

UCH-FC  
Biotecnología  
F632d  
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**Desarrollo de estrategias moleculares para el  
estudio de la función de los genes zds1 y zds2 en  
*Daucus carota* (zanahoria).**

**Carlos Alberto Flores Ortiz**



Abril de 2009

Santiago – Chile

**Directora del Seminario de Título: Dra. Claudia Stange Klein**



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

### “DESARROLLO DE ESTRATEGIAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LOS GENES *zds1* Y *zds2* EN *Daucus carota* (ZANAHORIA)”

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

**CARLOS ALBERTO FLORES ORTIZ**

*Dra. Claudia Stange Klein*  
Directora Seminario de Título

Firma manuscrita en tinta azul de Claudia Stange Klein.



**Comisión de Evaluación**

*Dra. Liliana Cardemil Oliva*  
Presidenta Comisión

Firma manuscrita en tinta azul de Liliana Cardemil Oliva.

Dr. Francisco Chávez Espinoza  
Evaluador

Firma manuscrita en tinta azul de Francisco Chávez Espinoza.

Santiago de Chile, Mayo de 2009



Somos nuestra memoria,  
somos ese quimérico museo de formas inconstantes,  
ese montón de espejos rotos.

**Jorge Luis Borges (1899-1986).**

Espero que la frase anterior no suene a un epitafio ni mucho menos, sino que es una frase que me facilita el relato para contar parte de mi historia y comenzar el armado de los trozos de mi propio espejo.

La primera pieza del espejo, es donde se refleja mi niñez. Ésta transcurre en su mayoría en la tranquila ciudad de Los Andes interrumpida por un breve paso por Arica. Allí comencé mi educación escolar y fue en el Instituto Chacabuco donde tuve mis primeras lecciones académicas y de la vida, además de comenzar varias amistades que se prolongan hasta hoy.

El reflejo de mi adolescencia acontece en la amigable ciudad de Quillota. Ahí encontré nuevos amigos, nuevos desafíos y aprendí nuevas lecciones. Es en ese lugar donde terminé mi etapa escolar en el Instituto Rafael Ariztía para luego emigrar a Santiago donde se encuentra la tercera pieza del espejo.

El transcurso de mi etapa Universitaria está fragmentada en dos piezas. La primera corresponde a Peñaflores, lugar que se convirtió en mi residencia "estable" y la otra parte corresponde a la Universidad de Chile, la casa de estudios a la que le debo mi formación.

El ciclo universitario comienza con mi ingreso a Bachillerato el año 2001. En este programa hice amigos incondicionales, adquirí mis primeras herramientas profesionales y confirmé mi gusto por la ciencia. Es por eso que en el año 2003 ingresé a Biotecnología en la Facultad de Ciencias. Esta Facultad me acogió y me ha entregado, además de charistas entrañables, una sólida formación para enfrentar el comienzo de mi vida científica, reflejado en este seminario de título.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mi familia, a mis hermanas y mis cuñados por dejarme sentir siempre su confianza. A mis sobrinos Paulina, Alonso, Esteban e Ignacio, por permitirme ser parte de su crecimiento y compartir conmigo esa energía propia de los niños. A mi padre Antonio, por el apoyo constante y finalmente a mi madre, Luz María, por ser el arco que es y permitir que esta flecha saliera de la forma en que lo hizo.

También quiero agradecer a las personas del laboratorio, quienes estuvieron directamente involucrados día a día en el proceso de este seminario. A los profesores, a mis compañeros y amigos, siempre dispuestos a prestar ayuda en lo que fuese necesario. En particular mencionar al Seba y a la Ange por facilitarnos la vida. Mención especial para los integrantes del "team zanahoria". Desde los antiguos que ya no están, hasta los que comienzan el camino. Gracias Lore, Bárbara, Pauli, Coto, Guille, Nallat, Juan Camilo, Romina, Carola y por supuesto a la profe Claudia, una excelente guía en lo personal y académico; gracias por su preocupación y consejos en este arduo camino.

Además muchas gracias a todos mis amigos del colegio y la Universidad por su interés y ánimo para lograr este seminario. Fundamentalmente a los charistas, en particular a los de planta y a todos aquellos que puedan responder a esta pregunta: ¿en qué vaso de la chara no tomarías bebida?

Por último, gracias a mi polola Fernanda, por su cariño, compañía y ánimo constante, sobre todo en aquellos momentos en que el camino se pone difícil.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS



ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Carotenoides: función y biosíntesis.....	5
1.2 Regulación de la vía carotenogénica.....	8
1.3 <i>Daucus carota</i> como modelo de estudio.....	10
1.4 Importancia del gen <i>zds</i> en la biosíntesis de los carotenoides.....	11
1.5 Los genes <i>zds</i> en <i>D. carota</i> .....	12
1.6 Estrategia a utilizar.....	13
1.7 Objetivos.....	16
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1 Reactivos utilizados.....	17
2.2 Métodos de Biología Molecular.....	17
2.2.1 Purificación de ARN de plantas.....	17
2.2.2 Transcripción Reversa y PCR.....	17
2.2.3 PCR de colonia de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> .....	19
2.2.4 Purificación ADN plasmidial de <i>E. coli</i> .....	20
2.2.4.1 Purificación mediante kit comercial.....	20
2.2.4.2 Purificación alternativa.....	20
2.2.5 Digestiones enzimáticas.....	21
2.2.6 Extracción de ADN de plantas.....	22
2.2.7 PCR para confirmar las plantas transgénicas.....	22



2.3	Construcciones Genéticas.....	23
2.3.1	Metodología Gateway® y vectores para el SGPT.....	23
2.3.1.1	Estrategia de antisentido para zds1.....	25
2.3.1.2	Estrategia de la horquilla para zds2.....	26
2.3.2	Generación de las construcciones pMDC/zds1 y pHellsgate/zds2.....	29
2.3.2.1	Diseño de partidores.....	29
2.3.2.2	Clonación de los fragmentos zds1 y zds2 en los vectores de entrada....	30
2.3.2.3	Recombinación Gateway®.....	31
2.3.3	Secuenciación.....	31
2.3.4	Evaluación de la funcionalidad de pMDC/zds1 y pHellsgate/zds2.....	31
2.4	Cultivo y Material Biológico.....	32
2.4.1	Material biológico.....	32
2.4.2	Cultivo de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> .....	32
2.4.3	Cultivo de <i>A. tumefaciens</i> para la infección de tejidos vegetales.....	32
2.4.4	Cultivo de zanahorias <i>in vitro</i> y en el invernadero.....	33
2.4.5	Embriogénesis somática de zanahorias.....	34
2.4.6	Transformación de <i>E. coli</i> .....	34
2.4.7	Transformación de <i>A. tumefaciens</i> .....	35
2.4.8	Transformación transitoria de tabaco.....	36
2.4.9	Transformación estable de <i>D. carota</i> .....	36
3.	<b>RESULTADOS</b> .....	37
3.1	Construcción del vector pMDC/zds1 y análisis de su funcionalidad.....	37
3.1.1	Amplificación de la región 3' NTR del gen zds1 y su clonación en el vector de entrada.....	37
3.1.2	Análisis de la construcción pCR8/zds1.....	38
3.1.3	Análisis de la construcción pMDC/zds1.....	40
3.1.4	Evaluación de la funcionalidad de la construcción pMDC/zds1.....	41

3.2	Construcción del vector pHellsgate/zds2 y análisis de su funcionalidad.....	43
3.2.1	Amplificación de la región 3' NTR del gen zds2 y su clonación en el vector de entrada.....	43
3.2.2	Análisis molecular de la construcción pTOPO/zds2.....	43
3.2.3	Análisis molecular de la construcción pHellsgate/zds2.....	45
3.2.4	Evaluación de la funcionalidad de la construcción pHellsgate/zds2.....	47
3.3	Generación de plantas transgénicas de <i>D. carota</i> que poseen la construcción de silenciamiento pHellsgate/zds2.....	49
3.3.1	Transformación estable de <i>D. carota</i> .....	49
3.3.2	Análisis molecular de las líneas de <i>D. carota</i> transformadas con la construcción pHellsgate/zds2.....	50
4.	<b>DISCUSIONES Y PROYECCIONES</b> .....	53
5.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	59
6.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	60



## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I	Programa de PCR utilizados.....	19
TABLA II	Vectores utilizados.....	27
TABLA III	Secuencia y característica de los partidores utilizados.....	29





## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema hipotético de la organización de las enzimas carotenogénicas.....	6
Figura 2	Ruta de biosíntesis de carotenoides.....	8
Figura 3	Esquema del mecanismo de SGPT.....	15
Figura 4	Esquema de la clonación en los vectores de entrada.....	24
Figura 5	Esquema de la recombinación sitio-específica.....	25
Figura 6	Mapa de los vectores utilizados.....	27
Figura 7	Esquema de las estrategia para generar el SGPT y clonamiento Gateway®.....	28
Figura 8	Amplificación de la región 3' NTR de zds1.....	37
Figura 9	BLAST entre la construcción pTOPO/zds1 y la base de datos.....	38
Figura 10	Digestión enzimática de la construcción pCR8/zds1 con EcoRI. ....	39
Figura 11	Digestión enzimática de la construcción pCR8/zds1 con HpaI.....	39
Figura 12	PCR colonia de la construcción pMDC/zds1 en <i>E. coli</i> .....	40
Figura 13	Digestión enzimática de la construcción pMDC/zds1 con EcoRI.....	41
Figura 14	PCR colonia de la construcción pMDC/zds1 en <i>A. tumefaciens</i> .....	41
Figura 15	PCR para zds1 a partir de ADNc de tabaco agroinfiltrado con pMDC/zds1.....	42
Figura 16	Amplificación de la región 3' NTR de zds2.....	43
Figura 17	PCR colonia de la construcción pTOPO/zds2 en <i>E. coli</i> .....	44
Figura 18	Digestión enzimática de la construcción pTOPO/zds2 con EcoRI y HpaI.....	45
Figura 19	Digestión enzimática de la construcción pHellsgate/zds2 con EcoRI.....	46
Figura 20	BLAST entre la construcción pHellsgate/zds2 y la base de datos.....	47
Figura 21	PCR colonia de la construcción pHellsgate/zds2 en <i>A. tumefaciens</i> .....	48
Figura 22	PCR para zds2 a partir de ADNc de tabaco agroinfiltrado con pHellsgate/zds2.....	49
Figura 23	Proceso de embriogénesis somática de <i>D. carota</i> .....	51
Figura 24	PCR para el promotor CaMV 35S de <i>D. carota</i> transformadas.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BLAST : Alineamiento de secuencias de tipo local (Basic Local Alignment Search Tool)
- BrEt : Bromuro de Etidio
- CaMV : Promotor del *Virus del Mosaico de la Coliflor*
- DEPC : Dietilpirocarbonato
- DNasa : Desoxi-ribonucleasa
- dNTP : Desoxinucleótido trifosfato
- HPLC : Cromatografía Líquida de Alta Resolución
- kb : kilobase
- LB : Luria-Bertoni
- MS : Murashige y Skoog
- NTR : Región no traducible
- pb : pares de bases
- PCR : Reacción en cadena de la Polimerasa
- pCR8 : pCR8®/GW/TOPO®
- pMDC : pMDC32
- pTOPO : pENTR™/SD/DTPOPO®
- RNasa : Ribonucleasa
- RpRd : ARN polimerasa ARN dependiente
- RT : Transcripción Reversa
- SGPT : Silenciamiento génico postranscripcional
- siARN : ARN interferente pequeño
- TE : Tris-EDTA
- zds : ζ-caroteno desaturasa
- 2,4D : Ácido 2,4-dichlorophenoxyacetico

## RESUMEN

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides sintetizados por plantas, algas, algunas levaduras y bacterias. En las plantas, estas moléculas se sintetizan en plastidios como los cloroplastos y cromoplastos y cumplen importantes roles en la fisiología de la planta: aumentan la captación de la luz durante la fotosíntesis, protegen del daño oxidativo y disipan el exceso de energía térmica. Además son precursores de la hormona vegetal ácido abscísico, involucrada en procesos de germinación y respuesta al estrés.

La ruta carotenogénica ha sido ampliamente estudiada y los genes y enzimas que participan de ésta han sido descritos y caracterizados en modelos como *Arabidopsis thaliana* y tomate. Sin embargo, los aspectos regulatorios que subyacen a la vía, no han sido completamente dilucidados. En general, para cada enzima de la ruta existe un gen que la codifica, no obstante, se han reportado casos en donde más de un gen codifica para enzimas con igual actividad. En estos casos la expresión de los genes está asociada a un órgano en específico (hojas o frutos). En zanahoria (*Daucus carota*), nuestro modelo de estudio, al igual que en otras plantas se han reportado dos genes fitoeno sintasa (psy1 y psy2) y dos licopeno  $\beta$  ciclasa, (lcyb y lcyb2 o ccs), pero a diferencia de los otros modelos, es la única planta en la que se han identificado dos  $\zeta$ -caroteno desaturasa (zds), denominadas zds1 (DQ222430) y zds2 (DQ192189). En zanahoria, estos genes codificarían para las enzimas involucradas en la transformación del  $\zeta$ -caroteno a licopeno.

Para evaluar la importancia y posibles regulaciones órgano-específicas de los genes zds1 y zds2, se diseñó una estrategia para generar el silenciamiento génico postranscripcional (SGPT) de estos genes en *D. carota*. Para ello, en este seminario de título se generaron, mediante la metodología Gateway®, las construcciones pMDC/zds1 y pHellsgate/zds2. Se evaluó la funcionalidad de ambas construcciones agroinfiltrando transitoriamente hojas de tabaco. Posteriormente se transformaron establemente epicotilos de *D. carota* con *A. tumefaciens* portando la construcción para el SGPT del gen zds2 (pHellsgate/zds2) y, luego de someter los explantes a embriogénesis somática, se obtuvieron 8 plantas transgénicas, a las cuales se les

analizó dicha condición, amplificando el promotor CaMV 35S a partir del ADN genómico de las plantas.

Por lo tanto, en este trabajo, se desarrolló una plataforma que incluyó el uso de herramientas moleculares y celulares para obtener plantas transgénicas de zanahorias que poseen una construcción para SGPT de los genes *zds1* y *zds2*. Esto permite iniciar el estudio de estos genes en *D. carota* y contribuir al estudio de la regulación de la vía carotenogénica en las plantas.

## ABSTRACT

Carotenoids are isoprenoid pigments synthesized by plants, algae and by some yeast and bacteria. In plants, these molecules are synthesized in plastids such as chloroplasts and chromoplasts and play important roles in plant physiology: they increase light absorption in photosynthesis, protect from oxidative damage and dissipate heat excess. They are also precursors of abscisic acid, a plant hormone involved in germination and stress responses.

The carotenogenic pathway has been widely studied, and genes and enzymes have been described and characterized in plant models such as *Arabidopsis thaliana* and tomato. However, the regulatory mechanisms that underlie the pathway have not been elucidated. In general, each enzyme of the pathway is encoded by a single gene, although in some cases more than one gene encodes for enzymes with the same activity. In these cases, the expression of the carotenogenic genes is associated with a specific organ (leaves or fruits). In carrot (*Daucus carota*), our plant model, two genes for phytoene synthase (psy1 and psy2) and lycopene cyclase (lcyb and lcyb2 or ccs) have been reported, as in other plants. However, unlike other models, it is the only specie which has two  $\zeta$ -carotene desaturase genes (zds), termed zds1 (DQ222430) and zds2 (DQ192189). In carrot, these genes may codify an enzyme that may be involved in the conversion of  $\zeta$ -carotene into lycopene.

To assess the significance and potential organ-specific regulation of zds1 and zds2 genes, we designed a strategy to generate post-transcriptional gene silencing (PTGS) of these genes in *D. carota*. Therefore, in this seminar we generated the constructs pMDCzds1 and pHellsgate/zds2, by Gateway® methodology. Both constructs were functionally evaluated by transient agroinfiltration of tobacco leaves. Subsequently, *D. carota* was stably transformed by means of *Agrobacterium tumefaciens* harboring the construct for PTGS of the zds2 gene (pHellsgate/zds2) and after the exposure of the explants to somatic embryogenesis, 8 transgenic plants were obtained and analyzed by the amplification of the CaMV 35S promoter using genomic DNA extracted from the transformed lines.

Therefore, in this work, a platform that included the implementation of cellular and molecular tools was developed to obtain transgenic carrot plants harboring constructs for PTGS of *zds1* and *zds2*. This work will allow the study of these genes in *D. carota* and will contribute to elucidate the regulatory mechanisms of this pathway in plants.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Carotenoides: función y biosíntesis.

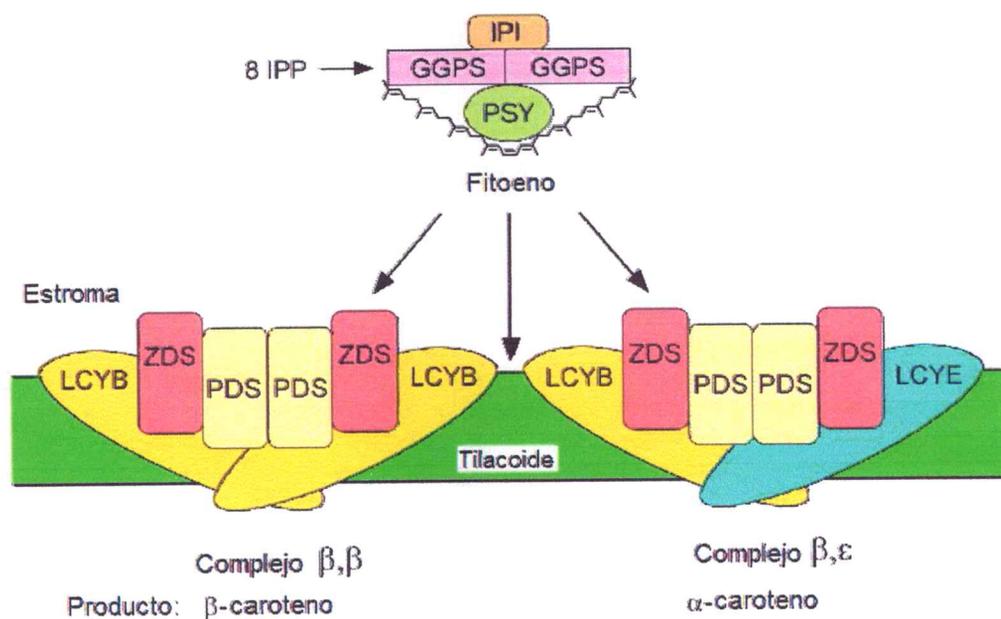
Los carotenoides son pigmentos sintetizados por plantas, algas, levaduras y algunas bacterias. Desde un punto de vista químico, son moléculas isoprenoides compuestas por una larga cadena liposoluble de 40 carbonos. Desde un punto de vista biológico, los carotenoides desempeñan numerosas y variadas funciones, dependiendo del organismo en el que se encuentren.

En animales, actúan como potentes antioxidantes y son precursores de moléculas como el retinol (vitamina A), lo que les confiere propiedades anticancerígenas, importancia nutricional y funciones de señalización principalmente durante el desarrollo (Garattini *et al*, 2007; Fraser y Bramley 2004; Tafti y Ghyselinck, 2007). Dado que los animales no pueden sintetizarlos, la única forma de obtenerlos es a través de la dieta.

En plantas, los carotenoides son componentes esenciales de las membranas fotosintéticas. Entre sus roles se encuentran la foto-protección, ya que previene el daño oxidativo causado por especies reactivas del oxígeno o aquel generado por el triplete de la clorofila en el centro de reacción del fotosistema II y, disipando el exceso de energía térmica a través del ciclo de las xantofilas (Demmig-Adams y Adams, 2002; Telfer, 2005; Niyogi, 1999). También funcionan como pigmentos accesorios de la fotosíntesis, ampliando las longitudes de onda captadas por la clorofila. Además, sirven de precursores para importantes compuestos de la fisiología vegetal como el ácido abscísico (ABA), una hormona vegetal relacionada en los procesos de dormancia y respuesta al estrés (Milborrow 2001).

De acuerdo al grado de insaturaciones que poseen las moléculas de carotenoides, son capaces de emitir coloración amarilla, roja y naranja a los órganos donde se acumulan, como flores, frutos y hojas. Debido a este colorido, los carotenoides cumplen una importante función en la atracción de polinizadores y agentes dispersadores. Además, se ha descrito que algunos apocarotenoides, es decir, carotenoides con un esqueleto de menos de 40 carbonos, están involucrados en la formación de micorrizas (Fester *et al*, 2002).

En cuanto a la organización de los genes que codifican para las enzimas carotenogénicas, se sabe que en las plantas, éstos se ubican en el núcleo de la célula, sin embargo, la biosíntesis de los carotenoides se realiza en los plastidios, tales como, cloroplastos, cromoplastos y amiloplastos. Por lo tanto, las proteínas sintetizadas son destinadas a los plastidios, en donde en general, se agrupan en complejos multi-enzimáticos para ejercer su actividad. Se ha propuesto que las enzimas IPP isomerasa (IPI), geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPPS) y la fitoeno sintasa (PSY) se agrupan en un complejo enzimático en el estroma del cloroplasto (Figura 1), en cambio, las enzimas fitoeno desaturasa (PDS), ζ-caroteno desaturasa (ZDS), licopeno β-ciclaza (LYCB) y licopeno ε-ciclaza (LYCE) conforman un complejo multienzimático en la membrana del tilacoide (Figura 1) (Bonk *et al*, 1997; Cunningham y Grantt, 1998).



*Modificado de Cunningham y Grantt, 1998*

**Figura 1. Esquema hipotético de la organización de las enzimas carotenogénicas.** Las enzimas formarían complejos multienzimáticos tanto en el estroma como en las membranas del plastidio.

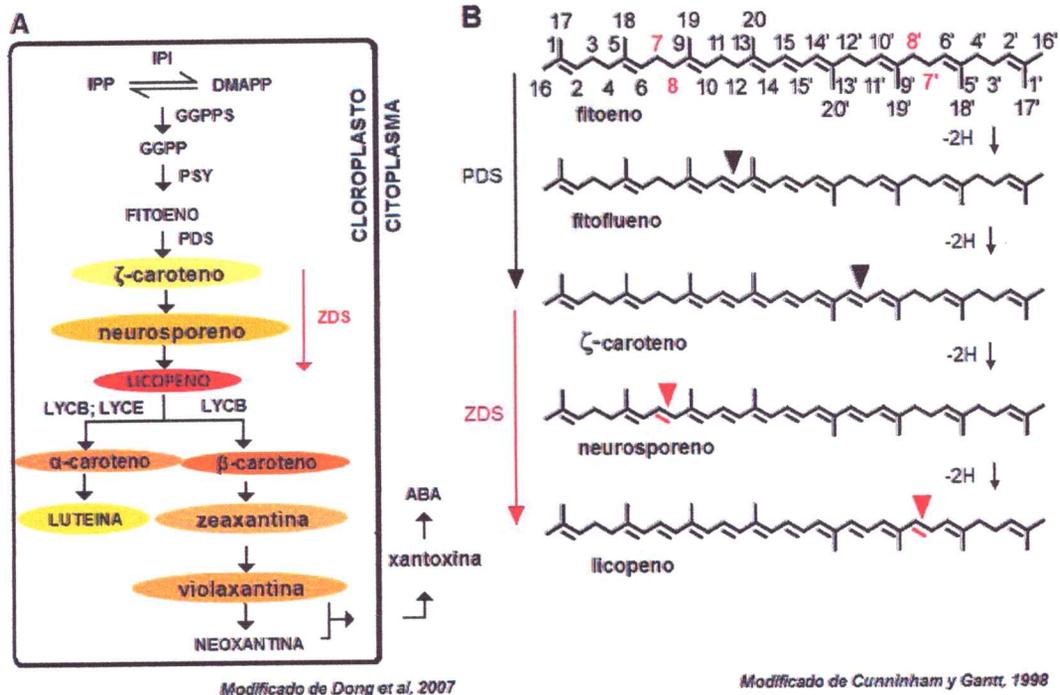
El comienzo de la biosíntesis de los carotenoides se puede abordar desde el isoprenoide isopentenil pirofosfato (IPP). Este puede ser sintetizado mediante dos vías, la primera es la ruta del acetato/mevalonato, ubicada en el citosol y la segunda es la ruta de la xilulosa-5P,

independiente de mevalonato y situada en los plastidios (Lichtenthaler *et al*, 1997). En la vía independiente de mevalonato, el IPP es sintetizado por la condensación del gliceraldehído-3 fosfato con piruvato. Una vez formado el IPP, éste es isomerizado a dimetilalil pirofosfato (DMAPP) mediante la enzima IPP isomerasa (IPI). Posteriormente, se condensan tres moléculas de IPP con una de DMAPP para generar una molécula de 20 carbonos denominada geranilgeranil pirofosfato (GGPP) mediante la enzima GGPP sintasa (GGPPS) (Figura 2A).

Luego, por una unión "cola-cola" de dos moléculas de geranilgeranil pirofosfato ( $C_{20}$ ), se sintetiza un esqueleto de 40 carbonos ( $C_{40}$ ), precursor del cual derivan todos los carotenoides (Britton, 1995). Este compuesto incoloro de 40 carbonos es el fitoeno (Figura 2), sintetizado por la enzima fitoeno sintasa (PSY) y corresponde a la primera reacción específica de la síntesis de carotenoides. Luego, el fitoeno sufre 4 desaturaciones antes de convertirse en licopeno, pasando por fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno y neurosporeno. A raíz de las desaturaciones, estos compuestos presentan colores que van del amarillo pálido en el  $\zeta$ -caroteno, hasta el rojo en el licopeno (Figura 2A). Las dos primeras desaturaciones las realiza la enzima fitoeno desaturasa (PDS) y las dos últimas la enzima  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS) (Figura 2B). Estas 4 desaturaciones realizadas por dos enzimas en las plantas, en la mayoría de las bacterias y hongos son catalizadas por una única enzima denominada fitoeno desaturasa (Armstrong y Hearst, 1996). Posteriormente, el licopeno es ciclado para formar  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno. La enzima licopeno  $\beta$ -ciclase participa en la formación del  $\beta$ -caroteno, mientras que para producir  $\alpha$ -caroteno se requiere la licopeno  $\beta$ -ciclase y la enzima licopeno  $\epsilon$ -ciclase (Figura 2A). Luego, el  $\alpha$ -caroteno es hidroxilado en su anillo- $\beta$  por la caroteno  $\beta$ -hidroxilasa y en su anillo- $\epsilon$  por la caroteno  $\epsilon$ -hidroxilasa, para sintetizar luteína. Por su parte el  $\beta$ -caroteno es hidroxilado para producir zeaxantina (Figura 2A) (Cunningham y Grantt, 1998).

Las etapas sucesivas a la formación de zeaxantina, conducen a la síntesis del ácido abscísico (ABA). Primero se sintetiza un isómero de la zeaxantina denominado violaxantina. Luego, mediante una serie de reacciones, se sintetiza neoxantina, este compuesto es escindido para formar xantoxina, una molécula de 15 carbonos precursor del ABA, que sería presumiblemente

el compuesto que migra desde el plastidio al citosol mediante un mecanismo aún desconocido (Nambara y Marion-Poll, 2005).



**Figura 2. Ruta de la biosíntesis de los carotenoides en las plantas.** A) Diagrama simplificado de las enzimas y principales productos de la ruta de biosíntesis de carotenoides en las plantas. IPP, isopentenil pirofosfato; IPI, isopentenil isomerasa; DMAPP, dimetilalil pirofosfato; GGPPS, geranylgeranyl pirofosfato sintasa; GGPP, geranylgeranyl pirofosfato; PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; ZDS,  $\zeta$ -caroteno desaturasa; LYCB, licopeno  $\beta$ -ciclaza; LYCE, licopeno  $\epsilon$ -ciclaza; ABA, ácido abscísico. B) Desaturaciones consecutivas desde fitoeno hasta la síntesis de  $\beta$ -caroteno. Las dos primeras desaturaciones las realiza la enzima fitoeno desaturasa y las dos segundas (7-8 y 7'-8') la enzima  $\zeta$ -caroteno desaturasa. Las desaturaciones se indican por los triángulos invertidos. Además se muestra la convención para la numeración de los carbonos del fitoeno.

## 1.2 Regulación de la vía carotenogénica

Como describimos en el punto anterior, los genes y las enzimas que participan en la ruta se conocen con bastante detalle, no obstante, los aspectos de la regulación que subyacen a ésta son en su mayoría desconocidos y por lo tanto un ámbito interesante de investigación.

La necesidad de esclarecer los mecanismos reguladores y los puntos claves de la vía, ha quedado en evidencia en la medida que se ha buscado modificar la ruta de biosíntesis de los carotenoides para maximizar el potencial de éstos y aprovechar sus propiedades.

Entre los mecanismos reguladores más estudiados para la vía carotenogénica, se encuentra el efecto de la luz. Se ha descrito en diferentes modelos que la luz ejerce una regulación positiva sobre la expresión estos genes y que las moléculas que median dicho efecto son los fitocromos y criptocromos (von Lintig *et al*, 1997; Schofield y Paliyath, 2005; Pizarro y Stange, 2009). Por ejemplo en *A. thaliana* y la planta de mostaza *Sinapsis alba*, se demostró que los niveles de expresión del gen que codifica para la PSY aumentan por efecto de la luz (von Lintig *et al*, 1997). Análisis más exhaustivos, basados en los estudios del promotor, han demostrado que el gen *psy*, posee cajas de secuencias en el ADN que permiten la regulación por la luz (Welsch *et al*, 2003). La misma activación se reporta por efecto de la luz en el caso de IPI de maíz (Albrecht y Sandmann, 1994) y en los niveles de transcrito de *lcy-β* en tomate (Hirschberg 2001).

Otro factor en el que se ha puesto énfasis, por su potencial rol en la regulación, es el desarrollo de la planta. Se ha reportado que la síntesis de carotenoides aumenta durante el desarrollo floral (Zhu *et al*, 2003), la maduración de los frutos (transición de cloroplastos a cromoplastos) (Bramley, 2002) y en el proceso de diferenciación de los cloroplastos en las hojas, proceso que también es inducido por luz (Woitsch y Römer, 2003).

Un tercer aspecto que se relaciona con la regulación de la vía, corresponde a los casos en donde se ha reportado que dos o más genes codifican para enzimas con la misma actividad. En la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, existe una copia única de cada gen carotenogénico que codifica para las enzimas de la ruta, con la excepción de las enzimas GGPS, IPI y caroteno-β hidroxilasa para las cuales existen 1, 2 y 2 genes respectivamente (Cunningham, 2002).

En tomate, también se ha reportado más de un gen carotenogénico que codifica para enzimas con la misma actividad. En este caso, el paso de licopeno a β-caroteno es llevado a cabo por dos enzimas LYCB dependiendo del órgano que sintetice el pigmento, por lo tanto, existe una enzima específica de cloroplastos (hojas), LYCB y otra específica de cromoplastos (frutos), CYC-B (Ronen *et al*, 2000). También en tomate, se han reportado dos genes que codifican

para enzimas con actividad PSY, el gen *psy1*, que es inducido principalmente en pétalos y durante la maduración del fruto (Welsch *et al*, 2000; Giorio *et al*, 2008) y *psy2*, activo principalmente en las hojas maduras (tejido fotosintético) (Bartley y Scolnik, 1993; Giorio *et al*, 2008).

### 1.3 *Daucus carota* como modelo de estudio

Nosotros estamos interesados en estudiar la síntesis de los carotenoides en *D. carota* (zanahoria), debido a que es una planta que produce elevados niveles de carotenoides, en especial  $\beta$ -caroteno en la raíz de reserva, aproximadamente 0,394 mg/g de peso fresco (Jayaraj *et al*, 2008). Además, la zanahoria sintetiza carotenoides tanto en hojas, que están expuestas a la luz, como en su raíz de reserva, que se desarrolla en oscuridad. Considerando los antecedentes expuestos, la luz tiene un rol activador de la expresión de genes carotenogénicos en hojas, flores y frutos. Sin embargo, nada se sabe del mecanismo que regula la síntesis de carotenoides en la raíz de reserva de la zanahoria.

Actualmente en la base de datos del NCBI están anotadas las secuencias de la mayoría de los genes que codificarían para las enzimas de la ruta de los carotenoides en *D. carota* como: isopentenil isomerasa (IPI), geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPS) 1 y 2, fitoeno sintasa (PSY) 1 y 2, carotenoide isomerasa (CRTISO), fitoeno desaturasa (PDS),  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS) 1 y 2, licopeno  $\beta$ -ciclase (LCYB) 1 y 2, licopeno  $\epsilon$ -ciclase (LCYE), entre otras (Just *et al*, 2007). Estas secuencias de ADNc han sido anotadas y recientemente se ha reportado la expresión diferencial de algunos de estos genes entre zanahorias blancas, amarillas, naranjas y rojas (Cloutault *et al*, 2008). En este estudio se observó que la expresión de los genes se correlacionó con la cantidad de pigmento en las variedades coloreadas y no así en la variedad cuya raíz de reserva es blanca, en donde a pesar de no haber acumulación de carotenoides los genes sí se expresaban.

#### 1.4 Importancia del gen *zds* en la biosíntesis de los carotenoides

La enzima ZDS en plantas es requerida para la desaturación del  $\zeta$ -caroteno a neurosporeno y licopeno (Figura 2B) y, mutaciones en dicho gen o defectos en la actividad ZDS, causan alteraciones fisiológicas graves. Entre las mutantes descritas que se atribuyen a defectos para este gen o para la enzima, encontramos trabajos con naranjas (Rodrigo *et al*, 2003), girasol (Conti *et al*, 2004), *A. thaliana* (Dong *et al*, 2007), maíz (Matthews *et al*, 2003) y cianobacterias (Bautista *et al*, 2005).

En naranjas, se describió la mutante *Pinalate*, la cual presenta frutos de color amarillo en vez del color anaranjado de la variedad silvestre a causa de la alteración en la composición de los carotenoides en la cáscara. La mutación solo afecta a los frutos, ya que en hojas los niveles de carotenoides son normales. Además, esta mutante presenta un retraso en la desaparición del color verde durante la maduración, lo que se debería a bajos niveles de ABA en la planta (Rodrigo *et al*, 2003).

La mutante en las plantas de girasol se denomina *non dormant-1 (nd-1)*. Esta planta posee una gran alteración en el locus del gen *zds*, lo que genera, plantas viables sólo en condiciones de luz tenue. Además, posee una gran acumulación de  $\zeta$ -caroteno, y un fenotipo vivíparo (semillas que germinan antes de tiempo) (Conti *et al*, 2004).

Las mutantes *spc1* de *A. thaliana* presentan un fenotipo de muerte celular espontánea. Esta mutante posee dos variaciones alélicas, una débil denominada *spc1-1* y una fuerte denominada *spc1-2*. La primera incluye blanqueamiento de las hojas, acumulación de superóxido y un mosaico de muerte celular. La segunda causa una detención completa del desarrollo luego de la germinación, por lo que se trata de un fenotipo letal. En este trabajo se plantea que la mutante genera una serie de otros problemas en procesos fisiológicos como el desarrollo anormal de cloroplastos, una baja fotoprotección, un nivel reducido de actividad del fotosistema II, deficiencias de ABA y una insuficiente señalización retrógrada (plastidio-núcleo) causada por la pérdida de función de ZDS (Dong *et al*, 2007).

En maíz, las plantas mutantes para el gen *zds*, presentan un fenotipo vivíparo, lo que da cuenta de deficiencias de ABA y acumula grandes cantidades de  $\zeta$  caroteno (Matthews *et al*, 2003).

Finalmente, existe un trabajo en el que se genera una cianobacteria con el gen *zds* mutado. Esta mutante presenta gran fotosensibilidad, por lo que solo crece en condiciones de poca luz, mermando su crecimiento (Bautista *et al*, 2005).

En base a estos antecedentes queda de manifiesto la importancia del gen *zds*, ya que las deficiencias en la biosíntesis de los carotenoides repercuten en los procesos fisiológicos y metabólicos como por ejemplo el desarrollo y la fotosensibilidad.

### **1.5 Los genes *zds* en *D. carota*.**

Es interesante destacar que en zanahoria, al igual que en tomate se han descrito dos genes *psy* (*psy1* y *psy2*) y *lcyb* (*lcyb* y *lcyb2* o *ccs*), pero a diferencia de los otros modelos, es la única planta en la que se han identificado dos  $\zeta$ -caroteno desaturasa (*zds*), *zds1* (DQ222430) y *zds2* (DQ192189) (Just *et al*, 2007). La secuencia anotada para *zds1* posee 2078pb, de los cuales 1722 corresponden a la región codificante. Para *zds2*, la secuencia anotada es de 2038pb y su región codificante consta de 1728pb. Estos genes poseen en la región codificante una identidad nucleotídica de 88% y en las regiones 5' NTR y 3' NTR un 24 y 53% respectivamente. Nosotros proponemos que el motivo de que existan dos genes *zds*, responde al hecho de que esta hortaliza sintetiza carotenoides en contextos completamente distintos, por una parte en sus hojas, expuestas a la luz y por otra parte, en su raíz de reserva, en condiciones de oscuridad. Bajo este punto de vista, se justificarían dos genes que codifiquen para enzimas con la misma actividad pero que permitan una regulación diferencial o antagónica dependiendo del órgano (tejido fotosintético o raíz de reserva) en el cual se requieren. Adicionalmente, en nuestro laboratorio se han realizado ensayos de expresión mediante RT-PCR en tiempo real, determinando que *zds1* y *zds2* aumentan su expresión durante el desarrollo de hojas y raíz modificada, y que *zds2* tiene una expresión dos veces superior a *zds1* en raíz de reserva. Además, la luz produce un efecto sobre la expresión de ambos genes en zanahoria,

observando que los niveles de mensajero de *zds1* aumentan en una raíz tratada con luz mientras que los transcritos para *zds2* disminuyen respecto a una raíz de reserva crecida en oscuridad (Stange *et al*, 2008). Estos antecedentes indican que ambos genes se expresan diferencialmente pero no nos informan sobre la importancia de los mismos en la planta.

Es por ello, que en este seminario de título se realizó el trabajo molecular necesario para estudiar la importancia de los genes *zds1* y *zds2* en la biosíntesis de  $\beta$ -caroteno en *D. carota*. Para ello, se construyeron los vectores con los cuales se realizó el silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT) de cada uno de estos genes en *D. carota* y, en un trabajo futuro se analizará el efecto causado sobre la síntesis de carotenoides en las hojas y raíz de reserva de estas plantas, para determinar si alguno de estos genes tienen función órgano-específica o si son requeridos en toda la planta.

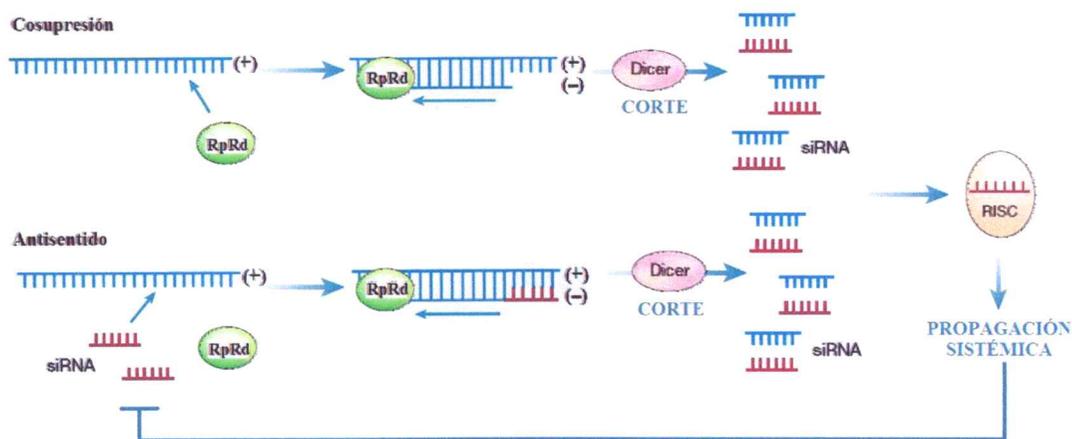
### **1.6 Estrategia a utilizar**

En este seminario de título se construyeron los vectores necesarios para el SGPT de los genes *zds1* y *zds2* de *D. carota*, con la finalidad de poder estudiar la función de estos genes en la carotenogénesis de *D. carota*.

El SGPT se basa en la disminución de los niveles de transcrito, de tal manera de generar plantas "knock down" para el transcrito *zds1* y *zds2*. Por lo tanto, la metodología posee la ventaja de no generar mutantes nulas (knock out), ya que remanentes de transcrito del gen que se está silenciando se logrará traducir, por lo que eventualmente se logrará ver fenotipos que generados mediante mutación completa podrían ser letales (sección 1.4).

El SGPT es un mecanismo molecular de degradación de una población de ARNs y aunque no afecta directamente la traducción, su acción se correlaciona con una disminución en los niveles de las proteínas correspondientes. Para facilitar el entendimiento del PTGS, éste puede ser dividido en tres etapas: iniciación, propagación y mantención (Vaucheret, 2001). La etapa de iniciación consiste en generar los "siARN" que gatillarán el silenciamiento, a partir del clivaje de la doble hebra de ARN (dsARN). Para la etapa de iniciación, se han descrito dos vías

principales. La primera se llama mecanismo de cosupresión (Figura 3) y consiste en generar una gran cantidad de transcrito (hebra +) de manera de sobrepasar un nivel umbral endógeno y activar la ARN polimerasa ARN-dependiente (RpRd) que sintetiza la hebra complementaria (hebra -) al ARN sobre-expresado, los cuales hibridan formando un ARN de doble hebra aberrante para el contexto celular. La segunda vía, consiste en generar transcritos en orientación antisentido con respecto al ARNm endógeno (Figura 3). Estos transcritos deben tener un porcentaje de identidad igual o mayor al 81%, de forma que éstos hibriden y sirvan como partidores para la RpRd que generará la doble hebra. Una versión más sofisticada y eficiente de esta vía, es la que se usa en este seminario y, consiste en introducir artificialmente a la planta las secuencias como invertidos repetidos para generar el silenciamiento, de modo que al transcribirse se obtenga directamente una horquilla de ARN (ver métodos). Luego, en la etapa de propagación, los dsARN son cortados en fragmentos de entre 21 a 25 nucleótidos con 2 o 3 nucleótidos desapareados en el extremo 3', por la acción de una ribonucleasa denominada DICER, generándose los siARN. DICER es una proteína que pertenece a la familia de las RNasa tipo III y es específica para dsARN. Luego, los siARN se unen a un complejo denominado RISC (RNA induced silencing complex) el cual es el encargado de la degradación del ARNm blanco (Figura 3). La etapa de propagación, se basa en que el SGPT puede ser transmitido desde un órgano o punto localizado en la planta, hacia otros órganos. Esto indica que las señales del silenciamiento local (RISC con una hebra de ARN "guía"), se pueden mover a través de las células, posiblemente a través de plasmodesmos y propagarse sistémicamente vía floema por toda la planta. Finalmente, con respecto a la etapa de mantenimiento, se ha descrito que para que el SGPT sea estable en el tiempo, se requiere de condiciones similares a las que se necesitan para gatillarlo. Es decir, para que el silenciamiento sea estable, se necesita de un suministro constante de las señales que lo gatillan (miARN, RISC, etc.), lo que refleja lo dinámico del mecanismo.



Modificado de Baulcombe, 2004

**Figura 3. Esquema del mecanismo de SGPT.** RpRd, ARN polimerasa ARN-dependiente; RISC (RNA induced silencing complex), complejo RNA inductor de silenciamiento.

La estrategia de SGPT ya ha sido usada para estudios de genes carotenogénicos en tomate, donde, se evaluó el efecto de la enzima poligalacturonasa en la maduración del fruto (Schuch *et al*, 1989). También se determinó que la enzima PSY-2 no contribuye a la síntesis de los carotenoides en la maduración del fruto (Fraser *et al*, 1999) y que *cycb* tiene función fruto específica (Ronen *et al*, 2000). En zanahoria fue aplicada para estudiar la función del gen *lcyb* (seminario de título y tesis de Magíster de L. Pizarro 2007 y 2008), determinando que dicho gen es relevante para la síntesis de  $\beta$ -caroteno en toda la planta. En base a estos antecedentes, se decidió utilizar esta estrategia para evaluar la importancia de *zds1* y *zds2* en *D. carota*.

Para construir los vectores de silenciamiento se utilizó la región 3' no traducible (NTR) de *zds1* y *zds2* que al ser regiones específicas de cada gen por presentar alrededor de un 50% de identidad nucleotídica, nos permitirá generar el silenciamiento de un gen independiente del otro. Los fragmentos serán introducidos en los vectores utilizando la metodología Gateway®. Esta tecnología, se basa en el uso de secuencias de recombinación específicas, generando una plataforma universal de clonamiento que permite destinar los genes o fragmentos de interés a distintos vectores disminuyendo el número de etapas de sub-clonamientos.

## 1.7 Objetivos

### Objetivo general

- Desarrollo de herramientas moleculares y celulares para el estudio de los genes *zds1* y *zds2* en *Daucus carota* mediante silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT).

### Objetivos específicos

- Generar vectores para SGPT de *zds1* y *zds2* mediante la metodología Gateway®.
- Evaluación en tabaco, de la funcionalidad de las construcciones generadas para el SGPT de *zds1* y *zds2*.
- Obtener plantas transgénicas con la construcción para el PTGS de *zds2* mediante embriogénesis somática.
- Análisis molecular para la selección y confirmación de las líneas transgénicas de *D. carota* que poseen la construcción para el PTGS de *zds2*.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 REACTIVOS**

Se utilizaron reactivos de calidad apropiada para las técnicas empleadas de biología molecular y análisis. Estos productos fueron adquiridos en Meck, Invitrogen, Fermentas, Promega, Axygen, New England Biolabs, Sigma-Aldrich, Phyto Technology Laboratories y Omega Bio-tek.

### **2.2 MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

#### **2.2.1 Purificación de ARN de plantas**

Para la extracción del ARN de *D. carota* o de tabaco, según corresponda, se utilizó el método de RNA-solv® Omega Bio-tek. Aproximadamente 100 mg de hojas de *D. carota* silvestre o tabaco, fueron homogenizadas en un mortero estéril con 1 mL de RNA-solv® en presencia de nitrógeno líquido. Luego, se pasó el homogenizado a tubo de microcentrifuga de 1,5 mL donde se agregó 200 µL de cloroformo, se agitó en un vórtex por 15 segundos y se incubó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12.000 x g por 15 minutos a temperatura ambiente y se rescató el 80% de la fase superior a otro tubo de microcentrifuga. Enseguida se precipitó el ARN con 500 µL de isopropanol enfriado a -20°C y se agitó en vórtex por 15 segundos. Se centrifugó 3 minutos a 16.000 x g para obtener el precipitado, el cual fue secado durante 10 minutos después de descartar el sobrenadante. Finalmente se resuspendió en 20 µL de agua DEPC libre de RNasa.

#### **2.2.2 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)**

El ARN extraído, se trató con DNasa I para eliminar posibles remanentes de ADN producto de la extracción. La reacción contenía 7 µL de ARN (300 ng/µL), 1 µL de tampón de DNasa I, 0,5 µL de agua DEPC, 0,25 µL de inhibidor de RNasa, y 1 µL de DNasa I (Fermentas) agregado al final para evitar la degradación del ARN. La reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos, después se puso en hielo y se agregó 1 µL de EDTA-DEPC 25 mM.

Para la síntesis de ADNc a partir de ARN de *D. carota* silvestre o de tabaco se mezcló, en cada caso, 5,5 µL de ARN tratado con DNasa, con 1 µL de partidor oligo AP (5'-CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') y se sometieron al programa "RT-PCR" (tabla I, sección 2.2.2). El programa comenzó con 5 minutos a 70°C, luego se detuvo momentáneamente y se pusieron los tubos en hielo durante 5 minutos, tiempo en que se agregó 12,5 µL de la mezcla de la transcripción reversa. Esta mezcla contenía 4 µL de tampón 5X ImpromII, 1,7 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 dNTPs DEPC, 0,5 µL de inhibidor de RNasa y 5.3 µL de de agua DEPC. Finalmente, se agregó 1 µL de Transcriptasa Reversa ImpromII (Promega) a cada tubo excepto al control negativo sin transcriptasa reversa. Posteriormente se continuó con el programa.

La integridad del ADNc obtenido se confirmó mediante un PCR amplificando el gen constitutivo de la subunidad ribosomal 18S con los partidores "18S" (tabla III, sección 2.3.2.1) y el programa "chequeo" (tabla I, sección 2.2.2). Una vez confirmada la integridad del ADNc, se realizó un PCR para amplificar el fragmento de interés.

El protocolo general para las reacciones de PCR utilizadas en todo el seminario de título contenían: 1X del tampón de la enzima, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (en el caso que el tampón no lo contenga), 0,2 µM de los partidores sentido y antisentido, 0,2 mM de los dNTPs, 1U de la *taq* polimerasa, el ADN o ADNc como molde y agua suficiente para completar 25 µL.

Para visualizar los ácidos nucleicos (ADN o ARN), se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Éste fue preparado con tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) y bromuro de etidio 1 µg/mL. Las muestras fueron mezcladas con el tampón de carga (Azul de bromofenol 0.25%, xylene cyanol 0.25% y glicerol 80%) previo a ser cargadas en el gel. La electroforesis fue realizada a una diferencia de potencial de entre 80 y 100 V durante 30 minutos para ADN y 50 V durante 10 minutos para ARN. Finalmente los geles se fotografiaron en quipo Syngene.

**Tabla I. Detalle de los programas de PCR utilizados en este seminario de título. A) Programa utilizado para amplificar un fragmento de la región 3' no codificante de los genes *zds1* y *zds2* de *D. carota*. B) Programa utilizado para comprobar la integridad del ADNc (con partidores 18S se amplificó la subunidad ribosomal 18S) y confirmar la transformación estable de las zanahorias (con partidores 35S se detectó el promotor CaMV 35S en el genoma de *D. carota*). C) Programa para obtener ADNc mediante la transcriptasa reversa (RT-PCR).**

**A. *zds***

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
1	1	95	4 minutos	1
2	1	94	50 segundos	35
	2	51	50 segundos	
	3	72	50 segundos	
3	1	72	7 minutos	1
4	1	4	∞	1

**B. Chequeo**

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
1	1	95	5 minutos	1
2	1	94	40 segundos	30
	2	52	40 segundos	
	3	72	50 segundos	
3	1	72	10 minutos	1
4	1	4	∞	1

**C. RT-PCR**

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	1	70	5 minutos
	2	hielo	5 minutos
	3	25	5 minutos
2	1	42	60 minutos
	2	70	15 minutos
3	1	4	∞

**2.2.3 PCR de colonia de *E. coli* y *A. tumefaciens* para la selección de los clones positivos**

"PCR de colonia" es una variante del PCR tradicional en que se usa como molde el cultivo de bacterias directamente, en vez del ADN plasmidial purificado. Las colonias de *E. coli* transformadas con las construcciones pMDC/*zds1* y pTOPO/*zds2* se analizaron mediante este método. En el caso de las colonias de *A. tumefaciens*, se confirmaron las construcciones pMDC32/*zds1* y pHellsgate/*zds2*. La reacción de PCR estaba compuesta, como se detalla en 2.2.2 por el tampón, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, *Taq* polimerasa, el partidor 5'*zds1* o *zds2* GATE, el partidor

3'zds1 o zds2 GATE, 0,5 µL de cultivo de *E. coli* ó *A. tumefaciens* según sea el caso y agua nanopura para completar el volumen. Como control negativo se utilizó agua en vez del cultivo bacteriano y como control positivo ADN plasmidial de la construcción correspondiente.

#### **2.2.4 Purificación de ADN plasmidial de *E. coli***

Para las digestiones enzimáticas se utilizó ADN plasmidial purificado de manera alternativa para los análisis preliminares y, mediante kit comercial, para confirmar los análisis con los clones de interés.

##### **2.2.4.1 Método de purificación mediante kit comercial**

Se siguió el protocolo y se usaron los reactivos proporcionados por el fabricante del kit Axyprep™ de Axygen. Con este ADN se confirmaron los análisis de digestión, las amplificaciones de PCR y se utilizó para los procedimientos de transformación, recombinación y secuenciación del ADN.

##### **2.2.4.2 Método de purificación alternativo**

Primero se realizó un cultivo líquido convencional en medio LB de los clones de interés (sección 2.4.2). Una vez obtenido el cultivo, se centrifugaron 4 mL de cultivo por 1,5 minutos a 12.000 x g y se eliminó el sobrenadante. Luego, se resuspendió mediante vórtex con 100 µL de solución I fría (Glucosa 50 mM, Tris HCl pH8 25mM y EDTA pH8) y después se agregaron 200 µL de Solución II (preparada en el momento, NaOH 0,2M y SDS 1%). Se mezcló por inversión 5 veces y se dejaron los tubos en hielo. Después se agregó 150 µL de Solución III fría (Acetato de Potasio 5M, 11,5% de Acido Acético Glacial y 28,5% de agua), se mezcló por inversión y se mantuvo en hielo durante 5 minutos. En seguida, se centrifugó a 4°C por 5 minutos y se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga. Se agregó un 50% del volumen recuperado de una mezcla de fenol: cloroformo (1:1), se mezcló por vórtex y se centrifugó durante 2 minutos a 4°C. Después, el sobrenadante se pasó a un tubo fresco y el ADN se precipitó con

dos volúmenes de etanol absoluto. Se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos y luego se centrifugó a 12.000 x g durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante con cuidado y se lavó agregando 700 µL de etanol 70% frío y centrifugando a 12.000 x g por 5 minutos a 4°C. Enseguida, se eliminó el sobrenadante y los tubos se secaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió en 40 µL de agua nanopura y se trató con RNasa A (2µg/µL) durante 30 minutos a 37°C.

### **2.2.5 Digestiones enzimáticas para la selección de los clones positivos**

Para la construcción pCR8/zds1, se digirió con la enzima *EcoRI* para liberar el fragmento clonado. La reacción contenía 225 ng de ADN plasmidial, 1X del tampón *EcoRI*, 5 U de *EcoRI* y agua nanopura para completar 20 µL. Para determinar la orientación del inserto se realizó una digestión con la enzima *HpaI*. Esta digestión estuvo compuesta por 200 ng de vector, 1X del tampón Neb4, 2.5 U de la enzima *HpaI* y agua nanopura para completar 20 µL.

Para confirmar la clonación y orientación del fragmento zds2 en el vector pTOPO se realizó una digestión enzimática doble, digiriendo primero con la enzima *HpaI* y luego con *EcoRI*. La digestión con *HpaI* estuvo compuesta por 180 ng de ADN plasmidial, 1X del tampón React4, 2.5 U de la enzima *HpaI* y agua nanopura para completar 20 µL. Después de 1 hora a 37°C se continuó con la digestión de *EcoRI*, en esta reacción se emplearon 15 µL de la mezcla de la primera digestión, 1 µL del tampón *EcoRI* 10X, 10 U de la enzima *EcoRI* y agua nanopura hasta completar 20 µL.

En el caso de la construcción pMDC32/zds1, la digestión con *EcoRI* permitió confirmar la presencia del fragmento y la orientación de éste. La reacción estuvo compuesta por 250 ng de ADN plasmidial, 1X de tampón *EcoRI*, 5 U de la enzima *EcoRI* y agua nanopura hasta completar 20 µL.

Para la digestión de la construcción pHellsgate12/zds2, generado como producto de la recombinación LR, se utilizaron 150 ng de ADN plasmidial, 1X del tampón *EcoRI*, 7U de enzima *EcoRI* y agua nanopura para completar 20 µL.

Las reacciones de digestión enzimática fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa y las bandas visualizadas mediante tinción con BrEt (sección 2.2.2).

#### **2.2.6 Extracción de ADN de plantas**

Para la extracción de ADN se siguió el protocolo descrito por Doyle y Doyle (1987). Brevemente, 100 mg de tejido se molieron en un mortero en presencia de nitrógeno líquido y 600 µL de tampón CTAB (cetil trimetilamonio bromuro (CTAB) al 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20mM y Tris pH 8 100 mM). La mezcla fue calentada a 60°C por 30 minutos. Después, se agregó 400 µL de CTAB y se calentó a 70°C por 15 minutos. Posteriormente, se agregó 400 µL de una mezcla cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 24:1 y se mezcló por inversión. Una vez mezclado, se centrifugó a 15.000 g durante 10 minutos. Se transfirió el 50% del volumen de la fase superior a un nuevo tubo de microcentrífuga al que se le agregó 700 µL de isopropanol de manera de precipitar el ADN. Esta mezcla se incubó a -20°C por 30 minutos. A continuación, se centrifugó a 15.000 g por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregó 700 µL de etanol 70%. Luego se centrifugó por 5 minutos a 15.000 g, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente, se resuspendió el ADN con 20 µL de agua nanopura.

#### **2.2.7 PCR para confirmar las plantas transgénicas**

Para determinar la inserción estable en el genoma de *D. carota* de la construcción que posee el fragmento sentido y antisentido de *zds2*, se amplificó, mediante un PCR, el promotor CaMV 35S que dirige la expresión de dicha construcción. Para dicho PCR se utilizó ADN genómico de las zanahorias transformantes inducidas por embriogénesis somática. Se utilizó el programa denominado "chequeo" y se detalla en el punto B de la tabla I (sección 2.2.2). Como control negativo se utilizó ADN de zanahoria silvestre y como control positivo el vector pTOPO/*zds2*.

## 2.3 CONSTRUCCIONES GENÉTICAS

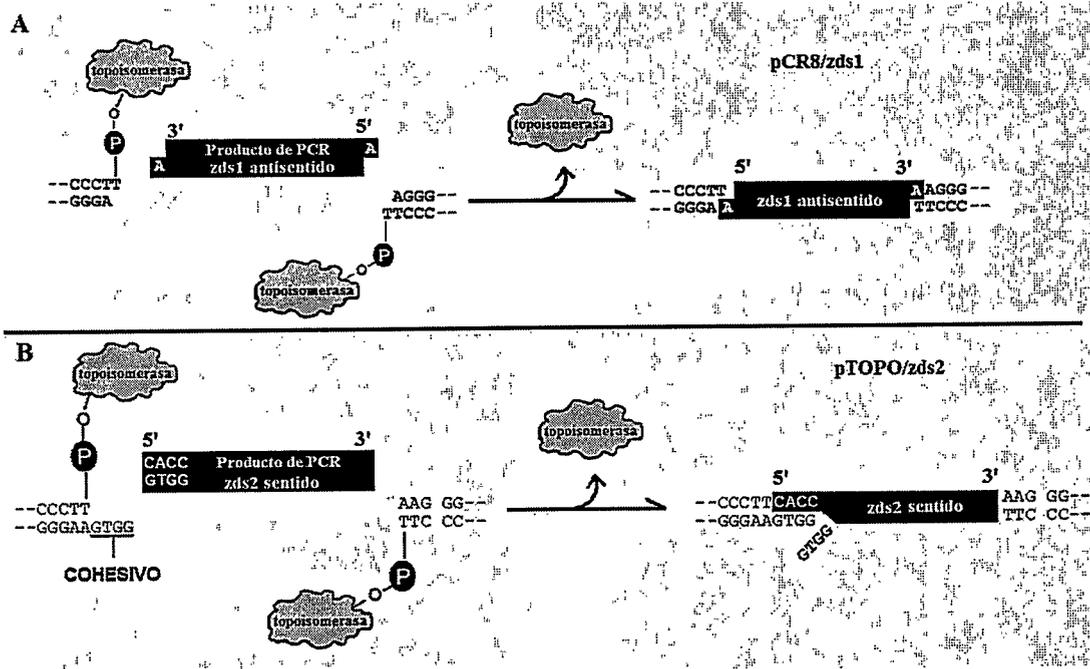
### 2.3.1 Metodología Gateway® y vectores para el SGPT

La generación tradicional de construcciones genéticas se basa en la digestión de las hebras de ADN con enzimas de restricción y la posterior unión de éstas mediante enzimas ligasas.

La metodología Gateway®, a diferencia de la tradicional, se basa en las propiedades de recombinación sitio-específicas del bacteriófago lambda ( $\lambda$ ) para realizar las etapas de clonamiento y subclonamiento en la generación de las construcciones genéticas.

El bacteriófago  $\lambda$  es un virus de *Escherichia coli* que tiene la particularidad de integrar su ADN en el genoma del organismo hospedero. Este proceso consiste en una recombinación a través de secuencias específicas denominadas "att" (attachment), por lo que el fenómeno se denomina recombinación sitio-específica. Estas secuencias se han caracterizado, aislado y comercialmente usado para generar una plataforma de múltiples vectores que utilizan la recombinación como mecanismo para la clonación. Esta metodología se conoce con el nombre de Tecnología Gateway® y se desarrolló con el objetivo de aumentar la eficiencia y rapidez de las clonaciones. Las construcciones genéticas en este seminario de título se obtuvieron a través de esta tecnología.

Para ingresar la secuencia de interés a esta plataforma de clonación Gateway®, existen determinados vectores denominados "vectores de entrada". Estos vectores cuentan con una enzima del tipo topoisomerasa unida covalentemente a ellos (Figura 4 y Figura 6). Esta enzima se denomina comercialmente TOPO® y es capaz de ligar las hebras de ADN de la secuencia de interés, en este caso un producto de PCR, con dicho vector de entrada. Una vez realizada la clonación, la enzima es escindida del vector (Figura 4).



Catálogo Gateway® Technology Invitrogen (nrs. 12535-019 y 12535-027)

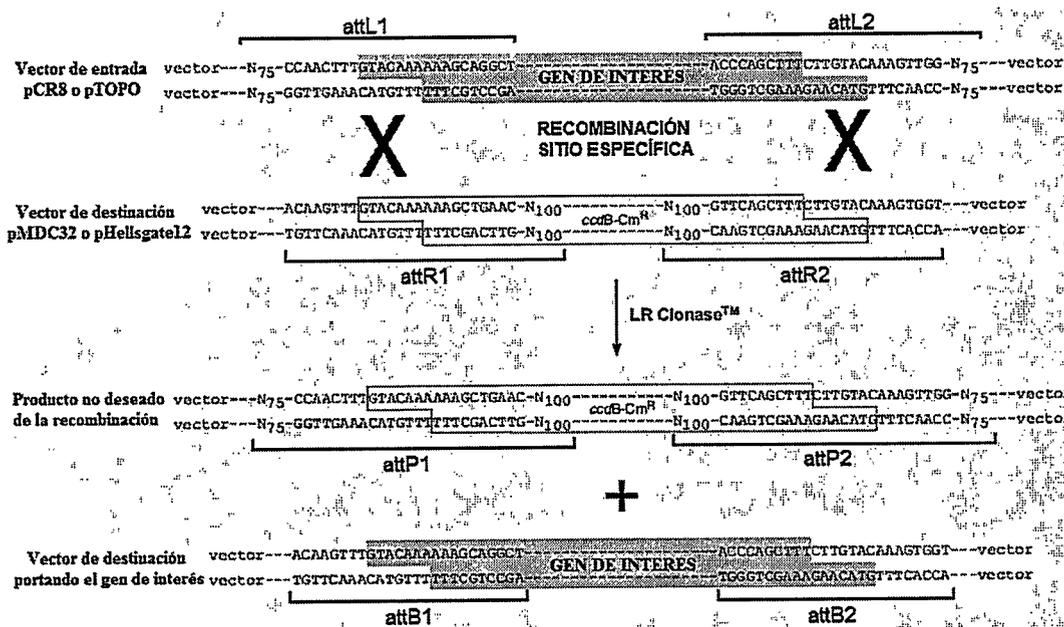
**Figura 4. Esquema de la clonación del fragmento de interés en los vectores de entrada. A:** Clonación de la región 3'NTR de *zds1* para la estrategia de antisentido. **B:** Clonación de *zds2* en orientación sentido para la estrategia de la horquilla.

Luego de tener clonado el fragmento de interés en el vector de entrada, se debe clonar dicho fragmento en el vector en donde efectivamente se realizará el análisis del gen de interés. Este segundo vector se denomina vector de destinación y comercialmente existe una amplia gama de estos vectores dependiendo del análisis que se desee realizar con el fragmento que se encuentra en el vector de entrada.

En este seminario de título se utilizaron vectores binarios de destinación (pHellsgate y pMDC32) para insertar establemente en el genoma de las plantas el fragmento de interés (región 3'NTR) de los genes *zds1* y *zds2* de zanahoria. Para insertar el fragmento de interés desde el vector de entrada al vector de destinación se realiza una recombinación sitio específica por medio de los sitios "att", como se describió anteriormente.

Este mecanismo de recombinación requiere de una enzima denominada LR Clonasa® que pertenece a la familia de las integrasas y tiene la capacidad de generar interacciones intra e

inter-moleculares. Esta característica permite que la enzima sola pueda realizar la recombinación completa a través de un mecanismo de corte y ligación de las hebras (Figura 5). Para ello se ponen en contacto el vector de entrada que posee clonado el fragmento de interés entre los attL y el vector de destinación en presencia de LR Clonasa®. Producto de la recombinación sitio-específica entre los attL del vector de entrada y attR del vector de destinación, se generan dos productos. Uno de ellos es el vector de destinación con el fragmento de interés.



Catálogo Gateway® Technology Invitrogen (nrs. 12535-019 y 12535-027)

Figura 5. Esquema de la recombinación sitio-específica. Previo a la recombinación, las secuencias se denominan attL y attR y, luego de la recombinación attB y attP. La LR Clonasa® es la enzima que permite cortar y ligar el material genético.

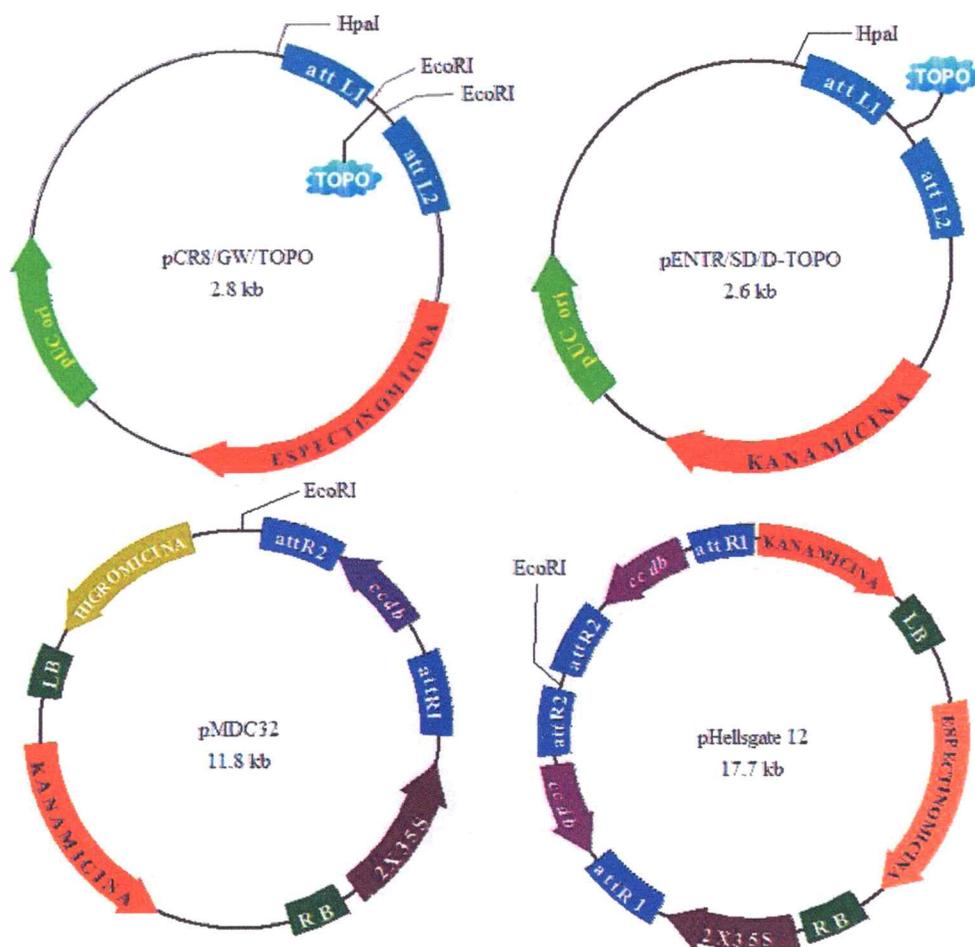
### 2.3.1.1 Clonación del fragmento de zds1 en orientación antisentido

Inicialmente solo se pretendía usar la estrategia de la horquilla de ARN y por lo tanto los vectores pTOPO y pHellsgate, sin embargo esta estrategia solo funcionó para el gen zds2. Por ello, luego de múltiples intentos infructuosos para obtener la construcción pHellsgate/zds1, se optó por cambiar a la estrategia basada en la sobre-expresión del fragmento en antisentido (Figura 3 y Figura 7A). Por lo tanto para la incorporación del fragmento zds1 al sistema

Gateway®, se amplificó a partir del clon pTOPO/zds1 la región 3'NTR del gen (295pb) y se clonó en orientación antisentido respecto al promotor en el vector de entrada pCR8 (Figura 4A). Posteriormente se recombinó con el vector de destinación pMDC32 (adquirido desde el stock ARBC del sitio Tair, N° de stock CD3-738) para obtener el fragmento en antisentido bajo el control del promotor CaMV 35S doble. Al expresarse esta construcción, se espera que el fragmento en antisentido hibride con el ARNm endógeno que tiene orientación sentido, formando el ARN doble hebra (Figura 7A).

#### **2.3.1.2 Clonación del fragmento de zds2 en orientación sentido**

Para el gen zds2, se utilizó la estrategia de la horquilla de ARN, por lo tanto para la incorporación de este fragmento al sistema Gateway®, se amplificó el fragmento 3'NTR del gen (271pb) a partir de ADNc de zanahoria y se clonó direccionalmente en orientación sentido en el vector pTOPO. Para que el clonamiento sea direccional, se agregaron 4 nucleótidos (CACC) en el extremo 5' del partidor sentido (tabla II). Estas bases son complementarias e hibridan con cuatro bases presentes en el vector pTOPO (Figura 4B), lo que permite que el fragmento ingrese al vector en la orientación deseada. Luego, se recombinó con el vector pHellsgate12 (donado por el Dr. Patricio Arce del Laboratorio de Bioquímica de la Pontificia Universidad Católica de Chile), que posee sitios de recombinación en una distribución tal (attR1-attR2—intron—attR2-attR1), que permite obtener el fragmento de interés clonado en orientación sentido y antisentido respecto al promotor. De esta forma, la horquilla de ARN que gatilla el silenciamiento se transcribe directamente desde el vector (Figura 7B).



**Figura 6. Esquema de los vectores utilizados en este seminario de título.** Los vectores pertenecen a la familia de vectores Gateway®. Los vectores pCR8 y pTOPO se denominan vectores de entrada y los vectores pMDC y pHellsgate corresponden a vectores de destino.

**Tabla II. Vectores utilizados en este seminario de título**

NOMBRE	TAMAÑO (pb)	RESISTENCIA CONFERIDA
pCR8/GW/TOPO	2817	Espectinomicina (100 mg/L)
pENTR/SD/D-TOPO	2601	Kanamicina (50 mg/L)
pHellsgate12	17681	Espectinomicina (100 mg/L) en bacteria Kanamicina (100 mg/L) en <i>D. carota</i>
pMDC32	11752	Kanamicina (100 mg/L) en bacteria Higromicina (8 mg/L) en <i>D. carota</i>

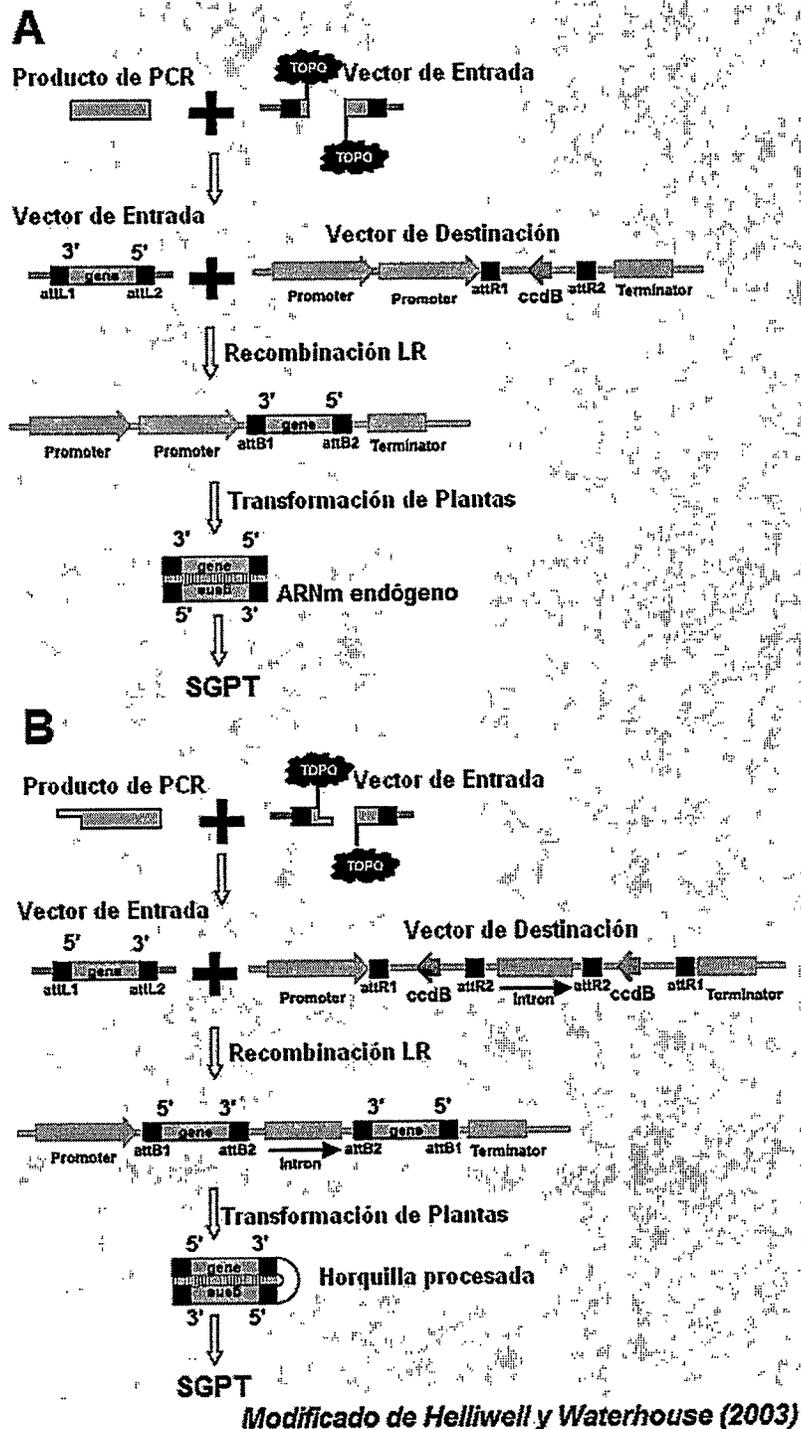


Figura 7. Esquema de las estrategias utilizadas para el SGPT. A) Estrategia de sobre-expresión del fragmento en antisense de *zds1*. Vector de entrada pCR8 y vector de destinación pMDC32. B) Estrategia de sobre-expresión de la horquilla de ARN para *zds2*. Vector de entrada pTOPO y de destinación pHellsgate12.

## 2.3.2 Generación de las construcciones pMDC/zds1 y pHellsgate/zds2

### 2.3.2.1 Diseño de los partidores.

Para el diseño de los partidores, se buscó en la base de datos NCBI la secuencia anotada para las secuencias zds1 (Nº de acceso DQ222430) y zds2 (Nº de acceso DQ192189) de *D. carota* (Just *et al.*, 2007). Los partidores se diseñaron en la región 3' no traducible (NTR) de cada gen, que como se mencionó anteriormente, poseen una identidad nucleotídica de alrededor de un 50%. De esta manera se espera lograr una amplificación exclusiva de cada gen y por lo tanto, obtener posteriormente un SGPT específico. La secuencia de éstos y todos los partidores utilizados en este seminario de título se detalla en la tabla III.

**Tabla III. Partidores utilizados en este seminario de título.**

PARTIDOR	SECUENCIA DEL PARTIDOR (5'→3')	DESCRIPCIÓN
5' zds1 GATE sentido	<u>CACCTA</u> ACGACCTTGCGAAAAACA	El partidor 5' posee las bases CACC (subrayadas) que permiten el clonamiento direccional en pTOPO. Junto con el partidor 3' amplifican un fragmento de 295pb del gen zds1.
3' zds1 GATE antisentido	GAATTCAACCAAGTAAACGTATCCC	
5'zds2 GATE sentido	<u>CACCGC</u> CTTGCGAGAAGAAGATTG	El partidor 5' posee las bases CACC (subrayadas) que permiten el clonamiento direccional en pTOPO. Junto con el partidor 3' amplifican un fragmento de 271pb del gen zds2.
3'zds2 GATE antisentido	CTCGACGCTTGGCCTACTAAT	
5'18S sentido	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT	Estos partidores se utilizaron para verificar la integridad tanto del ADN genómico como del ADNc. Amplifican un fragmento de 196pb del gen para el ARN ribosomal 18S.
3'18S antisentido	ACAATGATCCTTCCGCAGGT	
5'35S sentido	CCAGTATGGACGATTCAAGG	Estos partidores confirman la inserción del DNA-T ya que hibridan con una región interna del promotor CaMV 35S, amplificando un fragmento de 401pb.
3'35S antisentido	CGCAATGATGGCATTGTAG	
P27 5' sentido	GGGATGACGCACAATCC	La construcción pHellsgate/zds2 se secuenció con ambos partidores para verificar la correcta orientación de los fragmentos clonados.
P27 3' antisentido	GAGCTACACATGGTGAGG	
M13 F	GTA AACGACGGCCAG	Se utilizaron para secuenciar la construcción pTOPO/zds1.
M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC	

### 2.3.2.2 Clonación de los fragmentos zds1 y zds2 en los Vectores de Entrada

El fragmento de 295pb del la región 3'NTR del gen zds1 y el fragmento de 271pb de la región 3'NTR del gen zds2 se amplificaron a partir de ADNc de *D. carota*. La reacción de PCR contenía tampón de la *Taq*,  $MgCl_2$ , el partidor zds1 GATE sentido o zds2 GATE sentido y el partidor zds1 GATE antisentido o zds2 GATE antisentido, dNTPs, agua nanopura, *Taq* polimerasa, con las concentraciones detalladas en la sección 2.2.2 y 1  $\mu$ L de ADNc como molde. Como control negativo se usó agua en vez de ADNc y como control positivo de la reacción de PCR, se amplificó la subunidad ribosomal 18S. EL programa de PCR utilizado para amplificar tanto el fragmento zds1 como zds2, se detalla en la tabla I A (sección 2.2.2). El producto de PCR fue verificado mediante electroforesis y visualizado mediante tinción con Bret (sección 2.2.2).

Para la ligación de cada fragmento amplificado, al vector pTOPO, se mezclaron 2 y 4  $\mu$ L de producto de PCR para zds1 y zds2 respectivamente, con 1  $\mu$ L de solución salina y 1  $\mu$ L de vector pTOPO. La mezcla se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente antes de transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante golpe térmico, generando los vectores pTOPO/zds1 y pTOPO/zds2.

Para obtener la construcción pCR8/zds1, se realizó un nuevo PCR con el mismo protocolo de PCR descrito anteriormente pero usando como molde de ADN la construcción pTOPO/zds1 previamente generada, en vez de ADNc. Para clonar el fragmento amplificado de zds1 en el vector pCR8, se mezclaron 3  $\mu$ L de producto de PCR con 1  $\mu$ L de solución salina, y 1  $\mu$ L agua nanopura y 1 $\mu$ L de vector pCR8. La mezcla se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente antes de transformar las células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante un golpe térmico.

### **2.3.2.3 Recombinación Gateway® entre los vectores de entrada y destinación**

Para la recombinación del vector pCR8/zds1 con el vector de destinación pMDC32 se mezcló 200 ng de la construcción pCR8/zds1, 50 ng del vector de destinación pMDC32, 2 µL de LR Clonasa™ II Invitrogen y tampón TE pH8 para completar 10 µL.

Para la recombinación de pTOPO/zds2 con pHellsgate12, se mezcló 130 ng de la construcción pTOPO/zds2 (26 ng/µL), 100 ng del vector de destinación pHellsgate12 (50 ng/µL), 2 µL de LR Clonasa™ II y tampón TE pH 8 para completar 10 µL.

Tanto para la recombinación del fragmento de zds1 como para zds2, una vez realizada la mezcla, se agitó mediante vórtex dos segundos, dos veces y luego se incubaron las reacciones toda la noche a temperatura ambiente. Para detener la reacción se agregó 1 µL de Proteinasa K (Invitrogen) y se incubó durante 10 minutos a 37°C.

Finalmente, se transformaron las bacterias competentes de *E. coli* DH5α por golpe térmico (sección 2.4.8) y se seleccionaron los clones transformantes en placas de LB agar con los antibióticos respectivos (tabla II, sección 2.3.1).

### **2.3.3 Secuenciación**

Los clones positivos de la construcción pTOPO/zds1, pHellsgate/zds2 identificados mediante los análisis de digestión enzimática, PCR de colonia y de ADN plasmidial, fueron secuenciados en MacroGen Co. (USA), usando el partidador P27 Sentido y P27 Antisentido para pHellsgate y los partidores del fago M13 para pTOPO (tabla III, sección 2.3.2.1).

### **2.3.4 Evaluación de la funcionalidad de las construcciones pMDC/zds1 y pHellsgate/zds2**

Para comprobar la funcionalidad de las construcciones pMCD/zds1 y pHellsgate/zds2, se transformó *A. tumefaciens* (sección 2.4.9) con cada uno de los vectores para lo cual se agroinfiltraron hojas de tabaco (sección 2.4.10) para determinar mediante RT-PCR (sección 2.2.2) la expresión de los fragmentos zds1 y zds2.

## 2.4 CULTIVO Y MATERIAL BIOLÓGICO

### 2.4.1 Material Biológico

Genotipo de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ : *supE44*,  $\Delta$ *lacU169*( $\phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*.

Genotipo de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101: C58, plásmido Ti curado, Gen<sup>R</sup>, Rif<sup>R</sup>.

Se utilizó *D. carota* variedad Nantes para realizar el trabajo.

### 2.4.2 Cultivo de *E. coli* y *A. tumefaciens*

Las bacterias *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  se crecieron en medio LB líquido (1% (p/v) de triptona y 0.8%(p/v) NaCl), con una agitación de 200 rpm y medio LB sólido (1% (p/v) de triptona, 0.8%(p/v) NaCl y 1.6% (p/v) de agar), durante 16 horas a una temperatura de 37°C y con el antibiótico correspondiente a la resistencia otorgada por el vector (tabla II, sección 2.3.1).

En el caso de *A. tumefaciens*, se utilizó la cepa GV3101. Para su cultivo se utilizó medio LB con los antibióticos rifampicina 10mg/L, para la selección cromosómica y gentamicina 50mg/L para la selección del plásmido Ti, además del antibiótico correspondiente para la selección del plásmido de interés (tabla II, sección 2.3.1). El cultivo líquido se creció durante 18 horas, y con una agitación de 200 rpm, mientras que el cultivo sólido se creció por 48 horas. Ambos a una temperatura de 28°C. De todos los cultivos líquidos se realizó un respaldo en glicerol para guardar las bacterias a -80°C.

### 2.4.3 Cultivo de *A. tumefaciens* para la infección de tejidos vegetales

Para la preparación de este cultivo, se inocularon 100  $\mu$ L de *A. tumefaciens* transformadas (sección 2.4.9) en 15 mL de LB con los antibióticos respectivos (tabla II, sección 2.3.1) y se crecieron de manera convencional en agitación durante 18 horas a 28°C (sección 2.4.2).

Luego, se centrifugó por 10 minutos a 8.000 x g, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 30 mL de MS líquido (Murashige y Skoog, 1962) con acetosiringona a una concentración final de 25mM. Finalmente, se dejó creciendo por 3 horas en agitación a 28°C antes de utilizarlo para infectar el tejido vegetal.

#### **2.4.4 Cultivo de *D. carota in vitro* y en el invernadero**

Para la transformación estable de la zanahoria, se utilizaron explantes de plántulas cultivadas *in vitro*. Para el cultivo *in vitro*, primero se esterilizaron las semillas durante 15 minutos en agitación con una solución de 2% de fungicida CAPTAN. La mezcla se dejó decantar para descartar el líquido. Luego, se enjuagó tres veces con 50 mL de agua destilada estéril. Después, se les agregó a las semillas 100 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 20% y se mantuvo en agitación durante 1 hora. Las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se retiró el exceso de agua de las semillas con papel absorbente. Luego, éstas se sembraron en placas con medio basal MS. Las plantas regeneradas fueron utilizadas para la transformación estable de zanahoria con pHellsgate/zds2.

Para el cultivo en invernadero, las plántulas *in vitro* obtenidas de la embriogénesis somática producto de la transformación con pHellsgate/zds2, se trasplantaron a maceteros de 1200 cm<sup>3</sup> aprox., con una mezcla de tierra de hoja: vermiculita (2:1) y condiciones de 16 horas de luz y 8 de oscuridad a una temperatura constante de 24°C. Para la aclimatación de las plantas, éstas inicialmente fueron cubiertas con un vaso plástico de manera de mantener la alta humedad a la que fueron sometidas durante su cultivo *in vitro*. Luego de 2 semanas, las plantas se comenzaron a destapar gradualmente, para terminar por destaparlas completamente en un periodo de 6 semanas aproximadamente.

#### **2.4.5 Embriogénesis somática de *D. carota***

La zanahoria es una planta ampliamente utilizada para realizar estudios que involucran embriogénesis somática, por lo que este procedimiento está bien establecido (Pennell *et al*, 1992; Sato-Nara *et al*, 2004).

Una vez realizada la infección del tejido vegetal con *A. tumefaciens* (sección 2.4.11) y pasadas las 35 horas, los explantes se lavaron con agua destilada estéril para eliminar el exceso de *Agrobacterium* y se depositaron en nuevas placas MS con las hormonas necesarias para la embriogénesis somática y kanamicina como antibiótico de selección ya que pHELLSGATE12 expresa el gen nptII en plantas. El primer medio (medio I) contenía kanamicina (25 mg/L), la auxina 2,4D (1 mg/L) y cefotaxime (300 mg/L) el antibiótico que elimina al *Agrobacterium*. Después de 5 semanas, los explantes se pasaron al segundo medio (medio II), que estaba conformado por kanamicina (50 mg/L), 2,4D (0,5 mg/L) y cefotaxime (300 mg/L). Después de permanecer 4 semanas en el segundo medio, con fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, los explantes desarrollaron embriones en estado inmaduro. Al finalizar las 4 semanas se pasaron al tercer (medio III). En el medio III se aumentó la concentración de kanamicina a 100 mg/L, se eliminó la hormona 2,4D para favorecer la maduración de los embriones los que generaron plántulas y el cefotaxime se redujo a 150mg/L. Finalmente, luego de 4 semanas, las plántulas regeneradas se pasaron a frascos de MS donde elongaron y enraizaron. Luego de 5 meses, se obtuvieron plántulas con raíces apropiadas para su aclimatación a tierra (sección 2.4.4).

#### **2.4.6 Transformación de *E. coli***

Primero se prepararon células competentes de *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ , para esto se crecieron 100  $\mu$ L de inóculo en 5 mL de LB durante toda la noche a 37°C con agitación (sección 2.4.2). Luego se pasaron 500  $\mu$ L de este cultivo a 80 mL de LB en un matraz y se puso a crecer hasta una densidad óptica de 0.4-0.5 a 600 nm (3 horas aproximadamente). Después se centrifugó a 4°C por 10 minutos a 1600 x g en tubos estériles, se resuspendió el precipitado cuidadosamente en

10 mL de  $\text{CaCl}_2$  0.1M estéril y frío. Luego, se volvió a centrifugar a  $4^\circ\text{C}$  por 5 minutos a  $1.100 \times g$ , se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 10 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,1M estéril y frío. Luego, se incubó en hielo en el refrigerador por 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó a  $4^\circ\text{C}$  por 5 minutos a  $1.100 \times g$ , se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 2 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,1M estéril y frío. Finalmente, alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  se guardaron a  $-80^\circ\text{C}$  con glicerol (35%) para su uso posterior.

Para la transformación de las construcciones genéticas obtenidas, se mezcló y mantuvo en hielo durante 30 minutos, 100  $\mu\text{L}$  de bacterias *E. coli* competentes con la reacción de ligación de interés. Luego, se aplicó el golpe térmico a  $42^\circ\text{C}$  por 1,5 minutos y se depositó la mezcla de reacción en hielo por 1 minuto. Posteriormente, la mezcla se puso en 1 mL de LB líquido y se dejó incubando durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  con agitación. Después, en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL se centrifugó a  $8.000 \times g$ , se eliminó el sobrenadante y se resuspendió con las células en 50  $\mu\text{L}$  que fueron plaqueados en una placa de LB sólido con los antibióticos respectivos (tabla II, sección 2.3.1). La placa se dejó a  $37^\circ\text{C}$  por toda la noche hasta la aparición de colonias.

#### **2.4.7 Transformación de *A. tumefaciens***

Primero se prepararon células de *A. tumefaciens* competentes para lo cual se realizó un cultivo de la manera convencional (sección 2.4.2) en 4 ml de medio LB con rifampicina 10 mg/L y gentamicina 50 mg/L en agitación durante 18 horas a  $28^\circ\text{C}$ . Luego el inóculo fue vertido en 100 mL de LB líquido con rifampicina 10 mg/L y gentamicina 50 mg/L y se incubó con agitación hasta una  $\text{D.O.}_{600} = 0,5$ . Después se mantuvo en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a  $3.000 \times g$  por 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1mL de  $\text{CaCl}_2$  20 mM estéril y frío. Finalmente, se fraccionó en alícuotas de 100  $\mu\text{L}$ , las que se congelaron con nitrógeno líquido para ser guardadas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

Para la transformación, se descongeló en hielo una alícuota de 100  $\mu$ L de células de *A. tumefaciens* competentes y se mezclaron con 500 ng de la construcción pHellsgate/zds2. Se congeló en nitrógeno líquido durante 5 minutos y luego se descongeló a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla se incubó en medio LB a 28°C durante toda la noche con agitación. Finalmente, para la selección de los clones transformados, se plaquearon 50  $\mu$ L de las células en una placa de LB-agar con rifampicina 10mg/L, gentamicina 50mg/L además de kanamicina 50mg/L para las células transformadas con pMDC/zds1 y espectinomicina 100mg/L para las transformadas con pHellsgate/zds2.

#### **2.4.8 Transformación transitoria de tabaco**

Se realizó la transformación transitoria de las hojas de tabaco con un cultivo de *A. tumefaciens* preparado para la infección del tejido vegetal (sección 2.4.3). El cultivo de bacterias que contiene la construcción pMDC/zds1 o pHellsgate/zds2, se recogió en una jeringa sin aguja, ésta se presionó contra el envés de la hoja de manera que el líquido invada el tejido. Luego de cuatro días se realizó la extracción de ARN (sección 2.2.1) de la zona agroinfiltrada.

#### **2.4.9 Transformación estable de *D. carota***

En *D. carota* se ha estandarizado el método de transformación estable por *A. tumefaciens* (Chen y Punja, 2002). En este procedimiento se coincubaron explantes de los epicotilos de zanahoria de 1,5 cm cultivadas *in vitro* (sección 2.4.4), con el cultivo de *A. tumefaciens* que contiene la construcción pHellsgate2/zds2. Esta coincubación se realizó en una placa *Petri* durante 10 minutos, con agitación esporádica y mediante incisiones al tejido vegetal con un bisturí de manera de favorecer la acción de la bacteria. Luego, los explantes se secaron en papel absorbente estéril y se depositaron en una placa de MS sin antibiótico. La placa se mantuvo en condiciones de oscuridad durante 35, para luego traspasar los explantes a las placas respectivas e inducir la embriogénesis (sección 2.4.5).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Construcción del vector pMDC/zds1 y análisis de su funcionalidad.

##### 3.1.1 Amplificación de la región 3' NTR del gen zds1 y su clonación en el vector de entrada.

En la Figura 8A se muestra la amplificación del fragmento de 295pb de la región 3'NTR del gen zds1 a partir del ADNc de *D. carota*, el cual fue clonado en el vector de entrada pTOPO, debido a que inicialmente se pretendía recombinar con el vector de destinación pHellsgate. Los clones positivos fueron secuenciados y, la secuencia indicó que posee un 100% de identidad respecto a parte de la región 3'NTR del gen zds1 de *D. carota* sp sativus (Figura 9). Con el clon secuenciado, se intentó recombinar infructuosamente pTOPO/zds1 con el vector pHellsgate, por ello, se amplificó nuevamente el fragmento de zds1 a partir de la construcción pTOPO/zds1 secuenciada (Figura 8B) y se clonó en el vector de entrada denominado pCR8. Una vez realizada la reacción de clonación (sección 2.3.2.2), se transformó *E. coli* y las colonias se seleccionaron en medio LB con espectinomycin (sección 2.4.8)

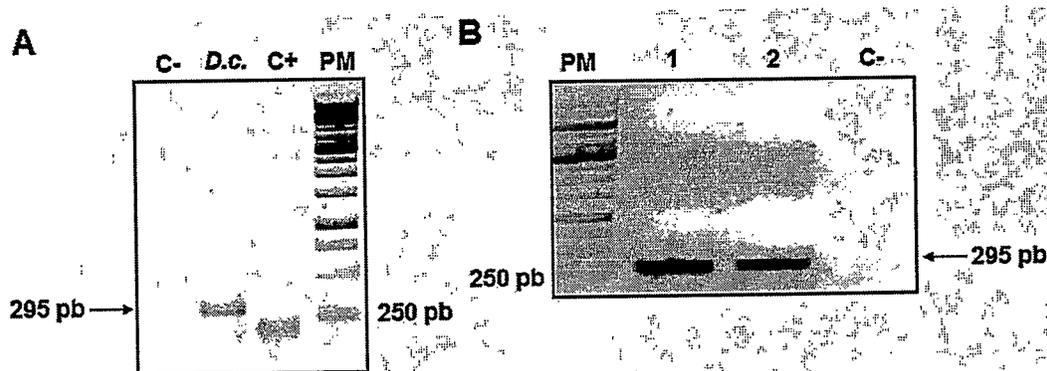


Figura 8. Amplificación de la región 3'NTR del gen zds1: Electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. A) *D.c.*: amplificación del fragmento de 295pb a partir de ADNc de *D. carota*. C+: amplificación de un fragmento de 196pb de la subunidad ribosomal 18S. B) 1 y 2 muestran la amplificación usando ADN plasmidial de pTOPO/zds1 como molde. En A y B, el carril PM es el estándar de peso molecular y el carril C- corresponde al control negativo en donde se utilizó agua como molde.

```

>gb|DQ222430.1| Daucus carota subsp. sativus zeta carotene desaturase (ZDS1)
mRNA, complete cds
Length=2078

Score = 527 bits (285), Expect = 4e-146
Identities = 285/285 (100%), Gaps = 0/285 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 160 TAACGACCTTGCAGAAAACAATTGCTTCAATCGACTCCAACACACCTACAGAAGCTGAGT 219
          |||
Sbjct 1794 TAACGACCTTGCAGAAAACAATTGCTTCAATCGACTCCAACACACCTACAGAAGCTGAGT 1853

Query 220 TAACCCCTGTCTGATGCACCTACGTTATAGCTGTATTCCGACCCTAGAAAGGTGATCATACT 279
          |||
Sbjct 1854 TAACCCCTGTCTGATGCACCTACGTTATAGCTGTATTCCGACCCTAGAAAGGTGATCATACT 1913

Query 280 ACATGTATGTACTTCTTACAGTTGAATTGTACCAAGAGAACCCTAATGGAACGTCATATGT 339
          |||
Sbjct 1914 ACATGTATGTACTTCTTACAGTTGAATTGTACCAAGAGAACCCTAATGGAACGTCATATGT 1973

Query 340 TGTATTCTAGGATGTCTTGGCGATCATTAGTTTCTTTGGCTCAGTCTCGAGGTTATATA 399
          |||
Sbjct 1974 TGTATTCTAGGATGTCTTGGCGATCATTAGTTTCTTTGGCTCAGTCTCGAGGTTATATA 2033

Query 400 TAAAGATAAAGGACATCTTATTCCAAGGGATACGTTTACTTGGTT 444
          |||
Sbjct 2034 TAAAGATAAAGGACATCTTATTCCAAGGGATACGTTTACTTGGTT 2078

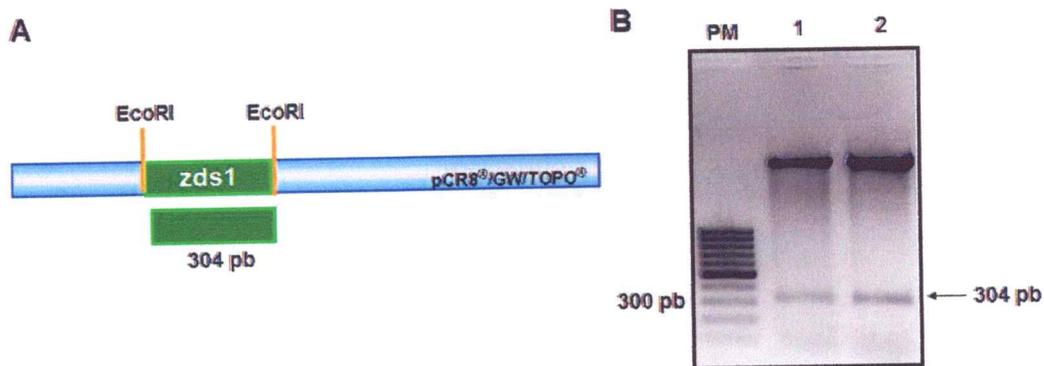
```

Figura 9. Alineamiento (BLAST) entre la secuencia de la construcción pTOPO/zds1 y la base de datos.

### 3.1.2 Análisis de la construcción pCR8/zds1.

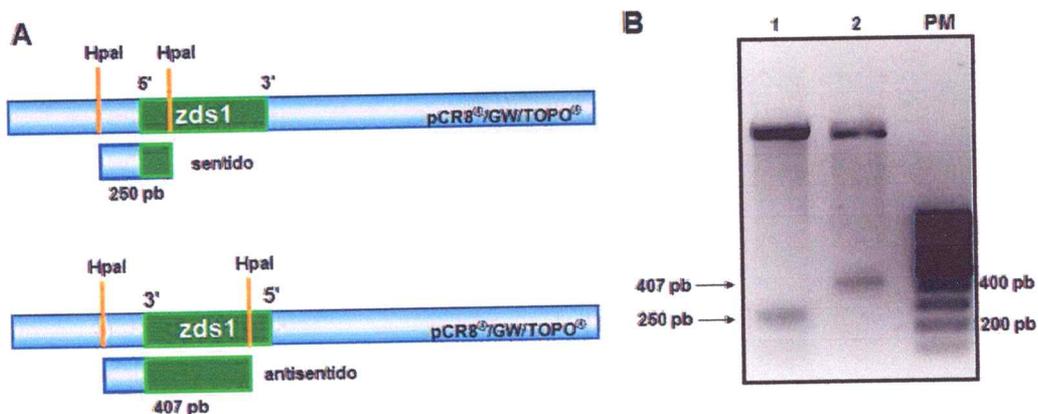
El ADN plasmidial de los clones crecidos en espectinomina fue extraído mediante kit (sección 2.2.4.1) y digerido con enzimas de restricción.

El primer análisis se hizo para verificar que existe un fragmento clonado en el vector pCR8. Para esto se digirió el clon 4 y 5 con la enzima *EcoRI* (sección 2.2.5) que posee sitios de corte flanqueando la zona de clonamiento en el vector. Como se observa en la Figura 10, al digerir con *EcoRI* se obtiene la liberación de una banda del tamaño esperado de 304pb. La diferencia de tamaño entre el fragmento amplificado inicialmente de 295pb con este el esperado de 304pb se debe a que el corte con la enzima *EcoRI* no flanquea exactamente al inserto y por lo tanto agrega 9 bases nitrogenadas al fragmento.



**Figura 10. Digestión de pCR8/zds1 con *EcoRI*:** A) Esquema de la digestión en donde se representa el fragmento liberado de 304pb. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% con Bret. El carril 1 muestra la digestión del ADN del clon 4 y el carril 2 la digestión del clon 5. Ambas digestiones muestran la liberación de una banda de aproximadamente 300pb. El carril PM es el estándar de peso molecular.

Para determinar si alguno de los clones posee la construcción con el fragmento en la orientación antisentido deseada, se digirió con la enzima *HpaI* (sección 2.2.5). Esta digestión liberó un fragmento de 250pb en el clon 4 indicando su orientación sentido respecto a los sitios de recombinación attL y 407pb en el clon 5 indicando su orientación antisentido respecto a los sitios de recombinación attL, lo que indica que este último es el clon de interés (Figura 11).

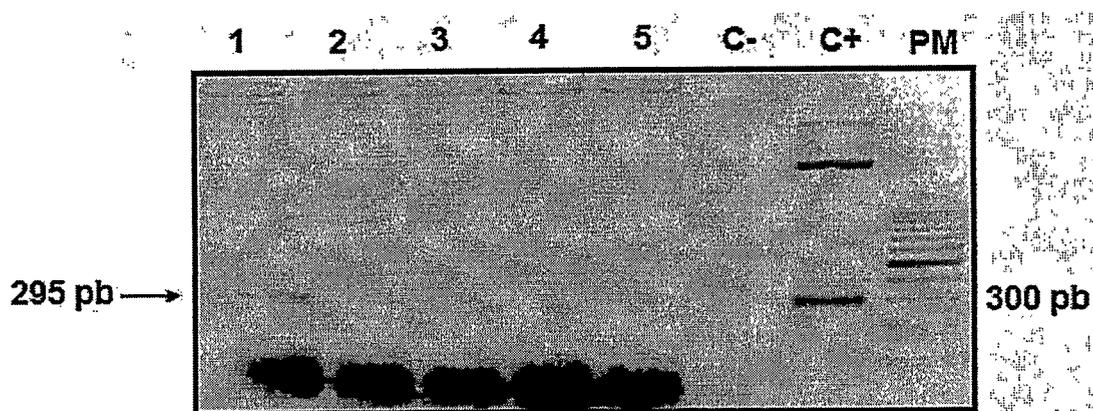


**Figura 11. Digestión de pCR8/zds1 con *HpaI*:** A) Esquema de la digestión en donde se representa el fragmento liberado dependiendo de la orientación de la secuencia clonada. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% con BrEt. El carril 1 muestra la digestión del ADN del clon 4 en que se libera una banda de 250pb y el carril 2 muestra una banda de 400pb aprox. producto de la digestión del ADN del clon 5. PM: Se usó un estándar de peso molecular.

### 3.1.3 Análisis de la construcción pMDC/zds1.

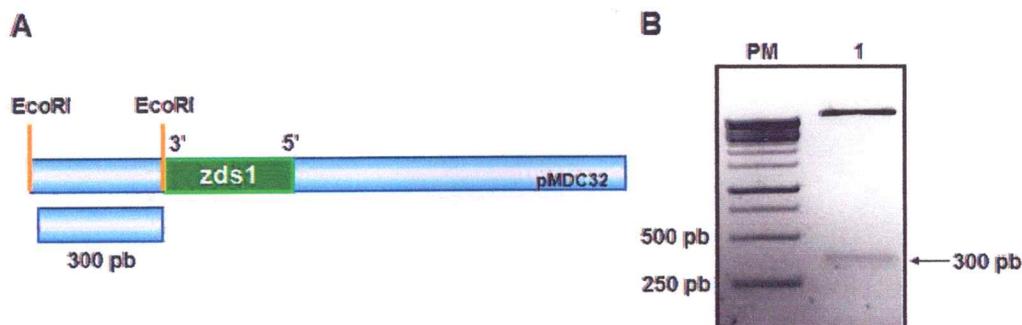
Una vez confirmada la construcción pCR8/zds1 por digestión, se realizó la recombinación con el vector pMDC (sección 2.3.2.3). Se transformó *E. coli* y los clones se seleccionaron en medio LB con kanamicina (sección 2.4.8).

De los clones crecidos, se realizó un PCR colonia con los partidores para el fragmento de zds1 y encontrar así los clones que poseen la construcción pMDC/zds1. La Figura 12 muestra que existe una única amplificación del tamaño esperado de 295pb para el carril 1, que corresponde al clon 1.



**Figura 12. PCR en colonia de *E. coli* transformadas con pMDC/zds1:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se analizaron 5 clones (1-5) a los que se realizó un PCR con los partidores zds1 GATE. Como control negativo (C-) se utilizó agua en vez de ADN como molde. Como control positivo (C+) se usó el ADN plasmidial pCR8/zds1. En el carril PM se usó un estándar de peso molecular.

Posteriormente, la presencia de la construcción pMDC/zds1 en el clon 1 fue confirmada mediante digestión enzimática con la enzima *EcoRI* (sección 2.2.5). El partidor "Antisentido zds1 GATE" posee un sitio de corte para *EcoRI* en su extremo 3', por lo tanto, en el caso que el fragmento no se encontrara clonado, sólo se linealizaría el vector. En el caso que el fragmento se hubiese encontrado en la orientación deseada, antisentido, la digestión con esta enzima generaría la liberación de un fragmento de 300pb. Este es el caso y la banda de dicho tamaño se observa en la Figura 13.

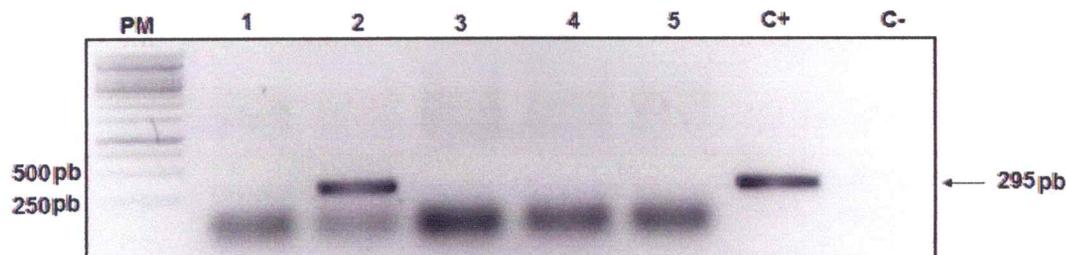


**Figura 13. Digestión de ADN del clon 1 con *EcoRI*:** A) Esquema de la digestión en donde se representa el fragmento liberado de 300pb. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. El carril 1 muestra la digestión del ADN plasmidial del clon 1 en que se libera una banda de 300pb. PM: Estándar de peso molecular.

### 3.1.4 Evaluación de la funcionalidad de la construcción pMDC/zds1.

Si bien los análisis de PCR y digestión, muestran que la construcción pMDC/zds1 estaba correctamente construida, para comprobar si ésta es funcional, es decir, si se transcribe, se realizó un RT-PCR a partir de hojas de tabaco agroinfiltradas con pMDC/zds1.

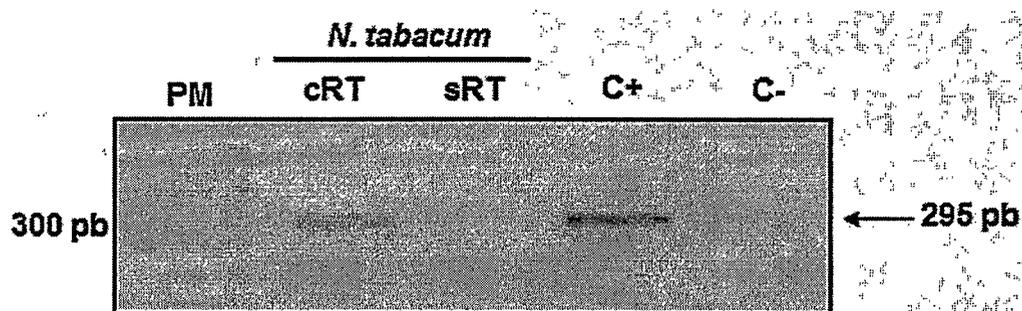
Para lograr este objetivo se transformó el *Agrobacterium* con ADN plasmidial del vector pMDC/zds1 como se describe en los métodos (sección 2.4.9). A los clones del *Agrobacterium* crecidos en el medio de selección, se les realizó un PCR en colonia con los partidores "zds1 GATE" (sección 2.2.3). En la Figura 14 se aprecia que el clon 2 de *A. tumefaciens*, amplifica una banda del tamaño esperado de 295pb, que coincide con la banda del fragmento de zds1. Por lo tanto el clon 2 de *Agrobacterium* es el que se utilizó para agroinfiltrar las hojas de tabaco.



**Figura 14. PCR colonia de *A. tumefaciens* transformadas con las construcción pMDC/zds1.** Se amplificó el fragmento clonado del gen zds1 para 5 colonias (1-5). Como control positivo (C+) se usó ADN plasmidial pMDC/zds1 como molde y para el control negativo (C-) agua en lugar de ADN. PM: Estándar de peso molecular.

Luego de la agroinfiltración, se mantuvieron las plantas aisladas por 4 días en el invernadero. Posteriormente se extrajo el RNA de la zona infiltrada (sección 2.2.1) y se procedió a realizar RT-PCR (sección 2.2.2). En la Figura 15 se observa el resultado del RT-PCR para el fragmento de interés del gen *zds1*. En las hojas agroinfiltradas con la construcción pMDC/*zds1* se obtuvo una banda del tamaño esperado de 295pb, al igual que en el control positivo. Los partidores de *zds1* usados en el RT-PCR no hibridan con *zds* ni otro gen endógeno en tabaco, con lo cual podemos asegurar que *zds1* se está transcribiendo desde la construcción pMDC/*zds1*.

Por lo tanto tenemos la construcción pMDC/*zds1* que es capaz de expresar un fragmento del gen *zds1* de *D. carota*, el cual será utilizado en trabajos futuros para silenciar de manera específica el gen *zds1* en esta especie.



**Figura 15. Amplificación de la región 3'NTR del gen *zds1* a partir ADNc de tabaco agroinfiltrado con la construcción pMDC/*zds1*. cRT: Transcripción reversa con transcriptasa reversa. sRT: Transcripción reversa sin transcriptasa reversa. C+: Control positivo usando ADN plasmidial pMDC/z1 como templado. C-: Control negativo usando agua en vez de ADN. PM: Estándar de peso molecular.**

### 3.2 Construcción del vector pHellsgate/zds2 y análisis de su funcionalidad.

#### 3.2.1 Amplificación de la región 3' NTR del gen zds2 y su clonación en el vector de entrada.

Como se observa en el carril 1 de la Figura 16, al realizar el PCR con los partidores "zds2 GATE" (tabla III, sección 2.3.2.1) a partir de ADNc de *D. carota*, se obtuvo la amplificación de una banda única del tamaño esperado de 271pb.

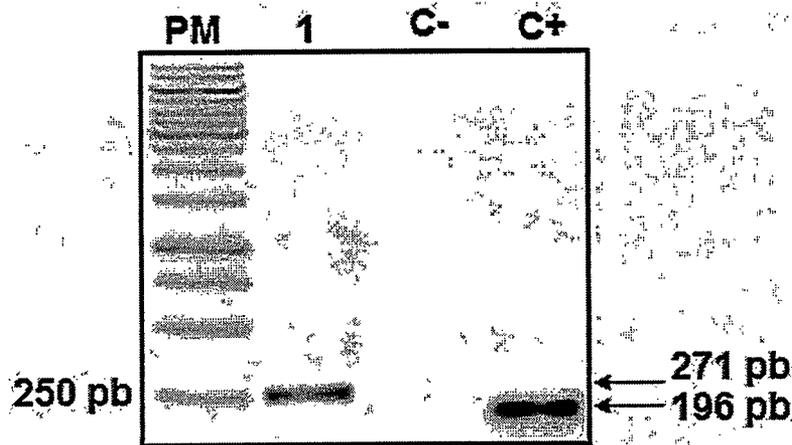


Figura 16. Amplificación de la región 3'NTR del gen zds2 a partir del ADNc de la zanahoria. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. 1) Se usó como templado ADNc de zanahoria silvestre. C-) Control negativo: Se utilizó agua en vez de ADN como templado. C+) Control positivo. Se amplificó un fragmento del gen de la subunidad 18S de ARN ribosomal. PM) Estándar de peso molecular.

Este fragmento amplificado, se clonó en el vector pTOPO (sección 2.3.2.2), se transformó *E. coli* y se seleccionaron los clones en medio LB con kanamicina (sección 2.4.8).

#### 3.2.2 Análisis molecular de la construcción pTOPO/zds2.

Se extrajo el ADN de los clones crecidos en kanamicina y se realizó la búsqueda de los clones positivos primero por PCR en colonia (sección 2.2.3) con los partidores "zds2 GATE" y luego por digestión enzimática (sección 2.2.5).

Como se observa en la Figura 17, de los 7 clones analizados, la banda del tamaño esperado de 271pb solo se obtuvo en el clon 33 y en el control positivo. Esto indica que el clon 33 está efectivamente transformado con la construcción pTOPO/zds2.

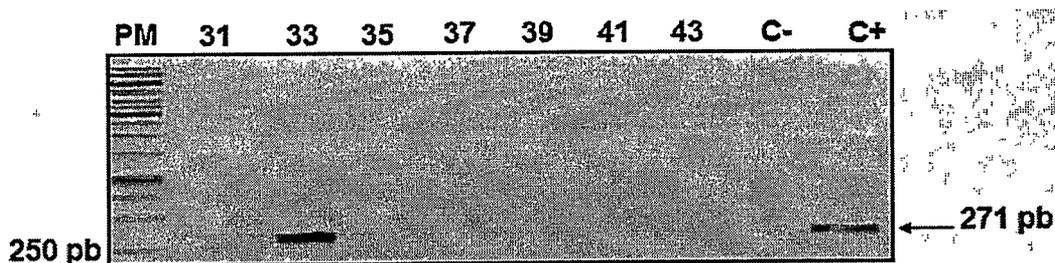
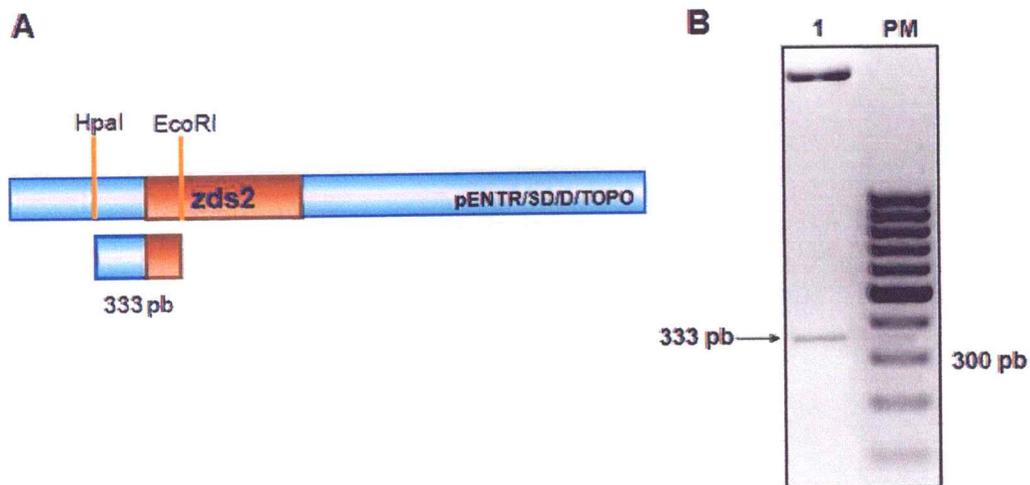


Figura 17. PCR colonia de *E. coli* transformadas con pTOPO/zds2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. Análisis de los clones 31 al 43. C-): Como control negativo se utilizó agua en vez de ADN como molde. C+) Como control positivo se usó una alícuota de ADNc. PM) Estándar de peso molecular.

La siguiente comprobación de que el fragmento del gen *zds2* estuviera clonado en el vector de entrada, se hizo mediante digestión enzimática. Se realizó una digestión doble con las enzimas *EcoRI* y *HpaI* a partir del ADN plasmidial del clon 33 (sección 2.2.5). La Figura 18A, muestra un esquema en donde se representa el sitio de corte de *HpaI* en el vector (nucleótido 502) y el sitio de corte *EcoRI* en el fragmento clonado del gen *zds2* (nucleótido 133). La Figura 18B, muestra el resultado de la digestión, en donde se aprecia un fragmento del tamaño esperado de 333pb.

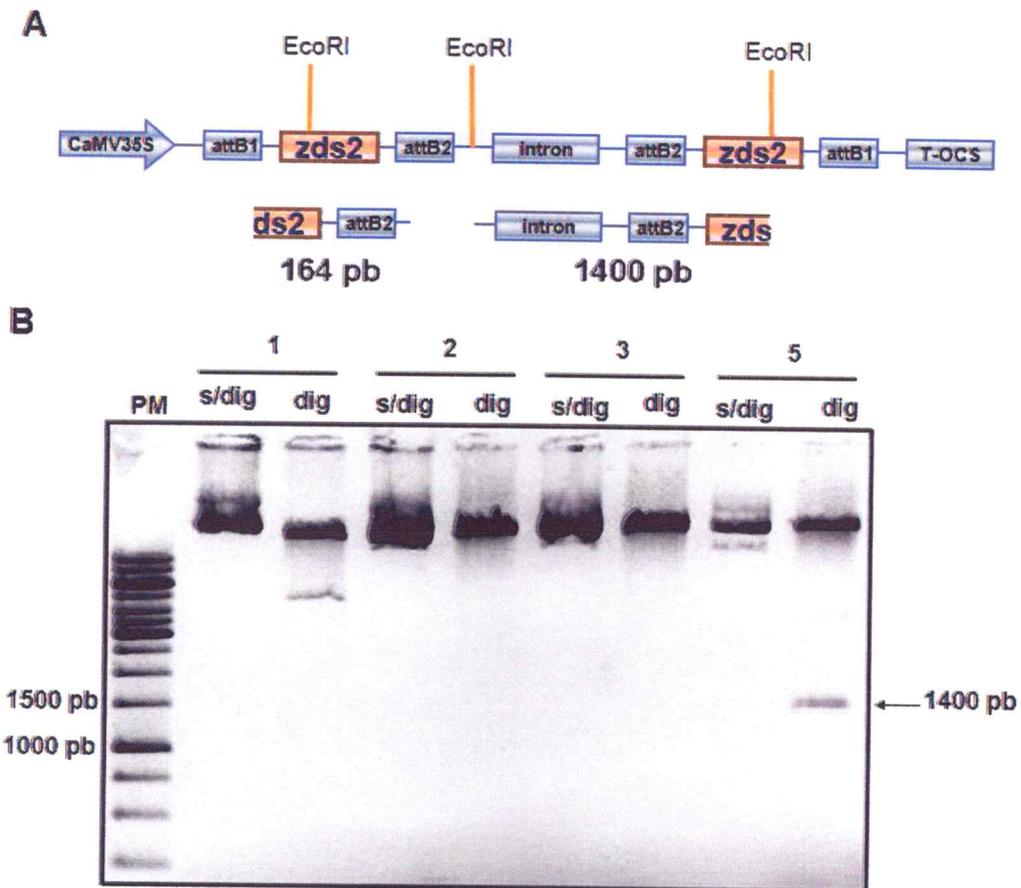
En base a estos resultados, se utilizó la construcción del clon 33 para realizar la recombinación entre pTOPO/zds2 y pHellsgate12 (sección 2.3.2.3). Luego se transformó *E. coli*, las cuales fueron crecidas en medio LB sólido con espectinomicina (sección 2.4.8).



**Figura 18. Digestión enzimática doble con *EcoRI* y *HpaI* de la construcción pTOPO/zds2: A)** Esquema de la digestión doble, fragmento esperado 333pb. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. 1: ADN plasmidial del clon 33. PM: Estándar de peso molecular.

### 3.2.3 Análisis molecular de la construcción pHellsgate/zds2

Para comprobar la correcta recombinación del fragmento en el vector pHellsgate, se extrajo el ADN plasmidial de las colonias que crecieron en el medio LB suplementado con espectinomomicina y se realizó una digestión con la enzima *EcoRI* (sección 2.2.5). En la Figura 19A se muestra un esquema en que se representan los sitios de corte de la enzima *EcoRI*. La construcción presenta un sitio en el vector y otro en el fragmento del gen *zds2* clonado, que por estar dos veces (sentido y antisentido) genera tres sitios de corte en total. Se muestran los fragmentos esperados de 164 y 1400pb. En la Figura 19B, se muestra que el clon 5 es el único que libera un fragmento de aproximadamente 1400pb, lo que indica que este clon contiene la construcción esperada. El fragmento de 184pb es demasiado pequeño para detectarlo en este gel.



**Figura 19. Digestión enzimática con *EcoRI* de la construcción pHellsgate/zds2.** **A:** Esquema de la digestión y fragmentos esperados **B:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se realizó la digestión de los 4 clones (1 al 5). Para cada uno se cargó el ADN plasmidial sin digerir (s/dig) y digerido con *EcoRI* (dig). **PM:** Marcador de peso molecular de 1 kb.

La confirmación definitiva de la construcción se realizó mediante secuenciación del ADN plasmidial del clon 5 (sección 2.3.3). La Figura 20 muestra el alineamiento de la secuencia obtenida contra la base de datos (NCBI). En el alineamiento existen 267 identidades de 268 nucleótidos lo que corresponde a un 99% de identidad nucleotídica con la secuencia del ADNc de *zds2* de *D. carota* sp sativus (Nº DQ192189). La mutación se observa por el cambio de una guanosina en vez de una citosina. Aunque solo se muestra una secuencia, efectivamente se realizó la secuenciación de los dos fragmentos clonados y se determinó que los fragmentos se encontraban en la orientación deseada, sentido y antisentido de uno respecto al otro (información no mostrada).

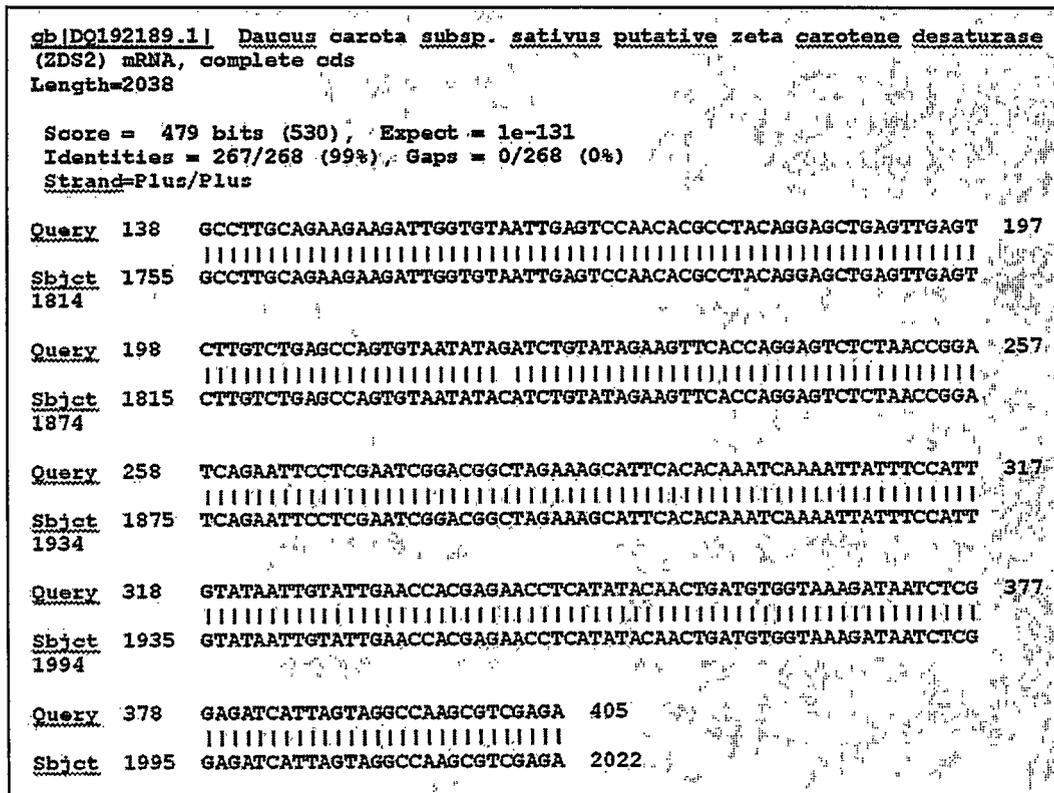


Figura 20. Alineamiento (BLAST) entre la secuencia de la construcción pHellsgate12/zds2 y la base de datos.

Una vez confirmada esta construcción, se procedió a transformar *A. tumefaciens* (sección 2.4.9) para realizar el análisis de funcionalidad.

### 3.2.4 Evaluación de la funcionalidad de la construcción pHellsgate/zds2.

Si bien la secuenciación muestra que la construcción pHellsgate/zds2 estaba correctamente construida, al igual que el caso para la construcción con zds1, es necesario comprobar que esta construcción es funcional, por lo que se realizó un RT-PCR (sección 2.2.2) de las hojas de tabaco agroinfiltradas con pHellsgate/zds2 (sección 2.4.10).

Para ello, se transformó *A. tumefaciens* con pHellsgate/zds2 (sección 2.4.9) y, se realizó un PCR en colonia de éstos con los partidores para el fragmento del gen zds2 (sección 2.3.3). Como se observa en la Figura 21, los 6 clones probados amplifican una banda del tamaño esperado de 271pb, lo que indica que todos poseen la construcción pHellsgate/zds2.

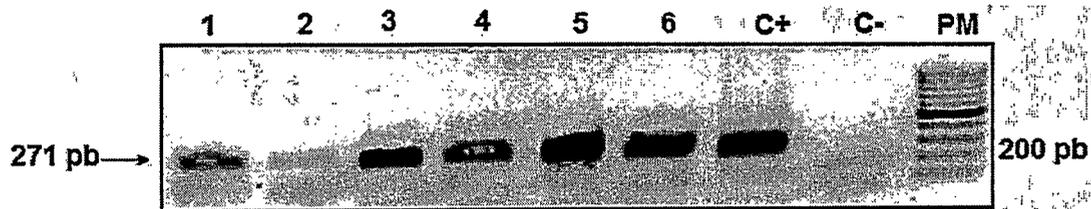


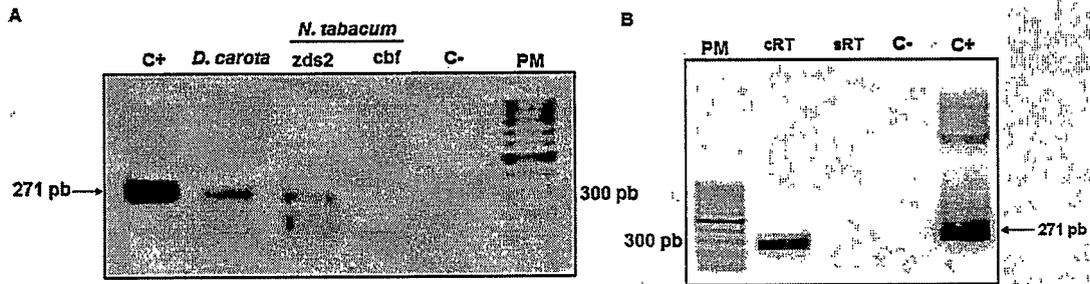
Figura 21. PCR colonia de *A. tumefaciens* transformadas con las construcción pHellsgate/zds2. Se amplificó el fragmento clonado del gen zds2 para 6 colonias (1-6). C+: control positivo para lo cual se usó ADN plasmidial como molde. C-: control negativo en el cual se usó agua en lugar de ADN. PM: Estándar de peso molecular.

Se seleccionó la colonia 5 de *Agrobacterium* transformada con pHellsgate/zds2 y se preparó para la agroinfiltración de las hojas de tabaco (sección 2.4.10).

Las plantas fueron mantenidas en el invernadero por 4 días hasta su análisis molecular mediante RT-PCR. En el análisis de RT-PCR se espera detectar los ARN mensajeros del gen zds2 de zanahoria transcritos desde el ADN transferido por *A. tumefaciens*. Estos ARN mensajeros provienen tanto de las construcciones que se encuentran transitoriamente en el núcleo de la célula vegetal, como de las construcciones que se hayan integrado establemente en el genoma del tabaco. De cualquier manera, este es un ensayo de expresión transitorio, debido a que no se genera una planta a partir de éstas células infectadas. En la Figura 22A y 22B, se muestra el resultado del RT-PCR para el fragmento de zds2 en tabaco agroinfiltrado. Se observa la banda del tamaño esperado de 271pb solo en el caso del tejido de tabaco agroinfiltrado con nuestra construcción (pHellsgate/zds2) (Figura 22A: *N. tabacum* zds2 y 22B: cRT). Como control positivo se amplificó el fragmento a partir de ADNc de la zanahoria silvestre. Como control negativo se usó tejido agroinfiltrado con una construcción que porta un gen para el factor de transcripción CBF3 de respuesta a la deshidratación y no se detectó amplificado al usar partidores para zds2 (Figura 22A). Este resultado indica que los partidores son específicos y no amplifican en tabaco infiltrado con otra construcción y que nuestra construcción pHellsgate/zds2 está siendo transcrita en tabaco.

En la Figura 22B se muestran los controles para la transcripción reversa. Mediante la amplificación en ausencia de transcriptasa reversa (sRT) se comprueba que el fragmento de

*zds2* amplificado proviene de la transcripción del fragmento desde la construcción pHellsgate/*zds2*. Tanto en la Figura 22A, como 22B, la banda del C+ es más intensa. Esto se debe a que se utilizó ADN plasmidial pHellsgate/*zds2* purificado mediante kit comercial, lo que hace el PCR más eficiente.



**Figura 22. Amplificación del fragmento del gen *zds2* en hojas de tabaco agroinfiltradas con la construcción pHellsgate/*zds2*.** A) *N. tabacum zds2*: El ADNc del tabaco agroinfiltrado con pHellsgate/*zds2*. *N. tabacum cbf*: ADNc de tabaco agroinfiltrado con una construcción que porta el gen *cbf3* C+: ADN plasmidial de pHellsgate/*zds2* como templado. *D. carota*: control positivo usando ADNc de zanahoria silvestre. C-: agua en vez de ADN como molde B) Se muestran los controles de transcripción reversa. cRT: Transcripción reversa con transcriptasa reversa. sRT: Transcripción reversa sin transcriptasa reversa. C+: ADN plasmidial de pHellsgate/*zds2* plasmidial como templado. C-: Agua como templado. PM: Tanto en A como en B se usó el estándar de peso molecular.

Este resultado indica que la construcción pHellsgate/*zds2* es funcional y se está transcribiendo, por lo tanto, se utilizó esta construcción para transformar zanahorias de manera estable (sección 2.4.11).

### **3.3 Generación de plantas transgénicas de *D. carota* que poseen la construcción de silenciamiento pHellsgate/*zds2*.**

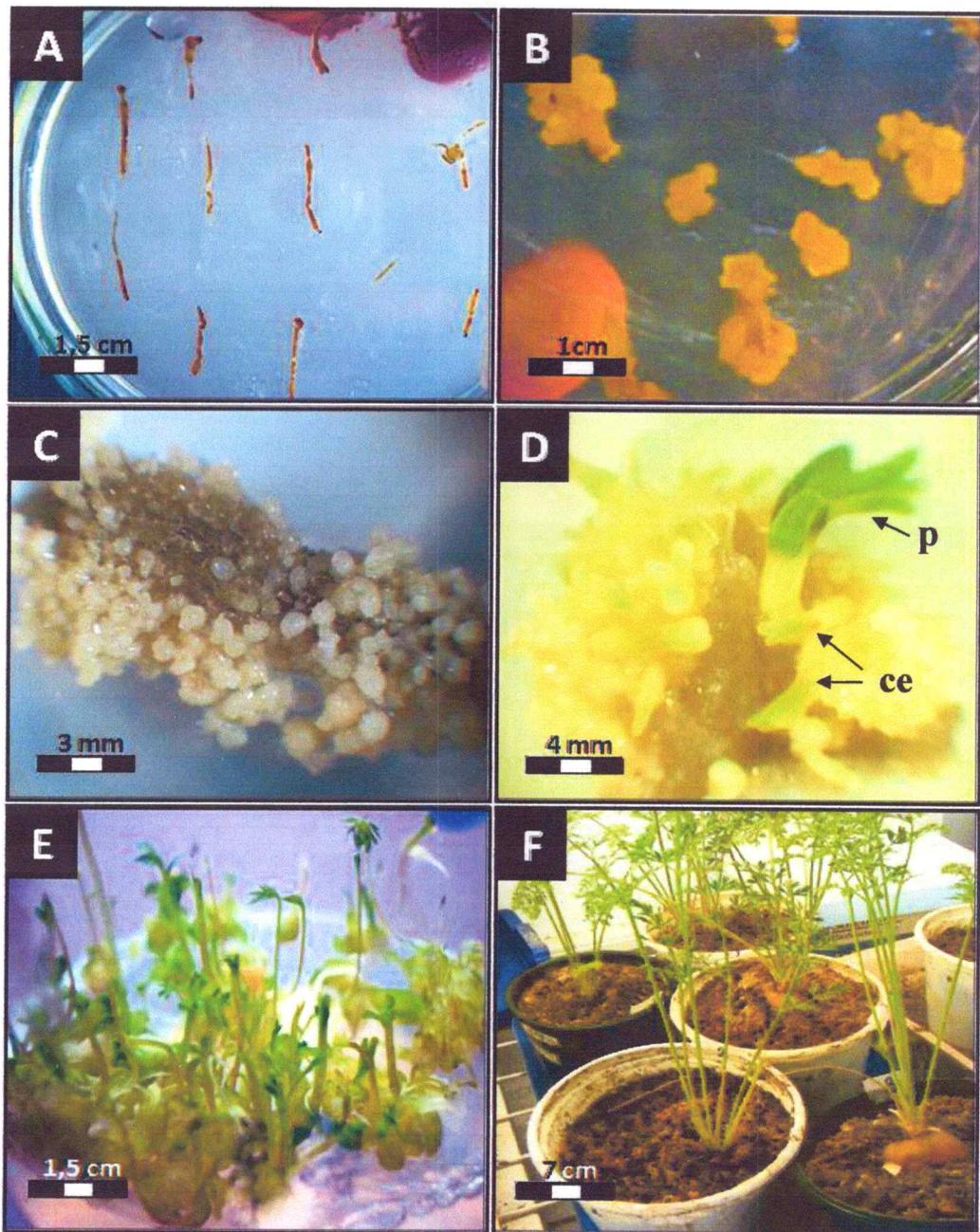
#### **3.3.1 Transformación estable de *D. carota*.**

Con la construcción pHellsgate/*zds2* previamente evaluada, se transformaron los explantes de zanahoria y se sometieron al proceso de embriogénesis somática (sección 2.4.5). La Figura 23 muestra los explantes en los diferentes estadios del procedimiento. En la Figura 23A se presentan los explantes de epicotilos de zanahoria recién transformados con *A. tumefaciens* pHellsgate/*zds2*. En la Figura 23B se aprecia el engrosamiento del diámetro de los explantes,

lo que refleja la acción de *Agrobacterium* y de la hormona 2,4 D inductora de la embriogénesis. En el detalle de la Figura 23C se observa la generación de los embriones en estado globular sobre el explante inicial obtenido a las 8 semanas del cultivo. En la Figura 23D se muestra un explante en el medio 3, correspondiente aproximadamente a 15 semanas de cultivo, donde ya se aprecia la maduración de los embriones, observando los cotiledones elongados (ce) y la formación de plántulas fotosintéticamente activas (p). Estos explantes se pasaron a frascos con MS sin hormona para favorecer el enraizamiento (Figura 23E) y luego de la etapa de aclimatación se pasaron a la tierra (sección 2.4.4) para finalmente mantenerlas en condiciones normales de cultivo en el invernadero con un fotoperiodo de 16 hrs luz/8 hr oscuridad a 23°C (Figura 23F). Mediante este procedimiento se obtuvieron 80 líneas transformantes, de las cuales 50 fueron pasadas a la tierra. Sin embargo, solo la mitad sobrevivió a la etapa de aclimatación.

### **3.3.2 Análisis molecular de las líneas transgénicas de *D. carota* con la construcción pHellsgate/zds2.**

Para confirmar la inserción de la construcción para el PTGS de *zds2* en las plantas transformadas con pHellsgate/*zds2*, se extrajo el ADN de las hojas de las zanahorias obtenidas a partir de la embriogénesis (sección 2.4.5). Este ADN se usó como molde para realizar un PCR con partidores para el promotor CaMV 35S, el cual dirige la expresión de la construcción pHellsgate/*zds2* en la planta. Como muestra la Figura 24, se obtuvo una banda del tamaño esperado de 401pb en las 9 líneas analizadas. De este modo concluimos que estas plantas regeneradas son transgénicas para la construcción del silenciamiento génico de *zds2* ya que amplifica el fragmento del promotor que dirige la expresión de esta construcción (Figura 6, pHellgate12).



**Figura 23. Embriogénesis somática de *D. carota* transformadas con pHellsgate/zds2.** A) Explantes transformados de zanahoria depositados en medio I. B) Explantes de zanahoria de 9 semanas después de la transformación inducidos en el medio II. C) Detalle de una explante de 2 meses en condiciones de medio III. Se observan los embriones en estado globular D) Detalle de un explante de 3 -4 meses en medio III. Se observa la maduración de los embriones generándose plántulas de zanahoria E) Plántulas de 4-5 meses crecidas en frasco para su enraizamiento en ausencia de hormonas. F) Planta de 8 meses cultivada en tierra en invernadero.



Figura 24. PCR del promotor CaMV 35S a partir de ADN genómico de plantas de *D. carota* transformadas con la construcción pHellsgate/zds2. Se analizaron 8 líneas transformadas de *D. carota*. C-) Se utilizó agua en vez de ADN. C+) Se utilizó ADN plasmidial de pHellsgate/zds2. PM) Estándar de peso molecular.

#### 4. DISCUSIONES Y PROYECCIONES

Este seminario de título se enmarca dentro del estudio de la función de los genes *zds1* y *zds2* en *D. carota*. Para esto, se desarrollaron herramientas moleculares y celulares con el fin de gatillar el silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT) de los genes *zds1* y *zds2* en las zanahorias transformadas establemente.

Para la construcción de los vectores binarios se utilizó la metodología Gateway®, esta tecnología se describe en la literatura como rápida y eficiente comparada con las técnicas tradicionales de digestión clonamiento que involucran con enzimas de restricción y ligación con ligasa T4 (Waterhouse y Helliwell, 2003). Por ello, en este trabajo se utilizó esta estrategia obteniendo la construcción pMDC/*zds1* y pHellsgate/*zds2*. En un comienzo se intentó obtener pHellsgate/*zds1*, sin embargo, no fue posible probablemente debido a mutaciones detectadas en los sitios de recombinación en el vector pTOPO. Por este motivo, tuvimos que optar por el vector de destinación pMDC32 que posee el promotor CaMV 35S doble (Figura 6). La utilización de un promotor doble para inducir SGPT también ha sido realizada de manera exitosa en el laboratorio durante el seminario de título de L. Pizarro (2008), por lo cual también esperamos, con nuestras construcciones, obtener diferentes grados de silenciamiento del gen *zds1* en *D. carota*.

Un factor que resulta decisivo al obtener y analizar las colonias, es contar con una cepa de *E. coli* que sea sensible al gen *ccdb* que portan los vectores de destinación del sistema Gateway®. El gen *ccdb* codifica para la proteína CcdB que impide la acción de la ADN girasa (Bahassi *et al*, 1999). De este modo, si no existe recombinación, estos genes no se escinden del vector y la colonia no crece. En el caso de la construcción pHellsgate/*zds2* no realizamos el procedimiento con dicha cepa de *E. coli* por lo que se analizaron alrededor de 40 clones para obtener solo uno positivo. En cambio, al utilizar el vector pMDC32, sí se contó con una cepa sensible al gen *ccdb* y aunque el número de colonias obtenidas en la placa fue bajo (10 aprox.), de las 5 colonias analizadas, una poseía la construcción deseada del producto de la recombinación. Por ello, la tasa de recombinación fue de un 20% usando cepas de *E. coli*

sensibles a CcdB respecto al 2,5% obtenido de cepas de *E. coli* resistentes a CcdB. Esta baja eficiencia en la recombinación, se puede atribuir a que la metodología Gateway® requiere que la secuencia de los sitios de recombinación (attL y attR) debe permanecer inalterable y por lo tanto cualquier mutación en algún paso de la amplificación afecta de manera drástica la obtención de las construcciones.

Con respecto a la determinación del fragmento empleado para gatillar el silenciamiento, éste se escogió con el objetivo de generar un silenciamiento específico para el gen *zds1* respecto del gen *zds2* de *D. carota*, y viceversa. Dado que la identidad nucleotídica es menor en las regiones NTR, en este caso de un 50% aprox., se amplificó un fragmento de 295pb de la región 3' NTR del gen *zds1* y un fragmento de 271pb de la región 3' NTR del gen *zds2*. La región 5' posee una menor identidad nucleotídica ente ambos genes (24%), pero el tamaño es inferior a 200pb, por lo que se desechó utilizar esta región como blanco del silenciamiento. A pesar de que se ha reportado que el SGPT puede ser gatillado incluso con secuencias de 23 nucleótidos, también se ha descrito que secuencias de mayor longitud aumentan la eficiencia del silenciamiento (Thomas *et al*, 2001). Esto, sumado al hecho de que en la mayoría de los trabajos se utilizan fragmentos entre los 200 pb y 800 pb (Wesley *et al*, 2001; Ronnen *et al* 2000), se descartó utilizar los tamaños inferiores a los 200pb. Finalmente, el BLAST de los partidores contra la base de datos disponible a través del NCBI indica que los partidores efectivamente son específicos para cada gen (información no mostrada).

La estrategia inicial (gatillar el silenciamiento mediante la transcripción de la horquilla de ARN) consideraba clonar los fragmentos del gen *zds1* y del gen *zds2* en el vector pTOPO y posteriormente en pHellsgate12. Sin embargo, en el caso del gen *zds1* se cambió a la estrategia de sobre-expresión del fragmento en antisentido, dado que no se logró obtener una recombinación exitosa entre construcción pTOPO/*zds1* y el vector pHellsgate. Para esta estrategia alternativa, se utilizó como vector de entrada el pCR8 y como vector de destinación el pMDC. Este es el motivo por el cual existe la construcción pTOPO/*zds1*, pero no se utiliza para recombinar, sino que sólo para amplificar el fragmento *zds1* y clonarlo en pCR8.

La secuenciación de la construcción pTOPO/zds1 (Figura 9), permite confirmar la amplificación de un fragmento específico del gen zds1 (DQ 222430) de *D. carota*.

La secuenciación de los dos fragmentos de zds2 clonados en pHellsgate/zds2 a partir del clon 5 (Figura 20), nos permitió confirmar que se amplificó un fragmento específico del gen zds2 y además que uno de los fragmentos se encontraban en orientación sentido y el otro en antisentido de modo que al transcribirse se forme la horquilla de ARN. Ambas secuencias, sentido y antisentido) presentan el cambio de "C" por "G" (Figura 20), cambio que puede tener dos motivos. El primero, es que se deba a un error de la polimerasa en la amplificación inicial del fragmento, ya que la mutación existe en la secuencia clonada en el vector de entrada pTOPO previo a la recombinación (datos no mostrados) y, la otra alternativa sugiere que sea un cambio a nivel genético de la variedad Nantes, de la cual se realizó la amplificación, respecto a la variedad sativus de la cual se tiene la información en la base de datos de NCBI. Se espera que la mutación en esta base no impida gatillar el SGPT ya que, a pesar de esto, la identidad nucleotídica entre ésta secuencia y la endógena sigue siendo muy alta (99%).

Respecto al análisis funcional mediante agro-infiltración en las hojas de *Nicotiana tabacum* (tabaco) de las construcciones pHellsgate/zds2 y pMDC/zds1, podemos asegurar que la amplificación de una banda del tamaño esperado en los distintos RT-PCR (Figuras 15 y 22), al usar como molde ADNc de las hojas de tabaco, se debe exclusivamente a los transcritos de las construcciones de interés y no al gen zds endógeno del tabaco. Esta conclusión se basa en que los partidores tanto del gen zds1 como del gen zds2, se diseñaron para la región 3' NTR de zanahoria y no presentan identidad nucleotídica con ningún gen de tabaco y, por lo tanto éstos son específicos para zanahoria y no para tabaco. Esto también se demostró en la Figura 22A (*N. tabacum* -cbf), en donde se infiltró tabaco con *A. tumefaciens* transformado con un gen control (cbf) y se realizó el RT-PCR para zds1, indicando la especificidad de los partidores. El control sin la enzima transcriptasa reversa "sRT" (Figura 15 y Figura 22B), es necesario para asegurar que la amplificación es producto del ARNm y no de ADN remanente luego de la extracción de ARN y tratamiento con DNasa (sección 2.2.2).

Las construcciones obtenidas fueron funcionales en tabaco, lo cual posiciona a la metodología de clonamiento Gateway® como eficiente desde ese punto de vista. Esto sumado al hecho que el promotor CaMV 35S se ha reportado como funcional en zanahoria (Wally *et al*, 2008), nos hace suponer que las construcciones permitirán inducir el silenciamiento génico en *D. carota*.

Con respecto a la transformación estable y embriogénesis somática de *D. carota*, los explantes (epicotilos) de zanahoria sometidos a este procedimiento, previamente estandarizado en el laboratorio, generaron una gran cantidad de plantas. En este caso, de un explante (1,5 cm), se obtuvieron aproximadamente 50 plántulas hasta la etapa de maduración (Figura 23E), obteniendo un total de 100 plántulas viables de las cuales 50 aproximadamente fueron pasadas a tierra. Luego de la aclimatación, se lograron establecer en tierra aproximadamente 25 líneas transformantes, lo que convierte el paso de la aclimatación en una etapa clave y de alta vulnerabilidad de las plantas. Debido a que los explantes responden favorablemente al régimen de la embriogénesis, esta metodología será usada para inducir embriones a partir de las líneas transgénicas adultas para pHellsgate/zds2 y obtener así plantas genéticamente iguales (clones), de manera de mantener la línea transgénica en el tiempo.

La estrategia utilizada en este trabajo para generar zanahorias transgénicas, es un procedimiento que puede ser dividido en dos ámbitos. Por una parte se encuentra la infección del tejido vegetal por *A. tumefaciens* y por otro lado, que el tejido vegetal infectado sea capaz de inducir embriones y lograr la generación de plántulas. Por lo tanto, para analizar la eficiencia de la transformación es importante considerar estos dos aspectos. De 80 explantes transformados con *A. tumefaciens*, 2 lograron finalizar exitosamente el proceso de embriogénesis (2/80), lo que corresponde a un 2.5% de eficiencia en el proceso de embriogénesis. El porcentaje obtenido está levemente por sobre el promedio reportado previamente para la transformación de zanahorias mediante *Agrobacterium*, que corresponde a un 2.2% (Chen y Punja, 2002). Si bien esta cifra puede parecer mezquina, el procedimiento mejora su eficiencia considerando que de cada uno de estos explantes se originaron aproximadamente 50 plántulas. De éstas plántulas aproximadamente la mitad sobrevivió a la

aclimatación y, de las 25 plantas aclimatadas, se analizaron 9 molecularmente confirmando que todas poseen la inserción del CaMV 35S (Figura 24), lo que corresponde a un 100% de eficiencia en la infección. Esto posiciona a la transformación con *A. tumefaciens* un procedimiento eficiente y a la zanahoria en un modelo sustentable para la realización de los estudios que se tienen proyectados.

Para realizar los análisis, tanto de las plantas obtenidas en este seminario de título como de las plantas que se proyecta obtener en el futuro con el gen *zds1*, y las dobles silenciadas, es importante considerar los trabajos previos que reportan mutantes del gen *zds* (Rodrigo *et al*, 2003; Conti *et al*, 2004; Dong *et al*, 2007; Matthews *et al*, 2003 Bautista *et al*, 2005), de manera de optimizar la obtención e interpretación de los resultados. En general, mutaciones en el gen que codifica para la enzima ZDS, muestran anomalías en los procesos como la fotosíntesis, fotoprotección o respuesta al estrés, principalmente producto de una inadecuada composición y contenido de los carotenoides.

Dado que existe una gran identidad entre el gen *zds1* y *zds2*, una posibilidad es que al silenciar uno, el otro gen sea capaz de mantener la vía sin alteraciones, lo que estaría dando cuenta de una redundancia génica. Esto podría explicar el hecho que las plantas obtenidas a partir de la embriogénesis sean en primer lugar, viables y en segundo lugar, normales bajo una inspección visual de hojas y raíz modificada, lo cual se puede apreciar en las 25 líneas transgénicas pHellsgate/*zds2* obtenidas en este seminario de título. No obstante, para determinar si estas plantas poseen alguna alteración a nivel fisiológico y molecular, sobre todo en la ruta de síntesis de los carotenoides, se realizarán análisis del contenido y composición de carotenoides (HPLC en fase reversa), y del nivel de la acumulación de transcrito de los genes *zds1* y *zds2* (PCR semi-cuantitativo y en tiempo real), como también de otros genes involucrados en la ruta de síntesis de los carotenoides. El otro escenario, sería que efectivamente existan diferencias en la composición de los carotenoides y expresión de los genes carotenogénicos entre las plantas transgénicas y las plantas silvestres, lo que nos plantearía la existencia de cierta regulación diferencial entre ambos genes.

En un futuro se transformarán establemente plantas con la construcción pMDC/zds1 y además se realizará la obtención de líneas doble silenciadas transformando las plantas obtenidas de la transformación con pHellsgate/zds2 con la construcción pMDC/zds1. Mediante esta estrategia se pretende gatillar el silenciamiento de ambos genes, zds1 y zds2, a la vez y completar el estudio de la función de los genes zds1 y zds2 en la biosíntesis de los carotenoides en *D. carota*.

El desarrollo de las herramientas como las que se obtuvieron en este seminario de título, permitirán dilucidar la función de genes esenciales para la planta que por medio de otras metodologías como mutagénesis serían difíciles de determinar. La estrategia de silenciamiento génico post-transcripcional ya ha sido evaluada como una herramienta útil y eficiente en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio al silenciar el gen *lcyb* (Tesis de magíster de L. Pizarro, 2008). Es por ello que confiamos en que se podrán dar luces a resolver la importancia de estos dos genes que codifican para z-caroteno desaturasa (ZDS) en zanahoria. Este trabajo es una aproximación inicial para continuar con el estudio de la regulación de la biosíntesis de los carotenoides en *D. carota* y permitirá dirigir los estudios para encontrar puntos clave de la regulación, que en un futuro podrían ser la base para el estudio de la identificación y caracterización de los promotores órgano-específicos (hojas o raíz modificada) en esta especie.

## 5. CONCLUSIONES

En este seminario de título se desarrolló una plataforma que incluyó la obtención de herramientas moleculares y celulares para obtener plantas transgénicas de zanahorias que poseen una construcción para silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT).

- Se obtuvieron las construcciones pMDC32/zds1 y pHellsgate/zds2 funcionales, mediante la tecnología Gateway® que se espera, gatillen específicamente el SGPT del gen zds1 y zds2 de *D. carota*, respectivamente.
  
- Se logró realizar la transformación estable de la zanahoria mediante *A. tumefaciens* y la regeneración de las plantas transformadas a partir de epicotilos de *D. carota*, por embriogénesis somática. La eficiencia de la transformación fue de un 2.5% para la generación de los explantes inducidos y de un 100% para las plantas transgénicas obtenidas a partir de estos explantes.
  
- Finalmente, se comprobó la inserción de la construcción pHellsgate12/zds2 en el genoma de las plantas adultas de *D. carota* obtenidas, amplificando el promotor CaMV 35S que gobierna la transcripción de la horquilla de la construcción pHellsgate/zds2.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht M, Sandmann G** (1994) Light-stimulated carotenoid biosynthesis during transformation of maize etioplasts is regulated by increases activity of isopentenyl pyrophosphate isomerase. *Plant Physiol* 105: 529-534.
- Armstrong GA, Hearst JE** (1996) Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J* 10: 228-237.
- Bahassi EM, O'Dea MH, Allali N, Messens J, Gellert M, Couturier M** (1999) Interactions of CcdB with DNA gyrase. Inactivation of Gyra, poisoning of the gyrase-DNA complex, and the antidote action of CcdA. *J Biol Chem* 274:10936-10944.
- 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.
- Baulcombe D** (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431:356-363.
- Bautista JA, Rappaport F, Guergova-Kuras M, Cohen RO, Golbeck JH, Wang JY, Béal D, Diner BA** (2005) Biochemical and biophysical characterization of photosystem I from phytoene desaturase and  $\zeta$ -carotene desaturase deletion mutants of *Synechocystis* Sp. PCC 6803: evidence for PsaA- and PsaB-side electron transport in cyanobacteria. *J Biol Chem* 280:20030-41.
- 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.
- Bramley PM** (2002) Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J Exp Bot* 53:2107-2113.
- Chen WP, Punja ZK** (2002) Transgenic herbicide- and disease-tolerant carrot (*Daucus carota* L.) plants obtained through *Agrobacterium*- mediated transformation. *Plant Cell Rep* 20:929-935.
- Clotault J, Peltier P, Berruyer R, Thomas M, Briard M, Geoffriau E** (2008) Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *J Exp Bot* 59:3563-3573.
- Conti A, Pancaldi S, Fambrini M, Michelotti V, Bonora A, Salvini M, Pugliesi C** (2004) A deficiency at the gene coding for zeta-carotene desaturase characterizes the sunflower non dormant-1 mutant. *Plant Cell Physiol* 45:445-55.
- Cunningham FX Jr, Gantt E** (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:557-583.
- Cunningham FX Jr** (2002) Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure Appl Chem* 74:1409-1417.
- Demmig-Adams B, Adams WW** (2002) Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science* 298:2149-53.

- Doyle, J.J. and J.L. Doyle** (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15.
- Dong H, Deng Y, Mu J, Lu Q, Wang Y, Xu Y, Chu C, Chong K, Lu C, Zuo J** (2007) The *Arabidopsis* Spontaneous Cell Death1 gene, encoding a zeta-carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. *Cell Res* 17:458-470.
- Fester T, Hause B, Schmidt D, Halfmann K, Schmidt J, Wray V, Hause G, Strack D** (2002) Occurrence and localization of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal plant roots. *Plant Cell Physiol* 43:256-265.
- Fraser P, Kiano J, Truesdale M, Schuch W, Bramley P** (1999). Phytoene synthase-2 activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening. *Plant Mol Biol* 40: 687-698.
- Fraser PD, Bramley PM** (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoides. *Prog Lipid Res* 43:228-265.
- Garattini E, Gianni' M, Terao M** (2007) Cytodifferentiation by retinoids, a novel therapeutic option in oncology: rational combinations with other therapeutic agents. *Vitam horm* 75:301-354.
- Giorio G, Stigliani AL, D'Ambrosio C** (2008) Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) – new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *FEBS J* 275: 527–535
- Hirschberg J** (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* 4: 210-218.
- Helliwell C, Waterhouse P** (2003) Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods* 30:289-295.
- Jayaraj J, Devlin R, Punja Z** (2008) Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants. *Transgenic Res* 17:489-501
- Just BJ, Santos CA, Fonseca ME, Boiteux LS, Oloizia BB, Simon PW** (2007) Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theor Appl Genet* 114:693-704.
- Lichtenthaler HK, Schwender J, Dish A, Rohmer M** (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via mevalonate-independent pathway. *FEBS letter* 400: 271-274.
- Matthews PD, Luo R, Wurtzel ET** (2003) Maize phytoene desaturase and zeta-carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *J Exp Botany* 54(391):2215-30.

- Milborrow BV** (2001) The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J Exp Bot* 52(359):1145-1164.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol.* 56:165-185.
- Niyogi KK** (1999) PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 50:333-359.
- Pennell RI, Janniche L, Scofield GN, Booij H, de Vries SC, Roberts K** (1992). Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis. *J Cell Biol* 119:1371-1380.
- Pizarro L** (2007) Construcción de vectores para Silenciamiento Génico Post-Transcripcional de la familia de genes que codifican para la enzima licopeno  $\beta$  ciclasa de *Daucus carota*. Seminario de título para optar al título de Ing. en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile.
- Pizarro L** (2008) Estudio de la función del gen licopeno  $\beta$ -ciclasa (lcyb) en la biosíntesis de carotenoides en *Daucus carota*. Tesis de Magíster en Ciencias, mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias. Universidad de Chile.
- Pizarro L Stange C** (2009) Light dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia e Invest Agr* (aceptado).
- Rodrigo MJ, Marcos JF, Alférez F, Mallent MD, Zacarías L** (2003) Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *J Exp Bot* 54:727-38.
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J** (2000) An alternative pathway to  $\beta$ -carotene formation in plant chromoplast discovered by map-based cloning of beta and old gold color mutation in tomato. *Proc Natl Acad Sci* 97:11102-11107.
- Sato-Nara K, Demura T, Fukuda H** (2004) Expression of photosynthesis-related genes and their regulation by light during somatic embryogenesis in *Daucus carota*. *Planta* 219:23-31.
- Schuch W, Bird CR, Ray J, Smith CJ, Watson CF, Morris PC, Gray JE, Arnold C, Seymour GB, Tucker GA, Grierson D** (1989) Control and manipulation of gene expression during tomato fruit ripening. *Plant Mol Biol* 13: 303-311.
- Schofield A, Pallyath G** (2005) Modulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening through phytochrome regulation of phytoene synthase activity. *Plant Physiol Biochem* 43:1052-1060.

- Stange C, Fuentes P, Handford M and Pizarro L** (2008) *Daucus carota* as a novel model to evaluate the effect of light on carotenogenic gene expression. *Biol Res* 41:289-301.
- Tafti M, Ghyselinck NB** (2007) Functional implication of the vitamin A signaling pathway in the brain. *Arch Neurol* 64:1706-1711.
- Telfer A** (2005) Too much light? How  $\beta$ -carotene protects the photosystem II reaction centre. *Photochem Photobiol Sci* 4: 950 – 956.
- Thomas CL, Jones L, Baulcombe DC, Maule AJ.** (2001) Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant J.* 25:417-425.
- Vaucheret H, Béclin C, Fagard M** (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci* 114:3083-3091
- 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 *Sinapsis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J* 12: 625-634.
- Waterhouse PM, Helliwell CA** (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet* 4:29-38.
- Wally O, Jayaraj J, Punja ZK** (2008) Comparative expression of beta-glucuronidase with five different promoters in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) root and leaf tissues. *Plant Cell Rep.* 27:279-287.
- Welsch R, Beyer P, Huguency P, Kleinig H, von Lintig J** (2000) Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* 211: 846-854.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM** (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27:581-590.
- Welsch R, Medina J, Giuliano G, Beyer P, Von Lintig J** (2003) Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216:523-534.
- Woitsch S, Römer S** (2003) Expression of xanthophyll biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation. *Plant Physiol* 132:1508-1517.
- 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. *Biochim Biophys Acta.* 1625:305-308.