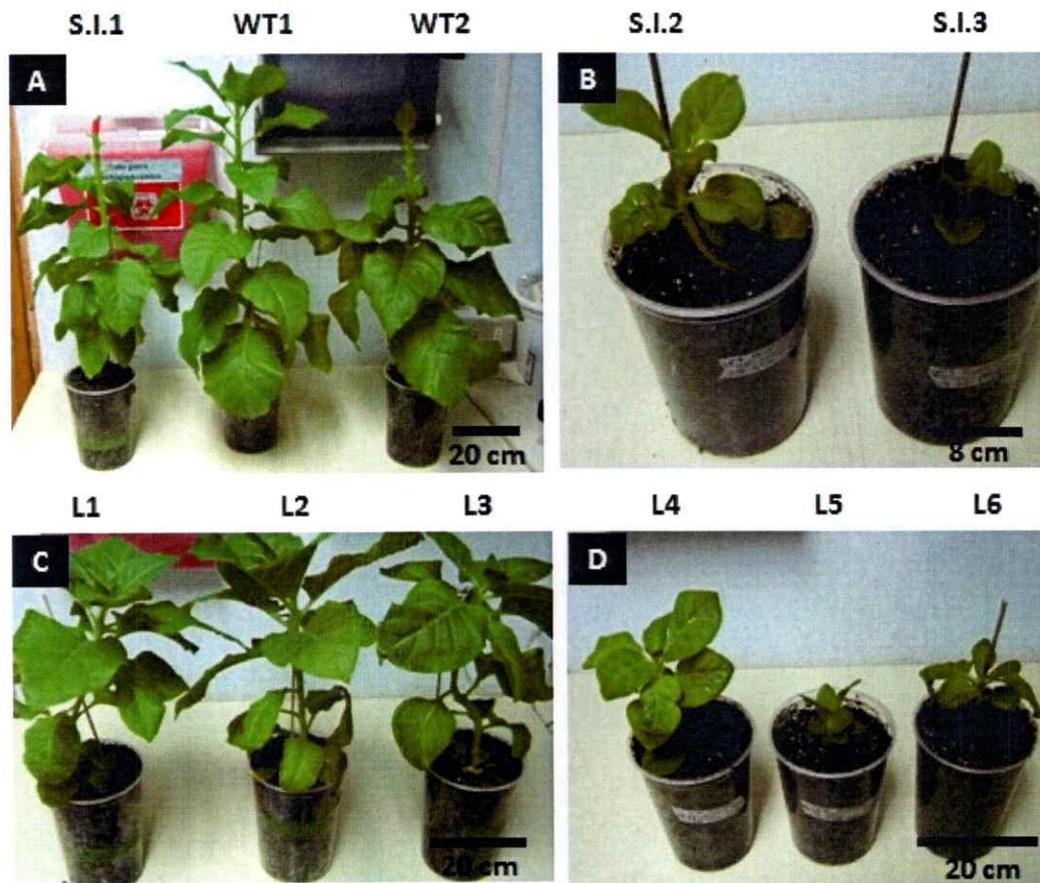


Figura 13. Plantas de *N. tabacum* silvestres y transformadas con la construcción *pGWB2/psy2*. A) Plantas de *N. tabacum* control: La línea S.I.1 fue transformada con el vector *pGWB2* sin inserto y fue sometida al proceso de organogénesis. Las líneas WT1 y WT2 fueron obtenidas a partir de plántulas de *N. tabacum* silvestre cultivadas en medio MS sin antibiótico durante 4 semanas. Todas las líneas de la figura fueron trasplantadas hace 4 semanas al invernadero B) Plantas de *N. tabacum* control transformadas con el vector *pGWB2* sin inserto de mantenidas en invernadero durante 2 semanas. C) Plantas de *N. tabacum* transformadas con la construcción *pGWB2/psy2* mantenidas en invernadero durante 4 semanas D) Plantas de *N. tabacum* transformadas con la construcción *pGWB2/psy2* mantenidas en invernadero durante 2 semanas. El nombre de las líneas se indica en la parte superior de la figura.

1.1. Transformación estable de explantes de *D. carota* con la construcción *pGWB2/psy2*

Respecto a la transformación de explantes de *D. carota*; en la actualidad se tienen: a) 14 explantes transformados con la construcción *pGWB2/psy1* (Figura 14A) b) 20 explantes transformados con la construcción *pGWB2/psy2* (Figura 14B). Como control de la transformación con *A. tumefaciens* también se cuenta con un set de 11 explantes transformados con el vector *pGWB2* sin inserto mantenidos en MSI desde hace 4 semanas. Se espera que la embriogénesis somática de estos explantes permita obtener plantas de *D. carota* transgénicas que sobre-expresan de manera independiente los genes *psy1* y *psy2* en nuestro modelo de estudio *D. carota*.

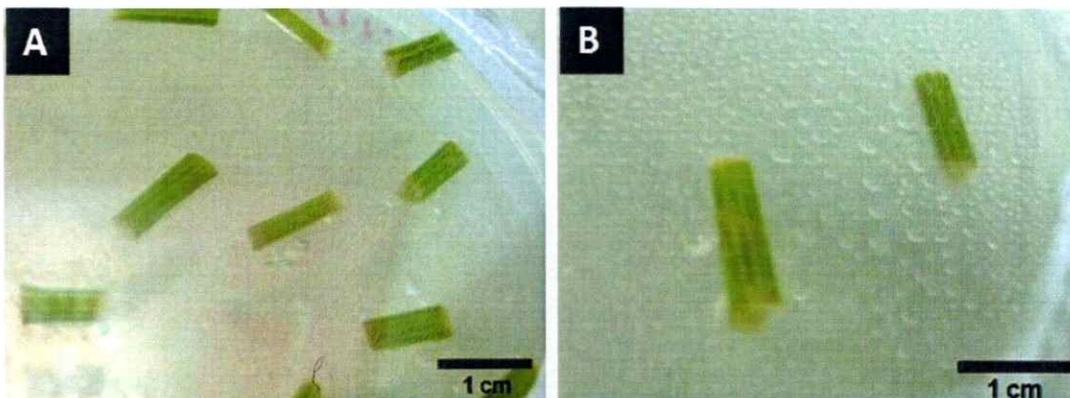


Figura 14. Embriogénesis somática de *D. carota*. A) Explantes de *D. carota* transformados con la construcción *pGWB2/psy1* mantenidos en MSI durante 4 semanas. B) Explantes de *D. carota* transformados con la construcción *pGWB2/psy2* mantenidos en medio I durante 4 semanas. La barra de tamaño representa 1 cm.

6. DISCUSIÓN

6.1. Construcciones genéticas

La construcción *pGWB2/psy1* generada en el seminario de título previo a esta tesis resultó ser transcripcionalmente activa, hecho que reafirma la eficiencia de la tecnología Gateway para generar construcciones genéticas. Una de las ventajas de utilizar la tecnología Gateway® es que los vectores de entrada que se generaron estarán disponibles para ser destinados en una amplia gama de vectores de expresión para cumplir diversos objetivos.

6.2. Transformación estable de *N. tabacum* con la construcción *pGWB2/psy2*.

Se utilizaron plantas de *N. tabacum* como organismo modelo para la sobre-expresión de *psy1* y *psy2* de *D. carota* pues este organismo ha sido ampliamente utilizado para la evaluación funcional de diversos genes carotenogénicos de eucariontes y procariontes (Mann y cols., 2000; Busch y cols., 2002; Gerjets y cols., 2007; Hasunuma y cols., 2008). Además, la transformación de *N. tabacum* es un proceso convencional y estandarizado en el laboratorio, en el cual a partir de los 3 meses de post-transformación se obtienen plantas T₀ maduras aptas para ser evaluadas. Las plantas de zanahorias transgénicas recién pueden ser transferidas a invernadero a los 6 meses de post-transformación, lo que hace del *N. tabacum* una planta modelo adecuada para evaluar en corto tiempo la función de nuestros genes de interés.

Respecto a la organogénesis de *N. tabacum*, este fue un proceso eficiente en cuanto a la obtención de líneas transformantes. A partir de 2 transformaciones cada una con 8 explantes transformados con el vector sin inserto y 24 explantes transformados con el vector *pGWB2/psy2* se obtuvo el doble de explantes iniciales,

cada uno con 2 plántulas en promedio. De estas plántulas, 9 se han crecido hasta la fecha y han sido trasplantadas a tierra; 6 de ellas provienen del vector *pGWB2/psy2* y 3 de la transformación con el vector *pGWB2* sin inserto. El análisis de estas plantas será clave para evaluar la funcionalidad del gen *psy2* de *D. carota* en *N. tabacum*.

6.3. Transformación estable de explantes de *D. carota* con las construcciones *pGWB2/psy1* y *pGWB2/psy2*.

La transformación de explantes de *D. carota* con las construcciones para sobre-expresar los genes *psy1* y *psy2* fue realizada con éxito en este seminario de título. A partir de los explantes transformados se espera obtener plantas de zanahoria que sobre-expresen ambos genes *psy* de manera independiente, lo cual será importante para caracterizar la función de estos genes en nuestro modelo de estudio.

6.4. Análisis de secuencia de la construcción *pCR8/psy2*.

El análisis de la secuencia de la construcción *pCR8/psy2* generada en este seminario de título, indicó que el gen *psy2* de *D. carota* fue clonado en orientación sentido respecto al sitio de recombinación attL1 del vector *pCR8* de manera que podrá ser clonado en orientación sentido en otros vectores de destinación que cuentan con la tecnología Gateway® tales como *pGWB5* o *pGWB8* con el fin de determinar la localización subcelular de la proteína de interés o, bien, determinar su traducción mediante Western Blot respectivamente. Además la secuencia clonada de *psy2* posee un 99% de identidad nucleotídica (y 100% aminoacídica) con la anotada en la base de datos de NCBI (DQ192187). Estos resultados son fundamentales para establecer si

las diferencias observadas en los niveles de carotenoides en las plantas transformadas respecto a las plantas silvestres, que serán analizadas a futuro, son debidas a la expresión del gen *psy2* de *D. carota*.

Previamente se intentó determinar la funcionalidad de *psy2* en un modelo heterólogo bacteriano, la cepa de *E. coli* pDS1B Δ CrtB, a través de un ensayo de complementación el cual no pudo ser realizado con éxito (Carvajal, 2010). La hipótesis que se postula al respecto, es que la proteína traducida sería tóxica para la bacteria empleada, pues solo se obtuvieron clones en antisentido. Un modelo vegetal como *N. tabacum*, es una alternativa apropiada para resolver esta interrogante y obtener información sobre la función del gen *psy2* de *D. carota*. Además, se estudiará en un futuro el efecto de la sobre-expresión de *psy2* de *D. carota* en nuestro modelo de estudio, zanahoria, con lo cual se espera aumentar los niveles de carotenoides en hojas y principalmente en la raíz de reserva, rica en cromoplastos, así como fue descrito previamente en frutos, semillas y tubérculos (Ravanello y cols., 2003; Ducreux y cols., 2005; Diretto y cols., 2007).

6.5. Análisis molecular y bioquímico de las líneas de transformadas con la construcción pGWB2/psy1.

En relación a las plantas que fueron transformadas con la construcción *pGWB2/psy1* se estableció que todas las líneas transformantes elegidas para ser analizadas resultaron ser transgénicas y expresan el gen *psy1* de *D. carota*. La expresión de *psy1* de *D. carota* en estas plantas fue verificada mediante RT-PCR con partidores diseñados para amplificar la secuencia codificante completa del gen *psy1* de

zanahoria. Este resultado es válido pues la amplificación del gen *psy1* a partir del cDNA de las plantas transgénicas no se debe a la presencia de ADNg contaminante pues en los respectivos controles sin RT no se observa amplificación del fragmento del gen 18S (Figura 4, carriles s/RT) y adicionalmente porque quedo demostrado que los partidores empleados en esta reacción no hibridaron en ninguno de los genes de *N. tabacum* dado que no se obtuvo amplificación cuando se utilizó ADNg de *N. tabacum* en la reacción de PCR (Figura 5, carril WT).

Con respecto a los niveles de carotenoides encontrados en las líneas transgénicas es destacable el hecho de que el contenido de carotenoides respecto a plantas silvestres fue variable entre distintos grupos de plantas transgénicas : 2 de las líneas analizadas (L2A y L5B) no registraron cambios significativos en ninguno de los pigmentos detectados por HPLC mientras que 4 líneas (L1A, L4A, L6A y L4B) mostraron una disminución significativa respecto a plantas silvestres en los niveles de carotenoides totales y β -caroteno lo cual da cuenta de la capacidad del gen *psy* de disminuir la acumulación de carotenoides tanto a nivel global como en una de sus ramificaciones. En contraste en una de las líneas analizadas (la línea L1B) los niveles de todos los carotenoides detectados y clorofila fueron estadísticamente mayores que los detectados en plantas silvestres. Estos resultados opuestos podrían estar siendo determinados por una expresión diferencial del gen *psy1* de *D. carota* en las distintas líneas transgénicas; hecho que es probable pues la inserción del transgen ocurre al azar en cada una de las líneas y la expresión de éste queda determinada por el contexto génico en que ocurre. Un fenómeno de este tipo fue reportado por *Busch y cols* en el año 2002 en donde se determinó que plantas transgénicas de *N. tabacum* con elevados niveles de transcrito del gen *psy1* endógeno presentaban, en algunos

casos, una disminución significativa de los niveles de carotenoides respecto a plantas silvestres. Por esta razón es importante determinar a futuro los niveles de expresión del gen *psy1* de *D. carota* en las líneas de *N. tabacum* examinadas en este trabajo y establecer cual es la correlación entre la expresión de este transgen y los niveles de carotenoides detectados.

Además de Busch y cols otros autores han reportado tanto el aumento como la disminución de los niveles de carotenoides en plantas debido a la expresión de parálogos del gen *psy*. En múltiples especies vegetales se ha visto una correlación positiva entre los niveles de transcrito de este gen y la acumulación de carotenoides (Fraser y cols., 1999; Ikoma y cols., 2001; Kato y cols., 2004; Zhu y cols., 2002; Zhu y cols., 2003). Considerando que la actividad de fitoeno sintasa redirige el flujo metabólico hacia la biosíntesis de carotenoides, la actividad de este producto génico resulta clave para que la biosíntesis de carotenoides comience y por lo tanto estos se acumulen. En contraste, existen reportes en los que se ha correlacionado una disminución en los niveles de carotenoides con un aumento en los niveles de transcrito de ciertos parálogos del gen *psy* y un aumento en los niveles de ABA (Li y cols., 2008; Welsch y cols., 2008). En base a este antecedente, una explicación que daría cuenta de la disminución de los niveles de carotenoides en las plantas de *N. tabacum* que expresan *psy1* de *D. carota* sería un incremento en los niveles de ABA. Por esta razón, se propone medir a futuro los niveles de ABA en la progenie de las plantas transgénicas analizadas en este trabajo y determinar si la disminución en los niveles de carotenoides en estas líneas esta correlacionada con un aumento en los niveles de ABA.

Además sería interesante cuantificar los niveles de proteína (*PSY1*) que son reducidos y correlacionarlo con los niveles de carotenoides pues un aumento en los niveles de expresión de un gen determinado no implica necesariamente un aumento en los niveles de proteína traducidos.

Incluso, para un análisis mas fino, se podría determinar la actividad de esta enzima en extractos provenientes de estas plantas. De esta manera también se podría establecer una correlación entre los niveles de actividad enzimática y los niveles de carotenoides.

7. CONCLUSIONES

El gen *psy1* de *D. carota* es funcional en el modelo vegetal *N. tabacum* pues su expresión conduce a una modificación en el contenido de carotenoides estadísticamente significativo respecto a plantas silvestres.

La construcción *pGWB2/psy1* es funcional en el modelo vegetal *N. tabacum* y podrá ser utilizada para expresar el gen *psy1* de *D. carota* en otros organismos.

Se obtuvo la construcción *pCR8/psy2*, la cual sirvió como vector de entrada para el gen *psy2* de *D. carota* haciendo posible su exportación a varios vectores de expresión.

Mediante recombinación se obtuvo la construcción *pGWB2/psy2* con la cual se logró transformar en forma estable *Nicotiana tabacum* y se obtuvieron 6 líneas cuya transgénesis será verificada en el futuro.

Se obtuvo explantes de *D. carota* transformados con las construcciones *pGWB2/psy1* y *pGWB2/psy2*.

Los resultados obtenidos, permiten validar la estrategia de sobre-expresión como herramienta para el estudio de la función de los genes.

Las conclusiones anteriormente mencionadas dejan de manifiesto el cumplimiento los objetivos planteados y confirman la veracidad de la hipótesis de este trabajo. Efectivamente el gen *psy1* de *D. carota* modificó el contenido de carotenoides de las plantas de tabaco transformadas lo cual indica que este gen es funcional en un sistema vegetal.

8. PROYECCIONES

La principal proyección de los resultados de este trabajo, es evaluar la funcionalidad del gen fitoeno sintasa 2 (*psy2*) de *D. carota* en plantas de tabaco y zanahoria. De esta manera se podrá comparar los niveles de carotenoides producidos por la expresión de *psy1* y *psy2* de manera independiente (en tabaco) y conocer con cuál de los dos genes se modifica de manera más significativa el contenido de carotenoides.

Dado los resultados en plantas de tabaco con *psy1* se propone realizar evaluación del contenido de ABA en las líneas T₁, lo que podría sugerir que al sobre-expresar *psy1*, los niveles de carotenoides bajarían por un aumento en el flujo metabólico a ABA.

Adicionalmente , se propone sobre-expresar el gen *psy1* en nuestro modelo de estudio zanahoria. De esta manera se conocerá el contenido de carotenoides producido por la sobre-expresión de los genes fitoeno sintasa 1 y 2 (*psy1* y *psy2*) de manera independiente. Este resultado es clave para aportar al conocimiento que se tiene hasta la fecha respecto de la carotenogénesis en este organismo.

Una vez evaluada la funcionalidad de estos genes en los modelos vegetales será posible elegir un gen *psy* candidato para ser sobre-expresado en plantas de interés comercial con el fin incrementar los niveles de β -caroteno, lo que aumentará sus propiedades nutritivas y antioxidantes, además de su valor comercial.

9. REFERENCIAS

- Alasalvar, C, Grigor J M, Zhang D, Quantick P, Shahidi F (2001).** Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins and sensory quality of different colored carrot varieties. *J. Agric. Food Chem.* **49**(3):410-1416.
- Alquezar B, Rodrigo MJ, Zacarias L (2008)** Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant Cara Cara. *Phytochemistry* **69**: 1997-2007
- Aluru M, Xu Y, Guo R, Wang Z, Li S, White W, Wang K, Rodermei S (2008)** Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *J Exp Bot* **59**: 3551-3562
- Ampomah-Dwamena C, McGhie T, Wibisono R, Montefiori M, Hellens RP, Allan AC (2009)** The kiwifruit lycopene beta-cyclase plays a significant role in carotenoid accumulation in fruit. *J Exp Bot* **60**: 3765-3779
- Apel W, Bock R (2009)** Enhancement of carotenoid biosynthesis in transplastomic tomatoes by induced lycopene-to-provitamin A conversion. *Plant Physiol* **151**: 59-66
- Barrero JM, Rodriguez PL, Quesada V, Alabadi D, Blazquez MA, Boutin JP, Marion-Poll A, Ponce MR, Micol JL (2008)** The ABA1 gene and carotenoid biosynthesis are required for late skotomorphogenic growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **31**: 227-234
- Bartley GE, Scolnik PA (1993)** cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of *PSY2*, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *J Biol Chem* **268**: 25718-25721
- Bartley GE, Viitanen PV, Bacot KO, Scolnik PA (1992)** A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *J Biol Chem* **267**: 5036-5039
- Bhosale P, Bernstein PS (2005)** Microbial xanthophylls. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 445-455
- Bode S, Quentmeier CC, Liao PN, Hafi N, Barros T, Wilk L, Bittner F, Walla PJ (2009)** On the regulation of photosynthesis by excitonic interactions between carotenoids and chlorophylls. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 12311-12316
- Bonk M, Hoffmann B, Von Lintig J, Schledz M, Al-Babili S, Hobeika E, Kleinig H, Beyer P (1997)** Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes in vitro reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. *Eur J Biochem* **247**: 942-950
- Bouvier F, Isner JC, Dogbo O, Camara B (2005)** Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *Trends Plant Sci* **10**: 187-194
- Bramley PM (2002)** Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J Exp Bot* **53**: 2107-2113
- Buckner B, Miguel PS, Janick-Buckner D, Bennetzen JL (1996)** The *y1* gene of maize codes for phytoene synthase. *Genetics* **143**: 479-488
- Busch M, Seuter A, Hain R (2002)** Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* **128**: 439-453
- Carvajal R. (2010).** Complementación funcional en un sistema heterólogo del gen fitoeno sintasa 1 (*psy1*), involucrado en la biosíntesis de carotenoides en *Daucus carota* (zanahoria) Seminario de título para optar al título de Químico. Universidad Católica de Valparaíso.

- Cazzonelli CI, Pogson BJ** Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* **15**: 266-274
- Clotault J, Peltier D, Berruyer R, Thomas M, Briard M, Geoffriau E** (2008) Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *J Exp Bot* **59**: 3563-3573
- Cunningham FX, Gantt E** (1998) Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 557-583
- Christensen RL, Barney EA, Broene RD, Galinato MG, Frank HA** (2004) Linear polyenes: models for the spectroscopy and photophysics of carotenoids. *Arch Biochem Biophys* **430**: 30-36
- Dall'Osto L, Fiore A, Cazzaniga S, Giuliano G, Bassi R** (2007) Different roles of alpha- and beta-branch xanthophylls in photosystem assembly and photoprotection. *J Biol Chem* **282**: 35056-35068
- Das A, Yoon SH, Lee SH, Kim JY, Oh DK, Kim SW** (2007) An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**: 505-512
- Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E, Bar E, Iijima Y, Pichersky E, Sitrit Y** (2008) Overexpression of the lemon basil alpha-zingiberene synthase gene increases both mono- and sesquiterpene contents in tomato fruit. *Plant J* **56**: 228-238
- Diretto G, Al-Babili S, Tavazza R, Papacchioli V, Beyer P, Giuliano G** (2007) Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. *PLoS One* **2**: e350
- Dubey VS, Bhalla R, Luthra R** (2003) An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J Biosci* **28**: 637-646
- Ducreux LJ, Morris WL, Hedley PE, Shepherd T, Davies HV, Millam S, Taylor MA** (2005) Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of beta-carotene and lutein. *J Exp Bot* **56**: 81-89
- Fierce Y, de Moraes Vieira M, Piantedosi R, Wyss A, Blamer WS, Paik J** (2008) In vitro and in vivo characterization of retinoid synthesis from beta-carotene. *Arch Biochem Biophys* **472**: 126-138
- Fraser PD, Enfissi EM, Halket JM, Truesdale MR, Yu D, Gerrish C, Bramley PM** (2007) Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell* **19**: 3194-3211
- Fraser PD, Kiano JW, Truesdale MR, Schuch W, Bramley PM** (1999) Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Mol Biol* **40**: 687-698
- Fray RG, Wallace A, Fraser PD, Valero D, Hedden P, Bramley PM, Grierson D** (1995) Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *The Plant Journal* **8**: 693-701
- Fuentes P** (2009) Efecto del desarrollo y 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, Wang Q, Menda N, Zamir D, Hirschberg J** (2008) Abscisic acid deficiency in the tomato mutant high-pigment 3 leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content. *Plant J* **53**: 717-730

- Gerjets T, Sandmann M, Zhu C, Sandmann G** (2007) Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in leaves and flowers of tobacco species. *Biotechnol J* **2**: 1263-1269
- Giuliano G, Al-Babili S, von Lintig J** (2003) Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. *Trends Plant Sci* **8**: 145-149
- Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, Beyer P, Taylor MA** (2008) Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol* **26**: 139-145
- Guo X, Yang L, Hu H** (2009) Cloning and expression analysis of carotenogenic genes during ripening of autumn olive fruit (*Elaeagnus umbellata*). *J Agric Food Chem* **57**: 5334-5339
- Gubler F, Chandler PM, White RG, Llewellyn DJ, Jacobsen JV** (2002) Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol* **129**: 191-200
- Hasunuma T, Miyazawa S, Yoshimura S, Shinzaki Y, Tomizawa K, Shindo K, Choi SK, Misawa N, Miyake C** (2008) Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering. *Plant J* **55**: 857-868
- Hirschberg J** (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 210-218
- Hobe S, Trostmann I, Raunser S, Paulsen H** (2006) Assembly of the major light-harvesting chlorophyll-a/b complex: Thermodynamics and kinetics of neoxanthin binding. *J Biol Chem* **281**: 25156-25166
- Howitt CA, Pogson BJ** (2006) Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ* **29**: 435-445
- Ikoma Y, Komatsu A, Kita M, Ogawa K, Omura M, Yano M, Moriguchi T** (2001) Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. *Physiologia Plantarum* **111**: 232-238
- Ito M, Yamano Y, Tode C, Wada A** (2009) Carotenoid synthesis: retrospect and recent progress. *Arch Biochem Biophys* **483**: 224-228
- Ji J, Wang G, Wang J, Wang P** (2009) Functional analysis of multiple carotenogenic genes from *Lycium barbarum* and *Gentiana lutea* L. for their effects on beta-carotene production in transgenic tobacco. *Biotechnol Lett* **31**: 305-312
- Karvouni Z, John I, Taylor JE, Watson CF, Turner AJ, Grierson D** (1995) Isolation and characterisation of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase. *Plant Mol Biol* **27**: 1153-1162
- Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M** (2004) Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol* **134**: 824-837
- Kita M, Kato M, Ban Y, Honda C, Yaegaki H, Ikoma Y, Moriguchi T** (2007) Carotenoid accumulation in Japanese apricot (*Prunus mume* Siebold & Zucc.): molecular analysis of carotenogenic gene expression and ethylene regulation. *J Agric Food Chem* **55**: 3414-3420
- Kopsell DA, Armel GR, Mueller TC, Sams CE, Deyton DE, McElroy JS, Kopsell DE** (2009) Increase in nutritionally important sweet corn kernel carotenoids following Mesotrione and atrazine applications. *J Agric Food Chem* **57**: 6362-6368
- Krinsky NI, Johnson EJ** (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* **26**: 459-516

- Lamers PP, Janssen M, De Vos RC, Bino RJ, Wijffels RH** (2008) Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends Biotechnol* **26**: 631-638
- Li F, Vallabhaneni R, Wurtzel ET** (2008) PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiol* **146**: 1333-1345
- Li F, Vallabhaneni R, Yu J, Rocheford T, Wurtzel ET** (2008) The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiol* **147**: 1334-1346
- Lichtenthaler HK** (1999) The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 47-65
- Lindgren LO, Stalberg KG, Hoglund AS** (2003) Seed-specific overexpression of an endogenous Arabidopsis phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll, and abscisic acid. *Plant Physiol* **132**: 779-785
- Lois LM, Rodríguez-Concepción M, Gallego F, Campos N, Boronat A** (2000) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J* **22**: 503-513
- Maass D, Arango J, Wust F, Beyer P, Welsch R** (2009) Carotenoid crystal formation in Arabidopsis and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS One* **4**: e6373
- Mann V, Harker M, Pecker I, Hirschberg J** (2000) Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nat Biotechnol* **18**: 888-892
- Maoka T** (2009) Recent progress in structural studies of carotenoids in animals and plants. *Arch Biochem Biophys* **483**: 191-195
- McGraw KJ, Nogare MC** (2004) Carotenoid pigments and the selectivity of psittacofulvin-based coloration systems in parrots. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **138**: 229-233
- Misawa N, Truesdale MR, Sandmann G, Fraser PD, Bird C, Schuch W, Bramley PM** (1994) Expression of a tomato cDNA coding for phytoene synthase in *Escherichia coli*, phytoene formation in vivo and in vitro, and functional analysis of the various truncated gene products. *J Biochem* **116**: 980-985
- North HM, De Almeida A, Boutin JP, Frey A, To A, Botran L, Sotta B, Marion-Poll A** (2007) The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J* **50**: 810-824
- Peng J** (2009) Gibberellin and jasmonate crosstalk during stamen development. *J Integr Plant Biol* **51**: 1064-1070
- Pizarro L.** (2008). Estudio de la función del gen licopeno β -ciclase (*lcyb*) en la biosíntesis de carotenoides en *Daucus carota*, Tesis de Magíster. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile
- Polli D, Cerullo G, Lanzani G, De Silvestri S, Yanagi K, Hashimoto H, Cogdell RJ** (2004) Conjugation length dependence of internal conversion in carotenoids: role of the intermediate state. *Phys Rev Lett* **93**: 163002
- Premvardhan L, Bordes L, Beer A, Buchel C, Robert B** (2009) Carotenoid structures and environments in trimeric and oligomeric fucoxanthin chlorophyll *a/c2* proteins from resonance Raman spectroscopy. *J Phys Chem B* **113**: 12565-12574

- Ravanello MP, Ke D, Alvarez J, Huang B, Shewmaker CK** (2003) Coordinate expression of multiple bacterial carotenoid genes in canola leading to altered carotenoid production. *Metab Eng* **5**: 255-263
- Rehak M, Fric E, Wiedemann P** (2008) [Lutein and antioxidants in the prevention of age-related macular degeneration]. *Ophthalmologie* **105**: 37-38, 40-35
- Ritz T, Damjanovic A, Schulten K, Zhang JP, Koyama Y** (2000) Efficient light harvesting through carotenoids. *Photosynth Res* **66**: 125-144
- Rodrigo MJ, Marcos JF, Zacarias L** (2004) Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *J Agric Food Chem* **52**: 6724-6731
- Rodriguez-Villalon A, Gas E, Rodriguez-Concepcion M** (2009) Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* **60**: 424-435
- Romer S, Fraser PD** (2005) Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta* **221**: 305-308
- Romer S, Hugueney P, Bouvier F, Camara B, Kuntz M** (1993) Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Capsicum annum*. *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 1414-1421
- Ronen G, Cohen M, Zamir D, Hirschberg J** (2002) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant *Delta*. *The Plant Journal*, **17**: 341-351
- Sakov VS** (2003) Alternative pathways of carotenoid biosynthesis in prokaryotes and eukaryotes. *Dokl Biochem Biophys* **392**: 294-300
- Scolnik PA, Bartley GE** (1994) Nucleotide sequence of an *Arabidopsis* cDNA for phytoene synthase. *Plant Physiol* **104**: 1471-1472
- Schledz M, al-Babili S, von Lintig J, Haubruck H, Rabbani S, Kleinig H, Beyer P** (1996) Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering. *Plant J* **10**: 781-792
- Sen S, Mukherji S** (2009) Season-controlled changes in biochemical constituents and oxidase enzyme activities in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J Environ Biol* **30**: 479-483
- Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY** (1999) Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J* **20**: 401-412X
- Sies H, Stahl W** (2004) Carotenoids and UV protection. *Photochem Photobiol Sci* **3**: 749-752
- Soll J, Schleiff E.** (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**:198-208.
- Stahl W, Sies H** (2005) Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta* **1740**: 101-107
- Stahl W, Sies H** (2007) Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. *Mol Biotechnol* **37**: 26-30
- 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**: 289-301
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A** (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J* **54**: 733-749

- Toledo-Ortiz G, Huq E, Rodriguez-Concepcion M** (2010) Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 11626-11631
- Vasanthaiiah HK, Ravishankar KV, Shivashankara KS, Anand L, Narayanaswamy P, Mukunda G, Prasad TG** (2006) Cloning and characterization of differentially expressed genes of internal breakdown in mango fruit (*Mangifera indica*). *J Plant Physiol* **163**: 671-679
- Vogel JT, Tan BC, McCarty DR, Klee HJ** (2008) The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions. *J Biol Chem* **283**: 11364-11373
- von Lintig J, Welsch R, Bonk M, Giuliano G, Batschauer A, Kleinig H** (1997) Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J* **12**: 625-634
- Wade NM, Tollenaere A, Hall MR, Degnan BM** (2009) Evolution of a novel carotenoid-binding protein responsible for crustacean shell color. *Mol Biol Evol* **26**: 1851-1864
- Walter MH, Floss DS, Hans J, Fester T, Strack D** (2007) Apocarotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots: contributions from methylerythritol phosphate pathway isogenes and tools for its manipulation. *Phytochemistry* **68**: 130-138
- Welsch R, Wust F, Bar C, Al-Babili S, Beyer P** (2008) A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiol* **147**: 367-380
- White CN, Proebsting WM, Hedden P, Rivin CJ** (2000) Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. *Plant Physiol* **122**: 1081-1088
- Woitsch S, Römer S** (2003) Expression of Xanthophyll Biosynthetic Genes during Light-Dependent Chloroplast Differentiation. *Plant Physiology* **132**: 1508-1517
- Yan P, Gao XZ, Shen WT, Zhou P** Cloning and expression analysis of phytoene desaturase and zeta-carotene desaturase genes in *Carica papaya*. *Mol Biol Rep* **38**: 785-791
- Zhu C, Yamamura S, Koiwa H, Nishihara M, Sandmann G** (2002) cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea*. *Plant Mol Biol* **48**: 277-285
- Zhu C, Yamamura S, Nishihara M, Koiwa H, Sandmann G** (2003) cDNAs for the synthesis of cyclic carotenoids in petals of *Gentiana lutea* and their regulation during flower development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1625**: 305-308
- Zhu CF, Chen X, Wang YD** (2004) Carotenoid biosynthesis in plants and application of its relative genes in gene engineering. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao* **30**: 609-618