

UCH-FC
Biotecnología
FQSYF
C.I



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**Efecto del desarrollo y de la luz en los niveles
de RNA mensajero de seis genes de la ruta
carotenogénica en *Daucus carota* L. (zanahoria)**

Paulina Andrea Fuentes Taladriz



Septiembre, 2009

Santiago – Chile

Directora del Seminario de Título: Dra. Claudia Stange Klein



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

**“EFECTO DEL DESARROLLO Y DE LA LUZ EN LOS NIVELES DE RNA
MENSAJERO DE SEIS GENES DE LA RUTA CAROTENOGENICA EN
DAUCUS CAROTA L. (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**

PAULINA ANDREA FUENTES TALADRIZ

Dra. Claudia Stange
Directora Seminario de Título

Dr. Michael Handford
Co-Director Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Francisco Chávez Espinosa
Presidente

Dr. Claudio Pastenes Villarreal
Evaluador



Santiago de Chile, 7 de septiembre de 2009



Nací un día de primavera en Santiago, después de un largo trabajo de parto. Creo que eso ha marcado de cierta forma toda mi vida, bendecida con muchos tesoros y también con muchas pruebas, que he debido sortear desde niña y que me han hecho crecer con la convicción de que el trabajo duro, la perseverancia y el esfuerzo me pueden llevar a lograr lo que desee.

Mi vida transcurrió inicialmente en Santiago, hasta que cumplí los cinco años. Luego nos trasladamos a Temuco, ciudad en donde crecí y se forjó gran parte de la persona que hoy soy.

Mi vida en el sur está marcada por momentos muy felices, como el tiempo que pasé en el campo, aprendiendo tantas cosas de mi Omi, compartiendo navidades y vacaciones muy lindas y disfrutando y maravillándome con la magia de la naturaleza. Recuerdo con mucho cariño la infancia compartida con mi hermana, que estuvo marcada por juegos alegres, pero también por situaciones dolorosas, que nos llevaron a crear los lazos tan fuertes que hoy nos unen, y que a pesar de nuestras diferencias nos hacen querernos y protegernos siempre. De mi colegio tengo también sólo buenos recuerdos, ya que fue para mí un lugar que quise mucho, donde encontré la satisfacción de ver reconocidos mis esfuerzos y donde comenzó a nacer mi interés por la ciencia. En paralelo a mi interés científico, mi mamá incentivó en mí la curiosidad por lo místico, por comprender mi origen y mi propósito en esta vida y el poder que tengo dentro de mí para ser feliz. Esto me ha llevado a ser una persona de mucha Fe, capaz de aprender de los momentos difíciles, guiándome siempre por mi intuición y escuchando mi corazón.

Cuando cumplí 10 años mis papás se separaron. Fue un tiempo muy difícil y doloroso, pero ese hecho me permitió disfrutar junto a la Sole del mejor papá del mundo, y crecer segura y protegida por su amor. De mi papá aprendí a seguir mi corazón, a soñar y luchar por hacer realidad mis sueños, a no rendirme y comenzar cada día pensando que será un día mejor. De él aprendí también el valor de la verdad, la responsabilidad y el respeto, y la importancia de la familia. Mi papá y mi Omi fueron siempre mis pilares y mi ejemplo a seguir.

Cuando decidí estudiar Biotecnología volví a Santiago. Desde entonces he crecido mucho como persona, adquiriendo más confianza en mí y valorando más las infinitas bendiciones que Dios ha puesto en mi vida. Durante la carrera conocí personas muy lindas, grandes amigos y un grupo de gran calidad humana y científica cuando entre a trabajar al laboratorio, donde descubrí que lo que en realidad deseo hacer en mi vida es trabajar con las plantas.

En Noviembre del año 2007, y tras la reaparición de un cáncer fulminante, Dios se llevó a mi papá. Sin embargo, durante el tiempo que pasó en el hospital tuve la oportunidad de conversar mucho con él, de demostrarle mi amor y de agradecerle por haber dedicado toda su vida a mi hermana y a mí. Dentro de toda la pena que trajo ese

momento, Dios envió a mi vida a JuanK, que desde el principio de nuestro amor ha sido una estrella luminosa que ha llenado de alegría mi corazón y que me ha apoyado, alentado y acompañado siempre, incluso cuando 11 meses después de fallecer mi papá, Dios llamó a mi Omi a su lado.

Pero a pesar de todos los problemas, los miedos y las dificultades, siento que Dios me ha bendecido enormemente con muchas virtudes y oportunidades para crecer y sentirme orgullosa de la persona que hoy soy.

Tengo una familia muy linda y unida, amigos sinceros que quiero y me quieren mucho, un pololo que me ama y a quién amo con todo lo que soy y una hermana con la que comparto, más que la sangre, una historia que nos une y nos ha hecho crecer juntas. Y aunque mi Omi y mi papá ya no estén aquí, su amor, su recuerdo y sus enseñanzas permanecerán por siempre conmigo, guiando mi camino e iluminando mi vida.



Hay solo dos maneras de vivir la vida: una es pensar que nada es un milagro; la otra es pensar que todo es un milagro (Albert Einstein)



A mis dos angelitos



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi tutora, por guiarme durante este trabajo y por ser más que una profesora, una amiga, siempre dispuesta a escucharme y apoyarme, con la cual hemos compartido desde las discusiones más científicas hasta las más esotéricas.

Muchas gracias a todo mi team CSK, por la unidad y compañerismo que compartimos. Muchas gracias a Charlie, por su incansable buena disposición, a Guille por ser mi compañero de banco y ayudarme a ver la vida de una forma más relajada, a mi Nalli, por su risa que nos hace sonreír a todos y por ser una persona con un corazón precioso, a JuanK (tus agradecimientos especiales están más abajo), a la Caro y la Romi C., por compartir su buena onda y en especial a la Lore, que me acogió cuando llegué al laboratorio hace más de tres años y desde entonces me ha apoyado y ayudado siempre que lo he necesitado, como científica y como amiga.

Gracias también al profe Mike, la Profe Lore y la Profe Liliana, por tener la mejor disposición para ayudarme siempre que lo necesité y por todos los buenos momentos compartidos, y a todos los demás compañeros del lab, en especial a Patito Star, por su alegría y a Mati, un excelente amigo, confidente y apoyo.

Quiero agradecer especialmente a la Ange y al Seba, por todo su esfuerzo y trabajo para que hacer que el laboratorio logré funcionar bien, aún cuando somos muchos.

Gracias también a todos los amigos que conocí durante la carrera, y con quienes compartimos tantos momentos. Gracias Emi, por tratar siempre de hacerme ver que no todo es tan terrible como a veces me parece, gracias Lelo por las conversaciones profundas, gracias Seba F. por compartir tus conocimientos y apoyarme siempre, gracias Ceci, por estar ahí siempre que te he necesitado, gracias Ine por tu risa y alegría, gracias Romi por ser una amiga tan linda, gracias Kuri por haber sido un gran compañero de carrera y por presentarme a JuanK, gracias Erick por tantas conversaciones y por tu amistad y gracias especiales a la Dani. Gracias mi mono por acompañarme todas las veces que me sentí mal, por apoyarme y quererme tal como soy, por haber estado siempre, en las noches de estudio, en los momentos felices y también en los difíciles.

Quiero agradecer también a la Gabi, por continuar nuestra amistad a pesar del tiempo y las distancias, por tener un corazón gigante y por todo el apoyo y compañía que me diste en el momento más difícil de mi vida.

Gracias también a mi mamá, por impulsarme a abrir mis alas y a seguir mi propio camino. Gracias a mi Sol, por toda esta vida juntas, por tu cariño, por tu corazón inmenso y tu generosidad y por nuestra unión y apoyo mutuo. Gracias a todos mis tíos y primos, por creer en mí, por quererme y por hacerme sentir que nunca estoy sola. Muchas gracias mi Kuki por todo tu amor inmenso, por quererme tanto tanto, por cuidarme y regalarme cada vez que te voy a ver. Gracias también Abuelito, por cada detalle que refleja tu cariño. Muchas gracias al tío Neco y la tía Marti (y también al tío Rai), por ser los mejores padrinos del mundo, por acordarse siempre de mi, por

recibirme siempre en su hogar con los brazos abiertos y por estar siempre a mi lado. Muchas gracias también a la tía Viviana, la tía Kena, la tía Keka, el tío Fredy, la tía Bernardita y el tío Luis Alberto por toda su preocupación, cariño y ayuda siempre, y muchas gracias a mi tía Marta, por amarme como una hija desde que nací, por cuidarme y regalarme desde que era niña y por toda su paciencia y preocupación constantes.

Para mi amor, gracias infinitas por ser la persona excepcional que admiro y por ser el pololo más dulce, tierno y preocupado. Gracias porque me amas por todo lo que soy y a pesar de muchas cosas, porque me apoyas en todo y crees en mí incluso más que yo misma, porque has estado en los momentos más difíciles de mi vida y has permanecido a mi lado, porque logras iluminar hasta mi día más triste y porque me enseñaste a amar y a ser más feliz de lo que nunca había sido.

Gracias también a toda la familia Moreno Beltrán, por aceptarme y quererme como una hija más desde el primer día y por todo su cariño, preocupación, consejos y apoyo.

Y muchas gracias a Dios, por haberme dado la vida y tantas virtudes. Por regalarme una familia maravillosa, por todas las pruebas que ha puesto en mi camino y que me han hecho crecer y fortalecerme y en especial por bendecir mi vida con dos angelitos preciosos, mi papito y mi Omi, que estuvieron siempre a mi lado en este mundo y que ahora viven en mi corazón. Gracias Omi, por haber sido mi abuelita y mi mamá, por todo lo que me enseñaste, por ser la mujer excepcional que fuiste, por quererme, creer en mí e impulsarme a ser siempre mejor. Y gracias papito, por haber sido el mejor papá del mundo, por dedicar tu vida a amarnos incondicionalmente a mí y a la Sole, por tu corazón lleno de tanta luz y amor, por tus abrazos, por tus ojitos sonrientes, por tu alegría, por tus enseñanzas, por tu confianza ciega en mí, por todos tus sueños e ilusiones y porque siempre estuviste y estarás orgulloso de mí.



ÍNDICE DE CONTENIDOS



ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Carotenoides: Estructura, función y biosíntesis.....	5
1.2 Regulación de la ruta carotenogénica en las plantas.....	9
1.2.1 Regulación génica.....	9
1.2.2 Regulación transcripcional de los genes carotenogénicos.....	11
1.2.2.1 Efecto del desarrollo sobre la expresión de los genes carotenogénicos...	11
1.2.2.2 Efecto de la luz sobre la expresión de los genes carotenogénicos.....	12
1.2.3 Regulación post-transcripcional y post-traducciona l de la ruta carotenogénica	13
1.3 <i>Daucus carota</i> : un modelo de estudio novedoso.....	14
1.4 Estrategia de estudio.....	18
1.5 Hipótesis.....	19
1.6 Objetivos.....	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
2.1 Materiales.....	20
2.1.1 Material biológico.....	20
2.1.2 Reactivos, insumos y equipos.....	20
2.1.2.1 Termociclador acoplado a un sistema óptico de detección: Mx3000P™.....	20
2.2 Métodos.....	22
2.2.1 Cultivo de plantas de <i>Daucus carota</i> variedad Nantes.....	22

2.2.2	Síntesis de cDNA de las raíces y las hojas de las plantas de <i>D.carota</i>	22
2.2.2.1	Extracción de RNA.....	22
2.2.2.2	RT-PCR.....	24
2.2.2.3	Verificación de la síntesis de cDNA.....	25
2.2.3	RT-PCR cuantitativo.....	26
2.2.3.1	Diseño y prueba de partidores específicos para los genes <i>psy1, psy2, pds, zds1, zds2, lcyb</i> y <i>ubi</i>	26
2.2.3.2	Determinación de la eficiencia de los partidores.....	28
2.2.3.3	Ensayos de RT-PCR cuantitativo.....	28
2.2.4	Análisis de los datos de RT-PCR cuantitativo.....	31
2.2.4.1	Verificación del experimento.....	31
2.2.4.2	Determinación de la fluorescencia basal.....	32
2.2.4.3	Calibración y normalización de los datos.....	32
2.2.4.4	Gráficos y análisis estadísticos.....	34
3.	RESULTADOS	36
3.1	Desarrollo de las plantas de <i>Daucus carota</i>	36
3.2	RT-PCR cuantitativo.....	39
3.2.1	Diseño y prueba de los partidores específicos.....	39
3.2.2	Curvas de eficiencia de los partidores.....	39
3.2.3	RT-PCR cuantitativo de los genes carotenogénicos de <i>D. carota</i>	44
3.3	Expresión de los genes carotenogénicos durante el desarrollo de <i>Daucus carota</i>	45
3.3.1	Niveles de RNAm de los genes carotenogénicos en las hojas durante el desarrollo de <i>D. carota</i>	46
3.3.2	Niveles de RNAm de los genes carotenogénicos durante el desarrollo de la raíz modificada de <i>D. carota</i>	48
3.3.3	Niveles de RNAm de los genes carotenogénicos en las hojas y las raíces modificadas de <i>D. carota</i> a las doce semanas del cultivo	50
3.4	Evaluación del efecto de la luz sobre los niveles de RNAm de los genes carotenogénicos.....	52



3.4.1	El efecto de la luz en los niveles de RNAm de los genes carotenogénicos en las hojas de <i>D. carota</i> en los tres estados del desarrollo	52
3.4.2	El efecto de la luz en los niveles del RNAm de los genes carotenogénicos en la raíz modificada de <i>Daucus carota</i> , a las cuatro, ocho y doce semanas de cultivo	54
4.	DISCUSIÓN	57
4.1	RT-PCR cuantitativo en tiempo real.....	57
4.2	El desarrollo de la hoja de <i>D. carota</i> genera efectos diferenciales en los niveles de RNAm de los genes carotenogénicos.....	59
4.3	El desarrollo de la raíz modificada de <i>D. carota</i> se correlaciona con el aumento de los niveles de RNAm de la mayoría de los genes carotenogénicos.....	63
4.4	Los genes <i>psy2</i> , <i>zds2</i> y <i>lcyb</i> son más relevantes en las plantas maduras de <i>D. carota</i> ...	64
4.5	La luz es necesaria para la expresión de los genes carotenogénicos en las hojas de <i>D. carota</i>	67
4.6	La luz provoca efectos contrarios en los niveles de RNAm de los genes carotenogénicos en la raíz juvenil y madura de <i>D. carota</i>	70
5.	CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	72
6.	REFERENCIAS	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Secuencia y características de los partidores utilizados.....	27
Tabla 2	Programas de PCR	30
Tabla 3	Eficiencia de amplificación de los partidores utilizados.....	43



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ruta de síntesis de los carotenoides.....	9
Figura 2	Niveles de los carotenoides durante el desarrollo de <i>D. carota</i>	15
Figura 3	Desarrollo de las plantas de <i>D. carota</i>	38
Figura 4	Curvas de amplificación y disociación del gen de la ubiquitina.....	41
Figura 5	Curvas de disociación de los seis genes analizados.....	42
Figura 6	Curva de eficiencia de los partidores específicos para el gen <i>ubi</i>	43
Figura 7	Los niveles de RNAm de los genes <i>psy1</i> , <i>psy2</i> , <i>pds</i> , <i>zds1</i> , <i>zds2</i> y <i>lcyb</i> durante el desarrollo de las hojas de <i>Daucus carota</i>	47
Figura 8	Los niveles de RNAm de los genes <i>psy1</i> , <i>psy2</i> , <i>pds</i> , <i>zds1</i> , <i>zds2</i> y <i>lcyb</i> durante el desarrollo en la oscuridad de la raíz modificada de <i>Daucus carota</i>	49
Figura 9	Los niveles de RNAm de los genes <i>psy1</i> , <i>psy2</i> , <i>pds</i> , <i>zds1</i> , <i>zds2</i> y <i>lcyb</i> a las 12 semanas de desarrollo en una planta sometida a condiciones normales de luz y oscuridad.....	51
Figura 10	Los niveles de RNAm de los genes <i>psy1</i> , <i>psy2</i> , <i>pds</i> , <i>zds1</i> , <i>zds2</i> y <i>lcyb</i> en las hojas expuestas a la luz y la oscuridad a las 4, 8 y 12 semanas del desarrollo.....	53
Figura 11	Los niveles de RNAm de los genes <i>psy1</i> , <i>psy2</i> , <i>pds</i> , <i>zds1</i> , <i>zds2</i> y <i>lcyb</i> en las raíces desarrolladas en la luz y la oscuridad a las 4, 8 y 12 semanas del desarrollo.....	55



LISTA DE ABREVIATURAS

• BLAST	: Herramienta de alineamiento básico local
• BrEt	: Bromuro de Etidio
• Buffer	: Solución tampón
• cDNA	: Ácido desoxirribonucleico copia
• Ct	: Ciclo umbral por sobre la fluorescencia bsal
• DNA	: Ácido desoxirribonucleico
• DNasa	: Desoxi-ribonucleasa
• dNTP	: Desoxinucleótido trifosfato
• dRn	: Fluorescencia normalizada por la referencia adaptable y la sonda pasiva
• Kb	: kilobase
• NCBI	: Centro nacional para la información biotecnológica
• NTC	: Control sin molde
• NTR	: Región no traducible
• pb	: pares de bases
• PCR	: Reacción en cadena de la Polimerasa
• RNA	: Ácido ribonucleico
• RNAm	: Ácido ribonucleico mensajero
• RNasa	: Ribonucleasa
• RT	: Transcripción Reversa
• SGPT	: Silenciamiento génico postranscripcional
• Tm	: Temperatura de disociación o denaturación
• μ L	: microlitro

RESUMEN

Los carotenoides son compuestos lipídicos isoprenoides que participan en la fotoprotección, fotosíntesis y la síntesis de hormonas en las plantas. En los animales, estos son precursores de la vitamina A y actúan como antioxidantes, dadas sus propiedades biofísicoquímicas otorgadas por su estructura de dobles enlaces conjugados. Debido a esto, su acumulación y metabolismo han sido procesos ampliamente estudiados, dilucidándose para esto la mayor parte de los genes involucrados.

Con respecto a su regulación, la mayor parte de los estudios se han realizado en las hojas de diversos organismos, tales como tomate, *Arabidopsis* y tabaco, determinándose que la luz es un factor clave en la activación transcripcional de los genes carotenogénicos y que el gen de la fitoeno sintasa (*psy*), que codifica para la primera enzima involucrada directamente en la ruta, sería un punto clave de regulación.

La zanahoria (*Daucus carota*) es uno de los vegetales que acumula gran cantidad de carotenoides en su raíz modificada, llegando a almacenar 900 µg/g de peso seco a las 12 semanas de desarrollo, de los cuales más de la mitad corresponde a β-caroteno. La acumulación de estos pigmentos está asociada al nivel de desarrollo de la raíz, el cual a su vez ocurre sólo en la oscuridad. Esta elevada síntesis y acumulación de los carotenoides en ausencia de luz hacen de la zanahoria un modelo novedoso e interesante para estudiar la regulación de la ruta carotenogénica.

Durante este seminario de título se evaluaron los niveles de RNA mensajero (RNAm) de los genes fitoeno sintasa (*psy1* y *psy2*), fitoeno desaturasa (*pds*), ζ-

caroteno desaturasa (*zds1* y *zds2*) y licopeno β -ciclase (*lcyb*) en las hojas y la raíz modificada de plantas silvestres de *D. carota*, durante tres estados del desarrollo. Se determinó que el nivel de desarrollo se correlaciona directamente con los niveles de los RNA mensajeros de todos los genes, excepto *zds1*, en la raíz de *D. carota*, y de *psy1*, *pds*, *zds2* y *lcyb* en las hojas. En ambos órganos, *lcyb* fue el gen que presentó el mayor aumento de RNAm entre las 4 y las 12 semanas de cultivo. Además, se determinó que a las 12 semanas de desarrollo los genes *psy2* y *zds2* son los que presentan los mayores niveles de RNAm.

En las hojas de *D. carota* no se obtuvo una correlación directa entre la acumulación de los carotenoides y los niveles de RNAm de los genes carotenogénicos, por lo que sugerimos que en este órgano existirían modificaciones post-transcripcionales o post-traduccionales, o bien que durante distintos estados del desarrollo existirían distintos factores activadores de los genes carotenogénicos.

Por otra parte, se observó que la luz provoca un aumento en los niveles del RNAm de todos los genes, excepto de *lcyb*, en al menos un estado del desarrollo.

La luz inhibe el desarrollo normal de la raíz modificada, lo que ocasiona que ésta se desarrolle de manera similar a un tallo (órgano fotosintético) durante sus etapas tempranas. En estas condiciones, los niveles del RNAm de la mayoría de los genes carotenogénicos son mayores que los presentes en una raíz juvenil desarrollada en la oscuridad. Sin embargo, al llegar a la etapa madura, la raíz desarrollada en la luz no alcanza su fenotipo normal y los niveles del RNAm de los genes carotenogénicos son mucho menores que los presentes en la raíz madura desarrollada en la oscuridad.

ABSTRACT

Carotenoids are lipidic isoprenoid compounds that participate in photoprotection, photosynthesis and hormone synthesis in plants. In animals, they are precursors for vitamin A and acts as antioxidants due to the biophysicochemical properties given by their structure of conjugated bonds. For this reason, their accumulation and metabolism have been widely studied, which has led to the elucidation of most of the genes involved.

With regard to its regulation, most studies have been developed in leaves from several organisms, such as tomato, *Arabidopsis* and tobacco, indicating that the light is a key factor in the transcriptional activation of the carotenogenic genes and that the phytoene synthase (*psy*) gene, which encodes for the first enzyme directly committed to this pathway, would be a key regulatory point.

Carrot (*Daucus carota*) is one of the vegetables that accumulate large amounts of carotenoids in its modified root, reaching levels of 900 $\mu\text{g/g}$ dry weight at 12 weeks of development, of which more than half is β -carotene. The accumulation of carotenoids is associated with root development, which takes place only in darkness.

The high synthesis and accumulation of carotenoids in the presence of light in leaves and in the darkness in roots, makes carrot a novel and interesting model to study the regulation of the carotenogenic pathway.

During this work, we evaluated the messenger levels of phytoene synthase (*psy1* and *psy2*), phytoene desaturase (*pds*), ζ -carotene desaturase (*zds1* and *zds2*) and lycopene β -cyclase (*lycb*) genes in carrot leaves and in modified roots, at three developmental stages.

We conclude that developmental stage correlates directly with the messenger levels of all genes in the modified root of carrot, except *zds1*, and with the messenger levels of *psy1*, *pds*, *zds2* and *lcyb* in the leaves. This was especially remarkable for *lcyb*, which presented the highest increase in its messenger levels between early (4 weeks) and late (12 weeks) developmental stages. We also observed that *psy2* and *zds2* were the genes with the highest messenger levels at 12 weeks of development. In addition, there is an absence of a direct correlation between carotenoid accumulation in leaves of carrot and the messenger RNA levels of the genes, so we suggest that the enzymes codified by the carotenogenic genes could be post-translationally regulated or the carotenogenic genes could be differentially activated by different factors present through development.

On the other hand, light plays a differential function in the leaves of carrot, according to their developmental stage, where it causes an increase in the messenger levels of all this genes in at least one developmental stage, except for *lcyb*.

Light also inhibits the normal development of the modified root, causing it to resemble a photosynthetic organ in the early stages, which also correlates with a higher carotenogenic genes mRNA levels than in a young root developed in darkness. However, in an adult plant, light prevents the normal development of the modified root, which correlates with the lower level of most carotenogenic genes mRNA, in comparison to those observed in a normal modified root developed in darkness.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Carotenoides: Estructura, función y biosíntesis

Los carotenoides son compuestos lipídicos isoprenoides naturales sintetizados por todos los organismos fotosintéticos (plantas y algas) y también por algunas bacterias y levaduras.

Estos derivan de la condensación de varias unidades isoprenicas de cinco carbonos formando moléculas de cuarenta carbonos, que contienen hasta 15 enlaces conjugados (Taylor y Ramsay, 2005; Giorio y col., 2007; Armstrong y Hearts, 1996).

La presencia de estos numerosos enlaces conjugados les confiere distintas propiedades, por ejemplo, como cromóforos (parte de una molécula capaz de absorber luz y generar color). A mayor número de dobles enlaces conjugados, el sistema absorbe fotones de mayor longitud de onda (y menor energía), otorgando diversos colores como amarillo, naranja o rojo. El β -caroteno, por ejemplo, posee 11 dobles enlaces conjugados y presenta una coloración naranja intensa.

Además, debido a su estructura química, los carotenoides son capaces de resonar los electrones a lo largo de su esqueleto carbonado, lo cual permite la absorción de los electrones desapareados de las moléculas radicalarias (Britton, 1995; Britton y col., 1998; Nelson y col., 2003).

Actualmente, se han descrito más de 700 carotenoides estructuralmente distintos (Giorio y col., 2007), los cuales se subdividen en dos grandes grupos: los carotenos, que contienen solo átomos de carbono e hidrogeno y las xantofilas, que poseen además sustituyentes oxigenados.

Los carotenoides cumplen roles esenciales tanto en las plantas como en los animales. En las plantas, se encuentran asociados a las membranas fotosintéticas en los cloroplastos activos, mientras que en los cloroplastos senescentes y en los cromoplastos se encuentran asociados a las membranas, en cuerpos oleosos y en estructuras cristalinas del estroma (Cunningham y Gantt, 1998; Vishnevetsky y col., 1999). Estos pigmentos participan en procesos fisiológicos esenciales como la fotosíntesis, donde captan la energía lumínica de diversas longitudes de onda (rango espectral de absorción entre 400 y 500 nm) en los complejos captadores de luz de los fotosistemas, la cual es transferida a la clorofila *a* durante la fotosíntesis (Britton, 1995; Schmid, 2008). Actúan también en la disipación térmica del exceso nocivo de energía lumínica, además de generar un alto nivel de protección fotooxidativa contra los efectos del singlete de oxígeno, del radical superóxido y del triplete excitado de clorofila generado en los centros de reacción del fotosistema II como consecuencia de la fotosíntesis (Armstrong y Hearts, 1996; Cunningham y Gantt, 1998; Giorio y col., 2007; Takano y col., 2005; Telfer, 2005). Además, son precursores en la síntesis de la hormona ácido abscísico (ABA). Esta hormona participa en procesos vitales de la fisiología de las plantas, tales como el crecimiento y desarrollo, la dormancia de las semillas y la adaptación a distintos tipos de estrés ambiental, en especial a la sequía y la elevada salinidad (Chen y col., 2008; Crozier y col., 2000).

Además, al ser pigmentos coloreados, los carotenoides se evidencian en las raíces de reserva, los frutos y las flores, donde facilitan la polinización (Armstrong y Hearts, 1996; Grotewold, 2006), y también en las hojas senescentes al degradarse la clorofila.

Las funciones que cumplen los carotenoides son de tal importancia para las plantas, que un impedimento en la formación cíclica de éstos es letal.

En los animales, algunos carotenoides (β -caroteno, α -caroteno, criptoxantina) son convertidos a la vitamina A (retinol) luego de un clivaje molecular seguido de un proceso reductivo. La vitamina A cumple a su vez funciones esenciales en la formación de los dientes, tejidos sanos, piel y mucosas, además de participar en la generación de los pigmentos necesarios para el funcionamiento de la retina. Adicionalmente los carotenoides (por ejemplo el licopeno, la luteína y la zeaxantina) funcionan como poderosos antioxidantes, que previenen y reducen el daño celular. Por ello, han sido ligados a una reducción en las probabilidades de desarrollar ciertos tipos de cáncer, enfermedades degenerativas y vasculares y problemas visuales (Breimer, 1990; Esterbauery col., 1992; Mayne, 1996; Rao y Rao, 2007; Snodderly, 1995; Tanumihardjo y Yang, 2005).

Dado que los animales son incapaces de sintetizar estos compuestos, deben ingerirlos en la dieta mediante el consumo de vegetales ricos en ellos, como la zanahoria.

Los carotenoides poseen una importancia vital en la salud y la nutrición humana, por lo que la regulación de su síntesis y metabolismo han sido ampliamente estudiadas en las últimas décadas. Los avances en ésta área de estudio han permitido el descubrimiento de la mayoría de los genes involucrados en la ruta de síntesis de los carotenoides, tanto en las plantas como en otros organismos sintetizadores de estos compuestos (Cunningham y Gantt, 1998; Cunningham, 2002; Howitt y Pogson, 2006). La manipulación de varios de los genes de la ruta ha permitido aumentar la síntesis de

los carotenoides en diversos organismos, en especial en las plantas (Aluru y col., 2008; Davuluri y col., 2004; Diretto y col., 2007; Lamers y col., 2008; Shewmaker y col., 1999; Ye y col., 2000).

En las plantas, la biosíntesis de los carotenoides ocurre en los plastidios (cloroplastos y cromoplastos) de las células vegetales e involucra varias reacciones enzimáticas. En la primera reacción de biosíntesis de los carotenoides se forma el fitoeno por la unión cola-cola de dos moléculas de geranil geranil pirofosfato (GGPP), mediada por la enzima fitoeno sintasa (PSY) (Figura 1). Luego ocurren cuatro desaturaciones seguidas llevadas a cabo por la fitoeno desaturasa (PDS) y por la ζ -caroteno desaturasa (ZDS), con la finalidad de extender las series conjugadas de los dobles enlaces. El fitoeno sufre así cuatro desaturaciones que resultan en la formación secuencial de fitoflueno, z -caroteno, neuroesporeno y por último licopeno, el cual es de color rojo (Figura 1, Cunningham y Gantt, 1998).

En este punto de la vía, ocurre la separación en dos ramas principales producto de la ciclación del licopeno por dos enzimas diferentes: la licopeno β -ciclase (LCYB), que actúa como un homodímero para generar β -caroteno, y en forma de heterodímero con la licopeno ϵ -ciclase (LCYE), generándose el α -caroteno, precursor de la luteína (Cunningham y Gantt, 1998).

Luego, el β -caroteno es hidroxilado a zeaxantina, la cual es epoxidada a compuestos que generan finalmente el ácido abscísico (ABA).

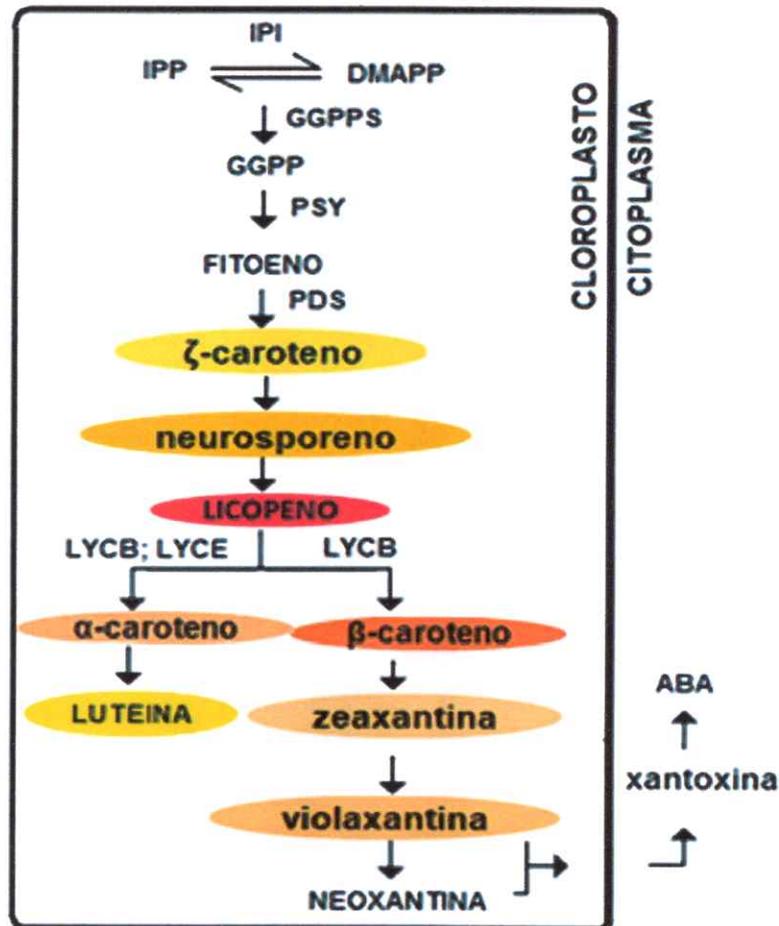


Figura 1: Ruta de síntesis de los carotenoides. Figura modificada de Dong y col. (2007).

1.2 Regulación de la ruta carotenogénica en las plantas

1.2.1 Regulación génica

A nivel génico existe un primer punto de regulación, dado por la presencia de más de un gen que codifica para la misma actividad enzimática. Esto puede deberse a una redundancia génica o a una expresión órgano específica de cada gen. Por ejemplo, en tomate existen dos genes que codifican para las enzimas PSY y LCYB: *psy1* y *cycb*, son expresados en los frutos del tomate, mientras que *psy2* y *lcyb* se

expresan preferencialmente en los órganos fotosintéticos y los pétalos (Armstrong y Hearts, 1996; Bartley y Scolnik, 1993; Giorio y col., 2008; Ronen y col., 1999; Welsch y col., 2000). En maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza sativa*), se describieron recientemente tres genes *psy*. En ambas especies, *psy1* y *psy2* son inducidos por la luz durante la de-etiolación de las plántulas de maíz y arroz, mientras que los niveles del transcrito *psy3* son regulados en respuesta al estrés abiótico (sequía y salinidad) y al ABA (Li y col., 2008; Welsch y col., 2008).

Por otro lado, *Arabidopsis thaliana* posee 5 genes que codifican para los polipéptidos del tipo GGPPS, pero sólo dos de ellos (*Ggpps1* y *Ggpps5*) poseen la actividad enzimática, aunque se desconoce el rol específico y la localización subcelular de cada uno de ellos (Cunningham y Gantt, 1998).

Por lo tanto, aún cuando se conoce la mayoría de los genes involucrados en esta ruta biosintética, resta aún dilucidar la función y regulación de la mayoría de estos genes carotenogénicos en las plantas.

Para abordar esta problemática se ha estudiado el fenotipo de las mutantes (Dong y col., 2007; Qin y col., 2007; Rodrigo y col., 2003; Ronen y col., 1999) y de las plantas donde el gen carotenogénico ha sido silenciado post-transcripcionalmente (Fraser y col., 1999; Pizarro, 2008). Estos enfoques experimentales han permitido evidenciar la importancia biológica de *zds* y *pds*, para los cuales mutantes homocigotos son letales y plantas heterocigotas poseen fenotipos albinos y deficiencia en la fotoprotección, entre otros (Dong y col., 2007; Qin y col., 2007; Rodrigo y col., 2003). Mediante el silenciamiento de genes se ha estudiado la regulación de la

biosíntesis de carotenoides y la especificidad de expresión de ciertos genes a un órgano (hoja o fruto, Bartley y Scolnik, 1993; Fraser y col., 1999).

1.2.2 Regulación transcripcional de los genes carotenogénicos

La regulación a nivel transcripcional ha sido propuesta como el principal punto de modulación de la ruta carotenogénica, por lo que la mayoría de los estudios se han enfocado en determinar los factores involucrados a este nivel (Bramley, 2002; Cunningham, 2002; Howitt y Pogson, 2006; Ito y col., 2009; Römer y Fraser, 2005; Shanker y col., 2003; Tanaka y col., 2008; Taylor y Ramsay, 2005). Entre los factores más estudiados que son capaces de regular la expresión de los genes carotenogénicos a nivel transcripcional, se encuentra el proceso de desarrollo de los órganos y el efecto de la luz sobre éstos.

1.2.2.1. Efecto del desarrollo sobre la expresión de los genes carotenogénicos

Durante el desarrollo de los órganos como las hojas, las flores y los frutos se observa un cambio de tamaño, morfología y coloración. Al respecto, la síntesis de los carotenoides aumenta durante el desarrollo de las flores de *Gentiana lutea* (Zhu y col., 2003) y la maduración de distintas variedades de frutos, como cítricos (Kato y col., 2004) y damascos (Kita y col., 2007). También existe una correlación directa entre la expresión de los genes carotenogénicos como *psy*, *lcyb*, *cbhx* y *zep* con la síntesis de los pigmentos en las variedades naranjas de los damascos (*Prunus mume*, Kita y col., 2007) y cítricos (*Citrus reticulata*, naranja Valencia, Kato y col., 2004). Durante el desarrollo de las hojas del tomate ocurre un aumento en los niveles de RNAm del gen *pds* (Giuliano, 1993).

1.2.2.2 Efecto de la luz sobre la expresión de los genes carotenogénicos

La luz tiene funciones vitales en la fisiología vegetal, y es protagonista en variados procesos, como la fotosíntesis y el desarrollo fotomorfogénico. Este efecto es mediado por los fotorreceptores (moléculas receptoras de la luz), los cuales desencadenan la activación de los genes regulados por la luz. Dentro de los fotorreceptores, los más estudiados son el fitocromo y el criptocromo. Estos son activados en presencia de la luz con lo cual se induce la maquinaria de transducción de las señales que derivan en la activación de la transcripción de los genes de respuesta a la luz, entre los que se encuentran los genes carotenogénicos (Al-Sady y col., 2006; Ballesteros y col., 2001; Chattopadhyay y col., 1998; Pizarro y Stange, 2009; Tepperman y col., 2001).

La regulación de la ruta carotenogénica se ha estudiado mayoritariamente en los órganos que acumulan los carotenoides producto de la exposición a la luz, tales como las hojas, flores y frutos y también en los etioplastos en transición a cloroplastos (Bramley, 2002; Römer y Fraser, 2005). Los resultados indican que la luz induce la expresión de los genes carotenogénicos en las hojas, frutos y flores (Adams-Phillips y col., 2004; Giovannoni, 2004; Hirschberg, 2001; Simkin y col., 2003; Woitsch y Römer, 2003).

Por ejemplo, en *Nicotiana tabacum* (tabaco) la expresión de *psy* se induce luego de la exposición continua de las hojas a luz roja y blanca (Woitsch y Römer, 2003). En las hojas del pimiento, se demostró una regulación negativa de los genes *psy*, *pds*, *zds* y *lcyb* en la oscuridad (Simkin y col., 2003), mientras que en las hojas del tomate se determinó que la luz activa los genes carotenogénicos a nivel transcripcional

(Bramley, 2002). En *A. thaliana*, por su parte, se demostró que la activación del gen *psy* está mediada por los fotorreceptores (von Lintig y col., 1997).

Sin embargo, la activación de los genes carotenogénicos mediada por luz no se traduce necesariamente en un aumento en los niveles de los carotenoides. Esto fue demostrado por von Lintig y colaboradores (1997) quienes determinaron que bajo diversas condiciones de luz, los niveles del mensajero del gen *psy* en las plántulas de *Arabidopsis* aumentaban considerablemente, pero los niveles de los carotenoides solo aumentaban una vez que se sintetizaba la clorofila.

Por otro lado, en esa misma investigación se demostró que los niveles de mensajero de otros genes carotenogénicos (*pds* y *ggpps*) permanecían constantes, aún cuando los niveles de los carotenoides aumentaban, por lo que la activación transcripcional de los genes carotenogénicos en las hojas no sería el único mecanismo encargado de activar la síntesis de los carotenoides en este órgano, sino que existirían también modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales.

1.2.3 Regulación post-transcripcional y post-traduccionales de la ruta carotenogénica

A pesar de que la regulación transcripcional de los genes carotenogénicos es el punto clave de la regulación de esta ruta en las plantas, también existen reportes sobre la regulación de las enzimas involucradas en la síntesis de los carotenoides.

En las plantas, los genes carotenogénicos son nucleares, pero las proteínas que codifican actúan a nivel de las membranas de los plastidios, por lo cual deben ser destinadas a ellos como pre-proteínas que son posteriormente modificadas. Dentro de los plastidios, la velocidad de reacción de las enzimas podría verse afectada por la

forma en que éstas se asocian y acumulan. Por ejemplo, en el estroma de los cloroplastos se forman los complejos multienzimáticos de GGPPS y PSY, lo cual podría aumentar la velocidad de la reacción en los pasos iniciales de la ruta, mientras que otras enzimas de la vía actúan asociadas a la membrana tilacoidal (Camara, 1993). En narciso, las enzimas PSY y PDS se encuentran inactivas en las fracciones solubles, pero en forma activa al unirse a membranas (Al-Babili y col., 1996)

La enzima PSY de la planta de mostaza se encuentra en forma inactiva en los cuerpos prolamelares de los cloroplastos, aún cuando sus niveles de RNAm y de la proteína aumentan. Esta enzima tiene actividad solo al ubicarse en los tilacoides en desarrollo, lo que denota una regulación mediada por factores distintos a la regulación transcripcional (Welsch y col., 2000).

Además, los carotenoides serían secuestrados en forma de cristales y complejos lipoproteicos (Baranska y col., 2006; Vishnevetsky y col., 1999). Estos complejos secuestradores de los carotenoides podrían aumentar el flujo de síntesis al retirar los productos finales de la ruta.

1.3 *Daucus carota*: un modelo de estudio novedoso

La zanahoria (*Daucus carota* L.) es una planta dicotiledónea bienal que se caracteriza por poseer una raíz modificada de gran tamaño. En la naturaleza existen zanahorias de diferentes colores, que van desde el blanco al morado, debido a la composición específica de los carotenoides y los antocianos que posee cada una. Las zanahorias más consumidas poseen una raíz modificada de color naranja, debido a una elevada acumulación de carotenoides, en especial α y β -caroteno, los que pueden sumar el 95% del total de los carotenoides presentes (Baranska y col., 2006).

D. carota es una planta que sintetiza los carotenoides en la raíz modificada en ausencia de luz, y en las hojas en presencia de luz. Por ello, se presenta como un modelo novedoso para estudiar la regulación de la ruta carotenogénica en los órganos expuestos naturalmente a la oscuridad, como es la raíz modificada.

En las hojas, los niveles de los carotenoides se mantienen constantes durante el desarrollo, con niveles cercanos a los 400 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, de los cuales aproximadamente 100 $\mu\text{g/g}$ de peso seco corresponden a β -caroteno (Figura 2)

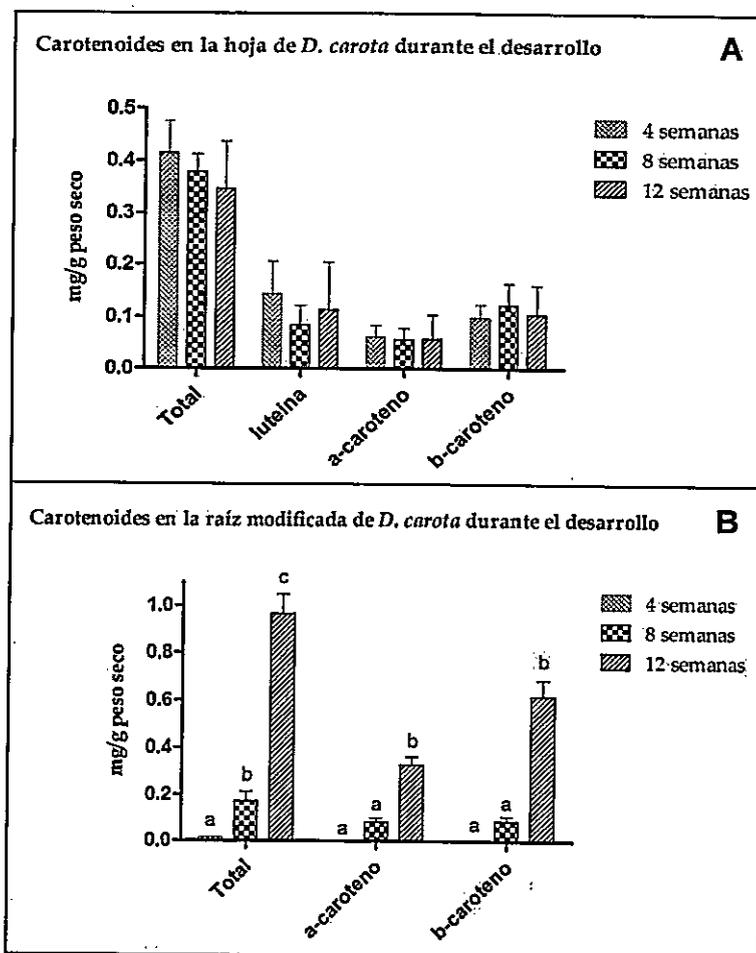


Figura 2: Niveles de los carotenoides durante el desarrollo de *D. carota*. (A) Niveles de los carotenoides en las hojas de *D. carota*; (B) Niveles de los carotenoides en la raíz modificada de *D. carota*. Las mediciones fueron realizadas mediante HPLC. Letras distintas indican diferencias significativas tras los análisis de ANOVA de dos vías ($P < 0,05$) y post-test de Bonferroni. Figura de Fuentes y col., 2009.

Por otro lado, los niveles de estos pigmentos aumentan en paralelo al estado del desarrollo de la raíz modificada de *D. carota*, desde 16,6 µg/g de peso seco de los carotenoides totales presentes a las 4 semanas de desarrollo hasta 968 µg/g de peso seco a las 12 semanas (de los cuales 617 µg/g de peso seco corresponden a β-caroteno).

En la base de datos se encuentran disponibles las secuencias completas o parciales de la mayoría de los cDNAs de los genes carotenogénicos de *D. carota* como: isopentenil isomerasa (*ipi*, DQ192183), geranilgeranil pirofosfato sintasa (*ggpps*) 1 y 2, fitoeno sintasa 1 y 2 (*psy1*: DQ192186, *psy2*: DQ192187), fitoeno desaturasa (*pds*: DQ222429), ζ-caroteno desaturasa 1 y 2 (*zds1*: DQ222430, *zds2*: DQ192189) licopeno β-ciclasa (*lycb*: DQ192190), licopeno ε-ciclasa (*lyce*, DQ192192) y capsantina capsorubina sintasa (*ccs*: DQ192191) entre otras (Just y col., 2007). Al igual que en otros modelos, existe más de un gen para una misma actividad enzimática. Este es el caso de los genes *psy* (*psy1* y *psy2*), *zds* (*zds1* y *zds2*) y *lycb* (*lycb1* y *lycb2* o *ccs*), pero se desconoce si las enzimas codificadas por ellos se expresan diferencialmente. Estudios realizados en nuestro laboratorio han determinado mediante silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT) que el gen *lycb1* es necesario para la síntesis del β-caroteno tanto en las hojas como en la raíz modificada (Pizarro, 2008). Adicionalmente, se ha reportado la expresión diferencial de algunos de estos genes entre zanahorias blancas, amarillas, naranjas y rojas (Clotault y col., 2008). En este estudio se observó que la expresión de los genes se correlacionó con la cantidad de pigmento en las raíces de las variedades coloreadas durante el desarrollo. Sin embargo, en la variedad cuya raíz de reserva es blanca

(Blanche), los genes carotenogénicos se expresan a pesar de no haber acumulación de los carotenoides.

Sumado a estas investigaciones, es interesante poder determinar la expresión de los genes carotenogénicos tanto en las hojas como en la raíz modificada durante el desarrollo de la planta, dada la presencia de más de un gen para algunas de las actividades enzimáticas de la ruta carotenogénica en esta planta y dado que ambos órganos poseen un desarrollo y requerimientos lumínicos diferentes. Una primera aproximación para evaluar si estas enzimas tienen una función órgano-específica, es analizar los niveles del RNAm de estos genes en las hojas y la raíz modificada de la zanahoria.

Estudios previos realizados en el laboratorio determinaron que si al comenzar a desarrollarse la plántula una parte del hipocotilo queda fuera de la tierra, ésta sección no se desarrolla como raíz modificada. Este fenómeno puede ser revertido al exponer a oscuridad dicho segmento (Stange y col., 2008). Con este resultado se concluyó que la luz reprime reversiblemente el desarrollo de la raíz modificada en *D. carota*. Estos resultados son contrarios al efecto activador que posee la luz sobre la acumulación de los transcritos de los genes carotenogénicos en las hojas y los frutos en otros modelos vegetales. Por ello, durante este seminario de título evaluamos la expresión de los genes carotenogénicos en las hojas y raíz modificada de *D. carota* en ausencia o presencia de luz, respectivamente.

1.4. Estrategia de estudio

Para evaluar el efecto del desarrollo y de la luz en la acumulación del RNAm de los seis genes carotenogénicos se considerarán plantas en tres estados de desarrollo característicos y diferentes entre sí.

Para cuantificar de manera fidedigna y representativa los niveles del RNAm de los seis genes en los distintos órganos y condiciones, se utilizó RT-PCR cuantitativo (o PCR en tiempo real) mediante la sonda fluorescente SYBR® Green. Como marcador de la expresión constitutiva (normalizador) se utilizaron los niveles de RNAm del gen de ubiquitina (*ubi*, DCU68751).

Este método, a diferencia del PCR semicuantitativo, permite determinar en forma precisa los niveles del RNAm de un gen, ya que se sigue el curso de la reacción ciclo a ciclo gracias a la utilización de las sondas fluorescentes. Al determinar el Ct (ciclo umbral en el cual se sobrepasa la fluorescencia basal) en la zona de la amplificación exponencial de cada ciclo, se obtiene la relación directa entre la señal fluorescente emitida y la cantidad de RNAm original. De esta forma, al comparar el Ct de un gen en un cierto órgano y condición, con el Ct del calibrador, ambos normalizados por el Ct del gen ubiquitina en la misma muestra, es posible cuantificar los niveles de cada RNA mensajero en las condiciones estudiadas (Bustin, 2004). El SYBR® Green es una de las sondas fluorescentes que puede utilizarse en esta metodología y que fue escogida para realizar los experimentos de este trabajo. Esta sonda funciona uniéndose inespecíficamente a todo DNA doble hebra presente en la reacción, por lo que la fluorescencia emitida será proporcional al número de las moléculas de doble hebra presentes.

1.5 HIPÓTESIS

1) Durante el desarrollo de las hojas y la raíz modificada de *D. carota* aumentan los niveles de los RNA mensajero de los genes carotenogénicos.

2) La luz induce un aumento en los niveles de los RNA mensajeros de los genes carotenogénicos en las hojas, y una disminución de éstos en la raíz modificada de *D. carota*.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo general

Cuantificar los niveles de RNAm de los genes carotenogénicos *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1*, *zds2* y *lcyb* en las hojas y la raíz modificada de la zanahoria durante su desarrollo y en exposición a la luz u oscuridad, mediante PCR cuantitativo.

1.6.2 Objetivos específicos

1.6.2.1: Síntesis de los cDNA de hoja y raíz modificada durante el desarrollo (4, 8 y 12 semanas de cultivo) y con tratamientos de luz y oscuridad.

1.6.2.2: Establecimiento de las curvas de eficiencia para los partidores específicos de los genes *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1*, *zds2*, *lcyb* y *ubi*.

1.6.2.3: Cuantificación de los niveles de RNAm de los genes *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1*, *zds2* y *lcyb* durante el desarrollo de las hojas y la raíz modificada y en los tratamientos de luz/oscuridad.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Material biológico

Para todos los análisis se utilizaron plantas de *Daucus carota* (zanahoria) variedad Nantes cultivadas en tierra en una cámara de cultivo vegetal.

2.1.2 Reactivos, insumos y equipos

Se utilizaron reactivos para biología molecular y análisis de diversas marcas (Merck, Favorgen, Stratagene, Fermentas, Fermelo, Promega y Omega-Biotek). Para los experimentos de tiempo real se utilizaron los siguientes insumos: puntas de micropipeta con filtro (Neptune), tubos Eppendorf de 1,5 y 0,2 mL, tubos y tapas ópticos en tiras de 8 pocillos contiguos (Stratagene) y guantes dispensables.

Entre los equipos se cuenta un autoclave para esterilizar soluciones y tierra, una centrífuga refrigerada (Universal 32 R Hettich), un termociclador convencional MyCycler™ (Bio Rad) y un termociclador acoplado a un sistema óptico de detección, Mx3000P™ (Stratagene) cuyas características se detallan a continuación.

2.1.2.1 Termociclador acoplado a un sistema óptico de detección: Mx3000P™

El equipo utilizado para hacer los experimentos de RT-PCR cuantitativo corresponde a un termociclador Mx3000P™ (Stratagene), el cual posee un sistema óptico compuesto por una lámpara halógena de cuarzo-tungsteno y un único tubo fotomultiplicador (PMT), además de incluir cinco filtros que permiten una separación

óptima entre las sondas. Este equipo entrega una alta resolución de datos al utilizar la sonda SYBR® Green (para la cual se utiliza el filtro FAM).

El programa incorporado permite la visualización de los datos en múltiples formatos (gráficos de amplificación, intensidad de fluorescencia, reportes de texto y curvas de disociación, entre otros), lo cual facilita un análisis eficaz de la validez de los datos, así como de la amplificación específica.

Además provee variados algoritmos que son usados para mejorar los resultados, tales como "umbral basado en la amplificación" (Amplification-based threshold) y "referencia adaptable" (Adaptive baseline). El primero de estos determina la porción de los gráficos de amplificación donde todas las curvas de datos exhiben un aumento exponencial en la fluorescencia (para hacer esto el software determina el cambio de fluorescencia en cada curva corregida por la línea de referencia, determinando un punto justo encima de la referencia como un 0% de amplificación y al máximo de la primera derivada como un 100% de amplificación). Por defecto, el rango de búsqueda del algoritmo cae en los cambios de fluorescencia entre 5 y 60%. Luego, el algoritmo calcula el valor umbral que minimiza la desviación estándar en los valores de Ct para cada set de réplicas.

El algoritmo de "referencia adaptable" se usa debido a que para cada gráfico los datos de fluorescencia "cruda" dentro de un determinado rango de ciclos es ajustada a una recta, usando un algoritmo lineal de media por mínimos cuadrados para producir una línea de referencia. El valor de la línea referencial es calculado para cada ciclo y restado de la fluorescencia "cruda" para generar la fluorescencia corregida por la línea referencial (dR). El algoritmo "referencia adaptable" permite que el

programa automáticamente determine el rango de ciclos óptimo para la línea de referencia, para cada sonda en cada experimento, resultando en el valor de Ct más preciso para cada combinación de pocillo/sonda (MxPro™ QPCR Software Instruction Manual, Software versión 3.00, Stratagene).

2.2 Métodos

2.2.1 Cultivo de las plantas de *Daucus carota* variedad Nantes

Se sembraron semillas previamente hidratadas de *D. carota* vd. Nantes en tierra, separadas una de otra cada 2 centímetros (cm) aproximadamente en varios maceteros de 25 cm de diámetro y 30 cm de profundidad, rellenos con una mezcla esterilizada y húmeda de tierra de hoja y vermiculita en proporción 3:1. El cultivo se realizó en un invernadero cerrado, especialmente acondicionado para tal propósito, con una temperatura constante de 22° y fotoperiodo de 16 horas luz. El régimen de riego fue el necesario para mantener la tierra de los maceteros húmeda. No se aplicaron fertilizantes ni acondicionantes a la tierra y tampoco se utilizaron insecticidas o herbicidas durante el cultivo.

2.2.2 Síntesis de cDNA de las raíces y las hojas de las plantas de *D.carota*.

2.2.2.1 Extracción de RNA

Luego de cuatro semanas post-sembrado se tomaron muestras de la hoja y la raíz de nueve plantas para sintetizar cada uno de los siguientes cDNAs: hoja luz (H/L), raíz oscuridad (R/O) y raíz luz (R/L). La muestra de raíz luz se tomó de la porción de raíz modificada (justo debajo de los cotiledones) que se desarrolló en exposición a la luz, mientras que la muestra de raíz oscuridad se obtuvo del mismo tejido, pero

desarrollado bajo tierra. Además, se obtuvo una cuarta muestra biológica, hoja oscuridad (H/O), para la cual se sometieron a oscuridad hojas de cuatro semanas de desarrollo durante 48 horas, envolviendo una hoja por planta en papel aluminio. Todas las muestras se recolectaron a partir de las mismas nueve plantas, separándose luego las muestras en tres grupos de tres muestras cada uno, para obtener un total de tres réplicas biológicas por cada una de las cuatro condiciones.

Para las muestras de ocho y doce semanas de cultivo se siguió el mismo protocolo.

La extracción de RNA_m para cada réplica biológica se realizó utilizando el Kit RNA-So/v® Reagent (Omega Bio-tek), el cual consiste en una extracción fenólica y posterior precipitación con isopropanol. El procedimiento se llevó a cabo a partir de aproximadamente 100 mg de cada tejido, los cuales fueron pulverizados en morteros estériles, en presencia de nitrógeno líquido. Luego, se agregó 1 mL del reactivo a 4°C y se traspasó el homogenizado a un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Se agregaron 200 µL de cloroformo a 4°C y se agitó durante 15 segundos. Posteriormente, se incubó la extracción en hielo durante 10 minutos, tras los cuales se centrifugó por 15 minutos a 12.000 g a 4°C. El sobrenadante se rescató en un tubo limpio y se precipitó durante 20 minutos a -20°C, utilizando 500 µL de isopropanol frío. Luego, se centrifugó durante 10 minutos en las mismas condiciones previas, se lavó el precipitado obtenido con etanol 80% (en agua libre de nucleasas), se centrifugó durante 3 minutos a 12.000 g y se dejó secar el precipitado hasta eliminar la totalidad del etanol. Finalmente, se resuspendió cuidadosamente el precipitado en 15 µL de agua libre de RNasa.

La calidad de la extracción de RNAm se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Lafken) teñido con bromuro de etidio, a 60 V durante 10 minutos. Se cargaron 3 μ L de muestra junto a 0,5 μ L de tampón de carga (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilen cianol, 15% glicerol). Los geles fueron observados y fotografiados bajo luz UV en un transiluminador con cámara fotográfica incorporada (SYNGENE). La calidad de las muestras se evaluó según la presencia nítida de las tres bandas características de una muestra de RNA íntegra y de buena calidad, correspondientes a los RNA ribosomales de 23 y 18S y al RNA de transferencia. Posterior a la verificación de la calidad de las muestras, se determinó su concentración mediante espectrofotometría en un equipo NanoDrop™ a 260 nm con el fin de determinar el volumen de extracción a utilizar para la transcripción reversa, de manera tal que todas los cDNAs fueran sintetizados a partir de la misma cantidad de RNA (2 μ g). Además se consideraron las razones 260/280 y 260/230 de cada muestra para evaluar la posible presencia de proteínas contaminantes (absorbancia a 280 nm) o de compuestos fenólicos en la muestra (absorbancia a 230 nm). Las muestras de RNA que presentaron el bandeo característico en el gel, además de valores de la razón $260/280 \geq 1,9$ fueron seleccionadas para sintetizar los cDNA correspondientes.

2.2.2.2 RT-PCR

Una alícuota de 2 μ g de RNA, el cual fue tratado con DNasa I por 20 minutos a 37°C (1 μ L de DNasa I (1u/ μ L, Fermentas), 1 μ L de Tampón 10x de la DNasa I con $MgCl_2$ (Fermentas) y agua libre de nucleasas necesaria para completar 10 μ L), se utilizó para sintetizar la hebra complementaria del RNAm utilizando el programa "RT-PCR" (Tabla 1, Sección 2.2.3.3).

Se agregaron 5,5 μL de cada una de las reacciones anteriores más 1 μL de oligo AP (5'-cgccacgcgctcgactagctactttttttttttttt-3') a tubos de PCR (Eppendorf de 0,2 mL) y se sometieron al paso inicial del protocolo RT-PCR. El programa se detuvo tras el paso 1 del segmento 2 y una vez que la temperatura bajó a 25 °C se agregaron 13,5 μL del mix RT (4 μL de Tampón 5x ImProm-II, 2,5 μL de MgCl_2 50 mM, 1 μL de dNTPs (Fermentas), 6,25 μL de agua libre de nucleasas y 1 μL de la enzima Transcriptasa reversa ImProm-II (Promega) a los tubos y se continuó con el programa.

2.2.2.3 Verificación de la síntesis de cDNA

Para verificar la calidad de los cDNAs sintetizados, se realizó un PCR convencional utilizando el protocolo "PCR1" (Tabla 1) con Taq DNA polimerasa (Favorgene) y los partidores específicos para el gen de ubiquitina (ubiq-F y ubiq-R) que amplifican un fragmento de 121 pb en la zona codificante del gen de ubiquitina (*ubi*). Se incluyeron los siguientes controles: 1) control positivo (C+), un cDNA previamente sintetizado y corroborado; 2) control negativo sin molde (C-) y 3) control de la transcripción reversa (S/RT). Para este último, se agregaron 2 μL de RNA como molde, en lugar de cDNA. Este último control se utiliza para determinar la presencia de DNA génomico remanente de la extracción de RNA, ya que el RNA se degrada con la temperatura de denaturación de la reacción (95°C), por lo que cualquier amplificado en esta condición correspondería a DNA contaminante.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μL , en los cuales se incluyeron 2,5 μL de Tampón 10x (Favorgene), 0,5 μL de dNTPs (Fermentas) 0,5 μL del partidador ubiqF, 0,5 μL del partidador ubiqR, 0,2 μL de Taq DNA polimerasa (Favorgene, 5U/ μL), 18,3 μL de agua libre de nucleasas y 2 μL de muestra (cDNAs a

verificar, agua libre de nucleasas en el control negativo y RNA en el control de la transcripción reversa).

Ocho microlitros de cada reacción de PCR se sometieron a electroforesis por 20 minutos a 90 V en gel de agarosa al 1% preteñido con bromuro de etidio (Bret). El gel se observó y fotografió en el equipo SYNGENE.

2.2.3 RT-PCR cuantitativo

2.2.3.1 Diseño y prueba de los partidores específicos para los genes *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1*, *zds2*, *lcyb* y *ubi*.

Cada par de partidores se diseñó a partir de las regiones 5' o 3' no traducibles (NTR) de cada gen de *Daucus carota* subespecie sativus, anotadas en la base de datos del NCBI, generándose de esta forma partidores altamente específicos. Las secuencias escogidas se analizaron con el programa OligoAnalyzer 3.1 (IDT) con el fin de evitar aquellas secuencias que formaran homo o heterodímeros. Además se realizó un alineamiento contra la base de datos de la colección de nucleótidos (nr/nt) de NCBI mediante la herramienta bioinformática BLAST con lo cual se corroboró que cada partidador fuera específico para el gen objetivo. Las temperaturas de disociación de los partidores fueron obtenidas mediante el programa AmplifX 1.5.4, variando éstas entre los 55 y 57°C en promedio para cada par de partidores (por lo que la temperatura de hibridación escogida para hacer los PCR fue de 52°C). Los partidores se diseñaron para amplificar fragmentos de pequeño tamaño (100 a 150 pb aproximadamente).

Una vez sintetizados los partidores, éstos se probaron con el cDNA de una de las muestras biológicas, mediante el programa "PCR1" (Tabla 1) y la misma mezcla de

reacción descrita en el punto 2.2.2.3. Los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis, tal como fue descrito anteriormente.

Los números de acceso de los genes anotados en la base de datos de NCBI son: DCU68751 (*ubi*), DQ192186 (*psy1*), DQ192187 (*psy2*), DQ222429 (*pds*), DQ222430 (*zds1*), DQ192189 (*zds2*) y DQ192190 (*lcyb*). Los partidores utilizados en este seminario se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencia y características de los partidores utilizados. La letra F hace referencia a partidor en sentido, mientras que la letra R hace referencia al partidor antisentido.

Gen objetivo	Partidores	Secuencia (5'→3')	Tm partidor (°C)	Fragmento esperado (pb)	Tm fragmento (°C)
<i>ubi</i>	ubiq-F	gctcgaggacggcagaac	57,6	121	84
	ubiq-R	cttgggcttggtgtaggtctc	57,2		
<i>psy1</i>	psy1q-F	agtcgatggagcattaccataattc	55,1	95	72
	psy1q-R	ctaattgggttacagaggggtgtgta	56,4		
<i>psy2</i>	psy2q-F	gctaataaactccgtgggtgttc	56,4	112	75
	psy2q-R	gctggagttagtgtacctc	54,1		
<i>pds</i>	pdsq-F	tctccacctccttcattcagictaa	56,7	95	72
	pdsq-R	gcaaaatgaagtcgctatgtgtct	56,4		
<i>zds1</i>	zds1q-F	gaattcaacgaccttgcgaaaaac	56,4	106	77
	zds1q-R	ctagtggtccgaatacagctataacg	56,9		
<i>zds2</i>	zds2q-F	accggatcagaattccicgaat	55,6	91	73
	zds2q-R	ttctcgtggtcaatacaattatacaatg	54,7		
<i>lcyb</i>	lcybq-F	tgagtgcagcttacacctacttgatta	58	161	75
	lcybq-R	aactgcagaagatattggaga	50,8		

2.2.3.2 Determinación de la eficiencia de los partidores

A partir de cada fragmento génico amplificado por PCR convencional se realizaron cinco diluciones seriadas (1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000), utilizando agua libre de nucleasas. Con estas diluciones se realizaron ensayos de RT-PCR cuantitativo utilizando el protocolo "PCR cuantitativo en tiempo real" (Tabla 1) en el termociclador Mx3000P™ (Stratagene) y utilizando el Kit Brilliant® SYBR-Green® QPCR Master Mix (Stratagene), el cual incluye un Master mix con una DNA polimerasa, tampón de la enzima, dNTPs y ROX (sonda pasiva).

La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 25 µL (12,5 µL de 2x Master Mix, 9,425 µL de agua libre de nucleasas, 0,35 µL de partidor sentido 10 µM, 0,35 µL de partidor antisentido 10 µM, 0,375 µL de una dilución 1/2000 de ROX 1 mM y 2 µL de cada dilución), según las instrucciones del fabricante.

Cabe mencionar que a mayor concentración de la muestra se obtiene un valor de Ct menor, ya que se sobrepasa antes el valor de fluorescencia basal.

La eficiencia (E) de cada par de partidores se obtuvo a partir de la pendiente de la recta obtenida al graficar el ciclo umbral (Ct) de cada dilución vs. el número de dilución. La siguiente ecuación explica cómo se obtiene la eficiencia de cada par de partidores.

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

Ec. 1

2.2.3.3 Ensayos de RT-PCR cuantitativo

Para realizar el RT-PCR cuantitativo se usó el Kit Brilliant® SYBR-Green® QPCR Master Mix (Stratagene), utilizando el programa que incluye la realización de

una curva de disociación al final del experimento. En el tipo de experimentos realizados se obtiene una cuantificación relativa de los niveles de RNAm, por lo cual no es necesaria la realización de curvas de calibración.

Todas las reacciones fueron realizadas en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal en la mayor esterilidad posible y con puntas con filtro selladas. Posteriormente las reacciones fueron congeladas a -20°C y llevadas al laboratorio de Bioquímica, Departamento de Genética Molecular y Microbiología (Casa Central de la Pontificia Universidad Católica de Chile), donde se nos facilitó el termociclador Mx3000P™.

Los ensayos cuantitativos se realizaron para los seis genes carotenogénicos, además de *ubi* (gen normalizador), en las cuatro muestras biológicas (H/L, H/O, R/L y R/O) de los tres estados de desarrollo definidos (4, 8 y 12 semanas). Cada muestra biológica se evaluó en triplicado biológico y duplicado técnico (obteniéndose seis valores para cada muestra en cada estado de desarrollo al analizar un gen en particular). El programa utilizado fue el mismo detallado en el punto 2.2.3.2, al igual que la mezcla de reacción de PCR (en este caso se reemplazaron los 2 μL de cada dilución seriada por 2 μL de una dilución 1/10 de cada cDNA). Se realizó un control negativo, denominado NTC (con su respectiva réplica técnica) para cada gen analizado, al cual se le agregaron 2 μL de agua libre de nucleasas en lugar de 2 μL de una dilución de cDNA. Además, se realizaron controles de la calidad de los cDNA, reemplazando los 2 μL de dilución por 2 μL de RNA de cada muestra, con el fin de confirmar la ausencia de DNA en las muestras de cDNA (previamente analizada durante el primer PCR control de la síntesis de cDNA, punto 2.2.2.3).

Tabla 2: Programas de PCR

A: RT-PCR

	Segmento 1	Segmento 2
Paso 1	70°C/ 5 minutos	42°C/ 60 minutos
Paso 2	25°C/ 5 minutos	70°C/ 15 minutos
Nº de ciclos	1	1
Detección	No	No

B: PCR1

	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Paso 1	95°C/ 5 minutos	95°C/ 50 segundos	72°C/ 8 minutos
Paso 2		52°C/ 50 segundos	
Paso 3		72°C/ 50 segundos	
Nº de ciclos	1	36	1
Detección	No	No	Posterior al paso 1, mediante Bret

C: PCR cuantitativo en tiempo real

	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Paso 1	95°C/ 10 minutos	95°C/ 30 segundos	95°C/ 1 minuto
Paso 2		52°C/ 30 segundos	52°C/ 30 segundos
Paso 3		72°C/ 30 segundos	95°C/ 30 segundos
Nº de ciclos	1	40	1
Detección	No	Al final del paso 2, por fluorescencia.	Desde el paso 2 al 3, por fluorescencia

2.2.4 Análisis de los datos de RT-PCR cuantitativo

2.2.4.1 Verificación del experimento

Se analizó la fluorescencia de los datos obtenidos, verificándose primeramente que sus valores se encontraran entre 3.000 y 45.000 unidades de fluorescencia, ya que la señal de fluorescencia se satura a 65.536 unidades de fluorescencia y pierde precisión por sobre las 45.0004 (MxPro™ QPCR Software Instruction Manual, Software versión 3.00, Stratagene). Luego, se observaron las curvas de amplificación, las cuales poseen una forma sigmoidea característica y finalmente las curvas de disociación de cada fragmento génico, en las cuales se grafica la primera derivada negativa de la fluorescencia versus la temperatura y es posible observar la presencia de una única y aguda señal para cada fragmento génico, a una determinada temperatura de disociación (T_m) y correlativo con la temperatura calculada teóricamente.

Finalmente, se observaron los datos para los controles negativos. Idealmente, la fluorescencia de éstos no debiera sobrepasar la línea umbral, pero es posible que esto ocurra debido a contaminaciones o la formación excesiva de dímeros de los partidores. En los casos en que se observó algún amplificado en estos controles, se determinó a qué producto correspondía mediante la curva de disociación. Se tomó como criterio de confiabilidad de los datos obtenidos cuando el C_t del producto amplificado en los controles negativos aparecía 10 ciclos más tarde que los de las muestras (Introduction to Quantitative PCR: Methods and application guide, Stratagene 2007).

2.2.4.2 Determinación de la fluorescencia basal

Para poder comparar datos de diferentes experimentos utilizando los ciclos umbrales (Ct) en los PCR cuantitativos comparativos, es necesario utilizar la misma fluorescencia basal (Bustin, 2004).

Con este objetivo se analizaron las fluorescencias ajustadas automáticamente por el programa para cada experimento realizado y se observó la mínima fluorescencia basal que permitiera la detección de los datos, la cual resultó ser de 0,216 unidades de fluorescencia dRn (normalizada por la referencia adaptable y la sonda pasiva ROX).

2.2.4.3 Calibración y normalización de los datos.

Se utilizaron dos algoritmos al obtener los Ct. El primero fue el del “umbral basado en la amplificación” y el segundo el de “referencia adaptable”, detallados previamente.

Una vez normalizadas las fluorescencias y obtenidos los Ct, se procedió a realizar los cálculos para poder determinar los niveles de RNAm de cada gen, normalizados con respecto a los niveles de RNAm de *ubi* (gen normalizador) y calibrados.

La utilización del gen *ubi* como normalizador se realiza exclusivamente para regular posibles diferencias debido a la utilización de supuestas cantidades variables de cDNA, debidas a posibles variaciones en la extracción y cuantificación del RNA y a la eficiencia de la transcripción reversa (Introduction to Quantitative PCR: Methods and application guide, Stratagene 2007).

Los valores de Ct fueron incorporados en la Ecuación 2 determinada por Pfaffl (2001), junto a los valores de eficiencia de cada par de primers, que fueron determinados previamente. Luego, se determinaron los grupos de datos a comparar y se decidió cual sería el calibrador en cada caso (ver punto 2.2.4.3). En los casos en que el equipo arrojó como resultado "NO CT" para alguna reacción, es decir no hubo fluorescencia asociada a la reacción de PCR, en la fórmula se le asignó un valor de Ct de 40 para poder realizar los cálculos, ya que un valor de 0 sería incorrecto, debido a que indicaría un valor de Ct muy pequeño asociado a una mayor acumulación de mensajero. Además, al incorporar un valor de 0 en la sección Ct_{gen objetivo}, se anula el valor completo para la razón en la Ec. 2. El número "40" se escogió porque se realizaron 40 ciclos de amplificación (segmento 2 del programa PCR cuantitativo en tiempo real).

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

Al realizar los experimentos de cuantificación relativa es necesario utilizar un calibrador. En este tipo de experimentos, la concentración relativa del RNAm del gen de interés se compara con la de una muestra control (calibrador). De esta forma, el calibrador actúa como una referencia de expresión de un gen objetivo determinado. En la mayoría de los casos, se utiliza como calibrador los niveles de expresión en el tiempo 0 o bien una condición sin tratar. Usando esta aproximación, las diferencias de acumulación de mensajero entre una muestra y el calibrador son expresadas como razones de cambio. Además de la utilización de un calibrador, se hace necesaria la normalización de los datos con respecto a un gen control de expresión constitutiva

tanto en las muestras como en el calibrador (*ubi* en este caso), como fue descrito previamente.

Dado que en los experimentos realizados durante este seminario de título se analizaron los niveles de RNAm de seis genes carotenogénicos en la planta de *Daucus carota* a las 4, 8 y 12 semanas de cultivo, no existe una condición sin tratar o un tiempo 0, ya que todos los tiempos analizados son de interés. Por esta razón hubo que determinar una forma alternativa de escoger el calibrador, llegándose a la conclusión de que el calibrador debía ser específico para cada grupo de datos a comparar. Es decir, el calibrador es diferente en todos los gráficos, por lo que los resultados de un gráfico no son comparables con los de otros.

En la mayor parte de los análisis realizados, el calibrador corresponde a la media aritmética de todas las réplicas en comparación.

2.2.4.4 Gráficos y análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los valores de Ct y de las razones de expresión obtenidas se realizaron mediante el programa estadístico NCCS 2007 (Hintze, 2007). Los datos de abundancia relativa de los RNAm fueron graficados mediante el programa GraphPad Prism.

Primeramente se analizó la normalidad de los valores de Ct comparados en cada gráfico, con el fin de validar estadísticamente el uso de su media aritmética como calibrador. Posteriormente, se analizó la normalidad y homocedasticidad de varianza de las razones graficadas y se determinó que no todos los grupos comparados poseían una distribución normal. Con el fin de obtener un análisis estadístico preciso, se utilizó el análisis de datos no-paramétricos de Kruskal Wallis, con post-test de Dunn

($p < 0,05$) cuando se compararon tres o más grupos de muestras, y un test de T no pareado con corrección de Welch cuando se compararon 2 grupos de datos. Este tipo de análisis estadístico funciona al comparar en dos grupos la diferencia entre los promedios con el error estándar de las diferencias. La corrección de Welch se utiliza para no asumir que los dos grupos de datos poseen igual varianza. Se considera que los dos grupos son significativamente distintos si poseen un valor p de dos colas $< 0,05$. Las diferencias significativas fueron indicadas con letras distintas o asteriscos en los gráficos.

3. RESULTADOS

3.1 Desarrollo de las plantas de *Daucus carota*

El curso del desarrollo de las plantas se siguió cuidadosamente durante tres meses, determinándose los tiempos en los cuales se presentaron los tres estados particulares a estudiar: 4, 8 y 12 semanas post siembra. Las plantas de 4 semanas se eligieron por ser plantas jóvenes inmaduras, en las que aún no se aprecia un engrosamiento de la raíz modificada. Las plantas de 8 semanas se escogieron por poseer un fenotipo intermedio entre las plantas juveniles y maduras y debido a que se ha descrito que en este estado ya se inicia la síntesis de los carotenoides y el desarrollo secundario de la raíz modificada (Baranska y col., 2006; Clotault y col., 2008). Por último, se eligieron las plantas de 12 semanas, tiempo en el cual la raíz modificada alcanza su desarrollo maduro (Clotault y col., 2008) y presenta elevados niveles de los carotenoides, lo cual se evidenció por su intensa coloración naranja.

Se observó que tras cuatro semanas post-siembra, las plántulas alcanzaron un crecimiento longitudinal de aproximadamente 10 cm, presentando un tallo por encima de los dos cotiledones que abarcaba aproximadamente la mitad de la extensión total de la planta y que terminaba apicalmente en una o dos hojas desarrolladas, y una raíz de igual longitud y grosor que el tallo (1 mm, Figura 3A). El tallo presentaba una coloración verde claro, mientras que la raíz era de color blanco (Figura 3A). Luego, a las ocho semanas post-sembrado, se observó el inicio del engrosamiento de la raíz expuesta a oscuridad y un leve cambio en su coloración, tornándose ésta de color amarillo. La porción de la raíz que quedaba por sobre la tierra y expuesta a la luz no presentó cambios en su grosor, pero sí en su coloración exterior, ya que se observó

el desarrollo de una película de color púrpura (Figura 3B). Debajo de esta película, la raíz modificada expuesta a la luz conservaba su coloración verde.

A las doce semanas ya fue posible observar las plantas con características maduras, aunque de menor tamaño que las plantas cultivadas con fines comerciales, debido a su desarrollo en un espacio reducido (macetero). Estas plantas poseían raíces modificadas de mayor grosor, aroma e intensa coloración naranja en su porción expuesta a la oscuridad, mientras que la porción desarrollada en la luz presentaba un leve aumento en su grosor en comparación al estado de 8 semanas, pero presentaban aún una coloración verde, debajo de la capa color púrpura (Figura 3C). Estas plantas presentaron además un mayor número de hojas, las cuales presentaban la misma morfología que las de las plantas en los estados previos de desarrollo, aunque su textura era más gruesa y su coloración verde de mayor intensidad (datos no mostrados).

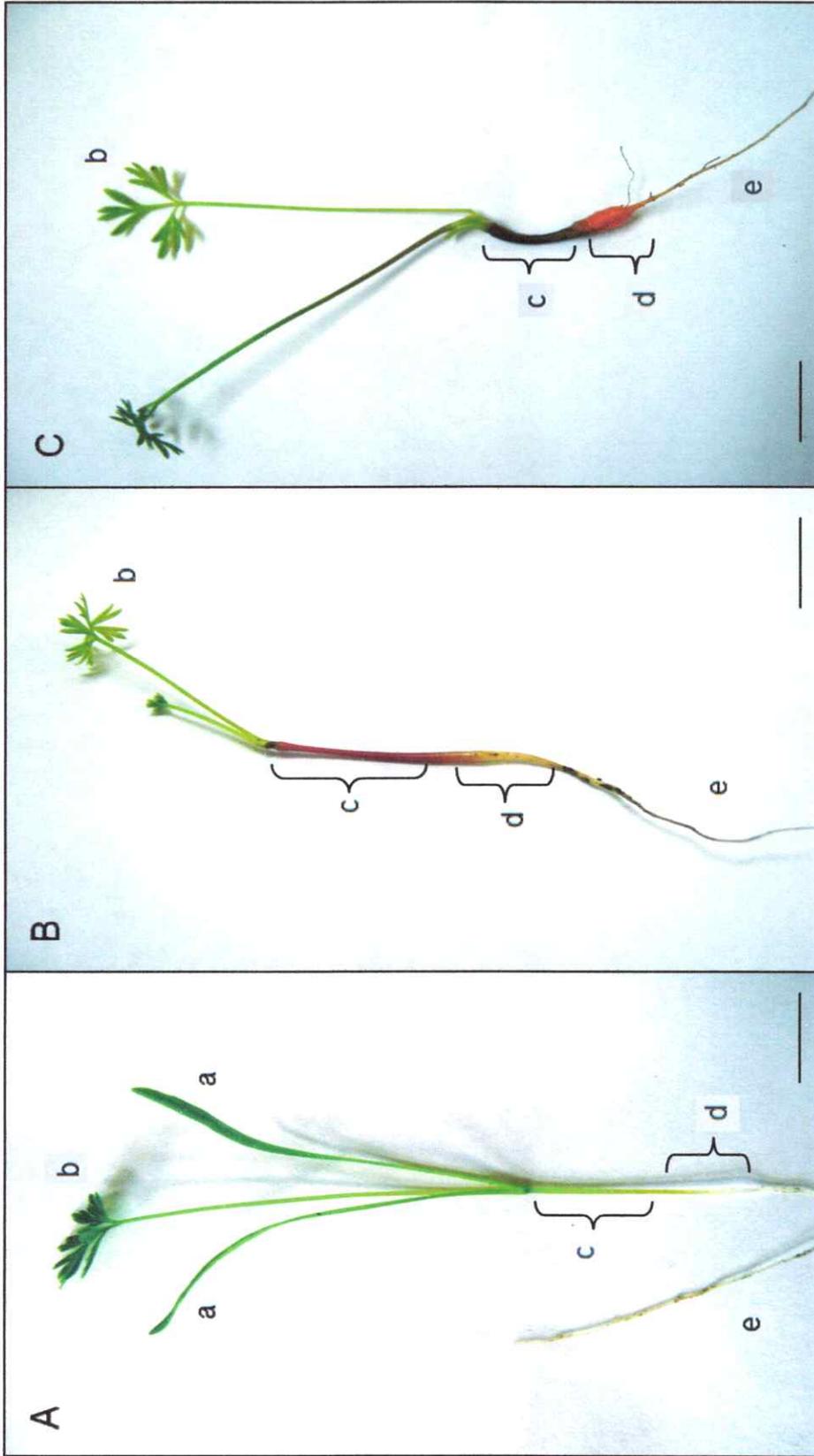


Figura 3. Desarrollo de las plantas de *D. carota*. (A) Cuatro semanas de cultivo. (B) Ocho semanas de cultivo. (C) Doce semanas de cultivo. a: cotiledones; b: hoja; c: raíz desarrollada en luz; d: raíz modificada desarrollada en oscuridad; e: raíz verdadera. La barra horizontal inferior representa 1cm.

3.2 RT-PCR cuantitativo

3.2.1 Diseño y prueba de los partidores específicos

Los partidores para amplificar los genes carotenogénicos fueron diseñados a partir de las regiones 5' o 3' no traducibles (NTR) de cada gen, ya que estas zonas presentan exclusividad génica, lo que permite la síntesis de partidores altamente específicos. Los partidores para el gen *ubi* fueron diseñados a partir de la región codificante del gen. Los partidores para los genes *psy1*, *psy2*, *pds* y *lcyb* fueron diseñados a partir de sus respectivas regiones 5' no traducibles, mientras que los partidores para *zds1* y *zds2* se diseñaron a partir de las zonas 3' no traducibles. Todos los partidores fueron diseñados de manera tal que amplificaran fragmentos de tamaños similares (entre 100 y 150 pb, lo cual es requisito de la técnica). Además, se realizó un PCR con una muestra de cDNA para verificar la amplificación efectiva y específica de cada par de partidores (datos no mostrados), probándose además la especificidad de cada partidador al realizar una curva de disociación al final de cada experimento de RT-PCR cuantitativo y correlacionando la temperatura reportada para cada fragmento con la estimada teóricamente.

3.2.2 Curvas de eficiencia de los partidores

En los experimentos de RT-PCR con cuantificación relativa existen dos modalidades de análisis: la primera considera que la eficiencia de los partidores es constante y del 100% para calcular la razón de la abundancia relativa al calibrador y normalizada por los niveles de un gen constitutivo, mientras que la segunda considera la eficiencia de cada par de partidores en la fórmula. Dado que en este seminario se evaluaron las abundancias relativas de 6 genes carotenogénicos en muestras de distintos tejidos (hoja y raíz) y en distintos estados de desarrollo, existieron ciertas

diferencias en las eficiencias de los partidores, por lo cual se escogió la segunda modalidad de análisis (Ecuación 2) para obtener resultados más confiables y comparables entre sí.

Con este fin se determinó la eficiencia de cada par de partidores, incluidos los del gen *ubi*, para lo cual se realizaron cinco diluciones seriadas (1/100, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000 1/1.000.000) de un fragmento amplificado por PCR de cada uno de los seis genes carotenogénicos, con sus respectivos partidores específicos. En la Figura 4A se ilustran las curvas de amplificación de cada una de las cinco diluciones seriadas para el gen *ubi*. En la Figura 4B se muestran las curvas de disociación (primera derivada negativa de la fluorescencia vs. temperatura) correspondientes a los productos de amplificación de cada dilución del PCR del gen *ubi*. La señal a 84°C corresponde al fragmento de 121 pb de *ubi*. En la Figura 5 se ilustran las curvas de disociación de los genes carotenogénicos que fueron analizados en este trabajo. Se observa un único producto de amplificación, lo que indica la especificidad de los partidores y de la reacción de PCR. Se obtuvieron temperaturas de disociación (T_m) de 73,8 °C, 75°C, 72,9°C, 78°C, 74,5°C y 75,9°C, para *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1*, *zds2* y *lcyb*, respectivamente. Estas temperaturas se correlacionan con las calculadas teóricamente, lo que corroboró la amplificación de un fragmento específico.

En base a las curvas de amplificación de los genes en diluciones seriadas (Figura 4A) se definió la eficiencia de amplificación de cada par de partidores. Para ello se graficó el Ct (ciclo en el cual la fluorescencia sobrepasa el nivel basal) obtenido para cada dilución (Materiales y Métodos sección 2.2.3.2). En la Figura 6 se ilustra el

gráfico resultante de este análisis para los partidores de *ubi*. Las eficiencias de los genes carotenogénicos se detallan en la Tabla 3.

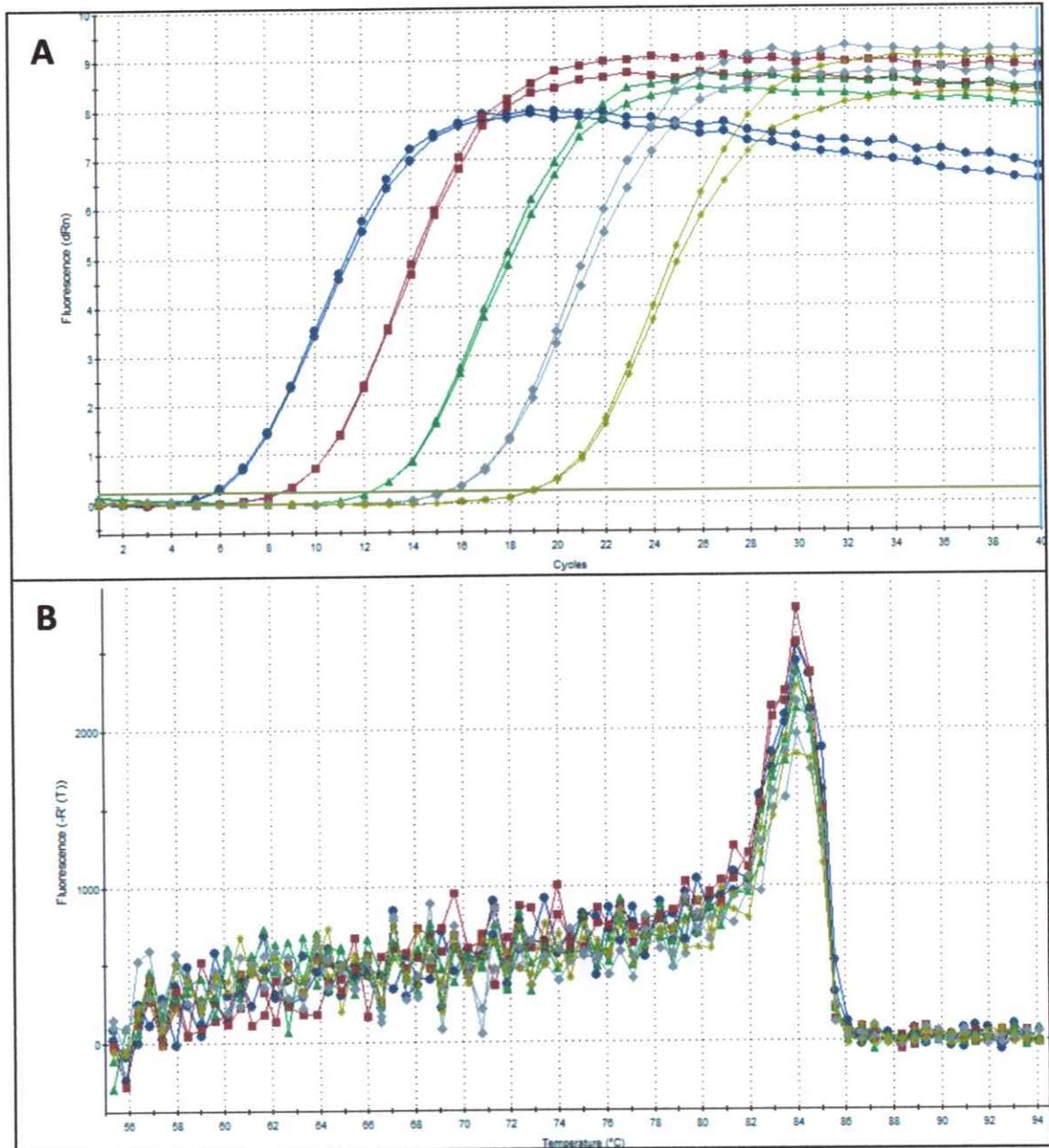


Figura 4. Curvas de amplificación y disociación del gen de la ubiquitina. (A) Curvas de la amplificación del fragmento del gen *ubi* de *D. carota*. En azul se ilustran dos curvas (réplicas técnicas) para la dilución 1/100 del fragmento. Las curvas sucesivas hacia la derecha corresponden a réplicas técnicas de las diluciones seriadas siguientes (1/1000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000). La línea horizontal en 0,216 unidades de fluorescencia (dRn) corresponde al nivel de fluorescencia basal; (B) Se ilustra la curva de disociación de los productos de amplificación de cada dilución del PCR del gen *ubi*.

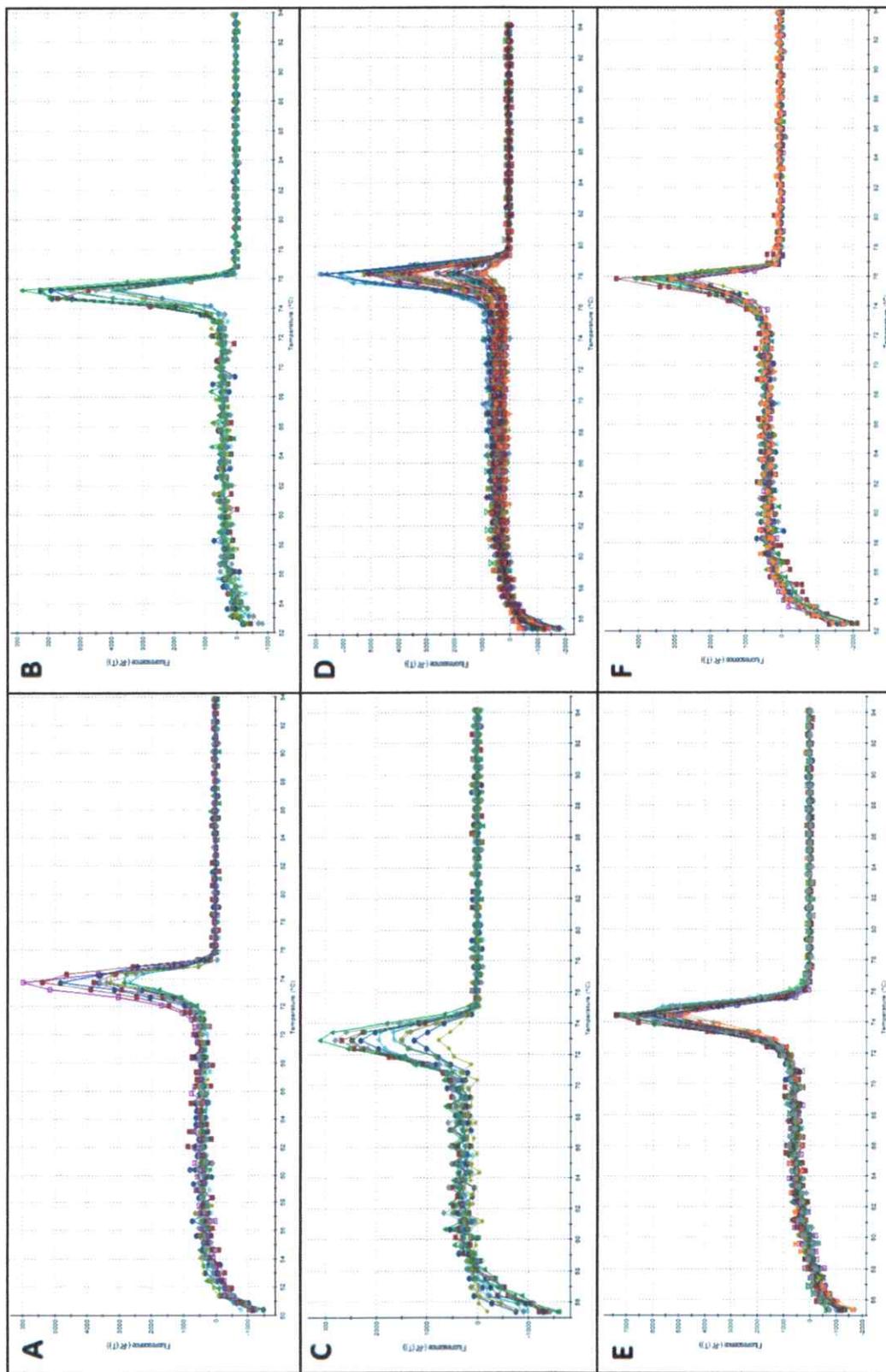


Figura 5. Curvas de disociación de los seis genes analizados. (A-F) Gráficos de la primera derivada negativa de la fluorescencia vs. la temperatura para *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1*, *zds2* y *lcyb*, respectivamente. En cada curva se observa una única señal correspondiente a cada fragmento génico específico.

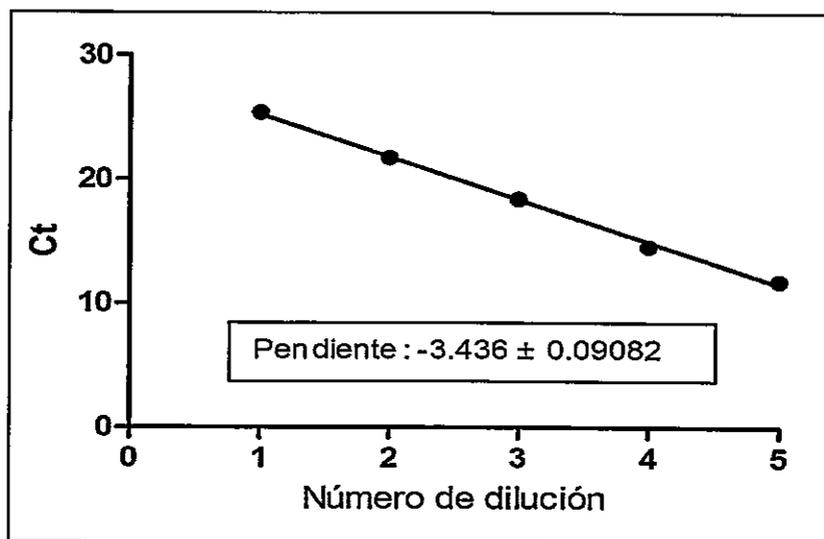


Figura 6. Curva de eficiencia de los partidores específicos para el gen *ubi*. La dilución 5 corresponde a 1 μ L de producto de PCR diluido 100 veces. Las diluciones 4 a la 1 corresponden a diluciones seriadas de 10 veces cada una. Ct: ciclo umbral en el cual se sobrepasa la fluorescencia basal.

Tabla 3. Eficiencia de amplificación de los partidores utilizados. Las eficiencias se calcularon según la Ecuación 1. Los valores oscilan entre 1,6 y 2,1 (rango teórico; Bustin, 2004).

Gen amplificado	Eficiencia
<i>ubiquitina (ubi)</i>	1,95
<i>fitoeno sintasa uno (psy1)</i>	1,86
<i>fitoeno sintasa dos (psy2)</i>	1,95
<i>fitoeno desaturasa (pds)</i>	1,76
<i>z-caroteno desaturasa uno (zds1)</i>	1,73
<i>z-caroteno desaturasa dos (zds2)</i>	1,79
<i>licopeno beta ciclasa (lcyb)</i>	1,82

3.2.3 RT-PCR cuantitativo de los genes carotenogénicos de *D. carota*

Luego de obtenidas las eficiencias de cada par de partidores, se realizaron los experimentos de PCR en tiempo real para cuantificar la abundancia relativa del RNAm de los genes carotenogénicos en cada tejido y tratamiento.

Los datos obtenidos en estos experimentos fueron verificados en varias etapas. La primera de estas fue corroborar que la fluorescencia sin normalizar estuviera en valores entre 3.000 y 45.000 unidades de fluorescencia (datos no mostrados). Luego se determinó una fluorescencia umbral mínima a todos los datos obtenidos, con el fin de poder realizar las comparaciones múltiples entre todos los datos. Esta resultó ser de 0,216 (dRn). Los valores promedio de Ct para el gen *ubi* fueron de $22,2 \pm 1,8$ ciclos, lo cual corrobora su carácter de constante a través de todos los tratamientos y valida su utilización como gen normalizador.

En los casos en que hubo amplificación en los controles negativos, los valores no fueron considerados y se repitió el experimento, salvo en los casos en que el Ct del control negativo apareciera al menos diez ciclos después del Ct de las muestras.

Una vez ajustada la fluorescencia basal y aplicados los algoritmos descritos en Materiales y Métodos (sección 2.2.4.3), los valores de Ct obtenidos fueron trasladados a una tabla en hoja de cálculo para aplicar la fórmula de Pfaffl (Ecuación 2, sección 2.2.4.3), determinar los calibradores a utilizar para cada grupo de datos graficado y obtener la razones de abundancia relativa de cada muestra (en relación al calibrador utilizado y normalizado por los niveles de *ubi*).

3.3 Expresión de los genes carotenogénicos durante el desarrollo de *Daucus carota*

La hoja de *D. carota* presenta elevados niveles de carotenoides, en especial α y β -caroteno (aproximadamente 100 $\mu\text{g/g}$ de peso seco de cada uno), al igual que la raíz modificada de 12 semanas, siendo el β -caroteno el principal carotenoide acumulado (600 $\mu\text{g/g}$ de peso seco).

Dada esta notable acumulación de carotenoides en toda la planta de zanahoria, en tejidos expuestos a luz y oscuridad y en distintos estados del desarrollo, resulta interesante determinar si existen niveles diferenciales de los RNAm de los genes carotenogénicos entre ambos órganos.

Para analizar comparativamente el efecto del desarrollo en los niveles del RNAm de los genes en una determinada condición biológica (las hojas desarrolladas en la luz o la raíz modificada desarrollada en la oscuridad), se graficó de manera conjunta los tres estados de desarrollo definidos, manteniendo constantes el gen analizado y la muestra biológica en cada caso. En estos gráficos, el calibrador utilizado es el promedio de todas las réplicas en los tres estados de desarrollo, siendo este único y diferente para cada gen en la misma condición biológica. De esta manera es posible comparar los tres estados entre sí para un mismo gen.

3.3.1 Niveles de RNAm de los genes carotenogénicos en las hojas durante el desarrollo de *D. carota*

Se determinó el perfil de los niveles del RNAm de cada gen en las hojas desarrolladas en la luz a las 4, 8 y 12 semanas del cultivo. En la Figura 7 se ilustran los niveles del RNAm de los genes *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1*, *zds2* y *lcyb* en las hojas.

Se observó un efecto significativo del desarrollo sobre los niveles del RNAm en todos los genes analizados. Los niveles del RNAm de *psy1*, *pds*, *zds2* y *lcyb* aumentaron en los estados más desarrollados (a las 12 semanas en comparación con los niveles a las 4 y/o 8 semanas de cultivo), mientras que los genes *psy2* y *zds1* presentaron un mayor nivel de RNAm en las hojas de las plantas juveniles (4 semanas de cultivo).

A las doce semanas del cultivo, los genes *psy1* y *lcyb* presentaron el mayor aumento en los niveles del RNAm con respecto a los dos estados de desarrollo anteriores (aproximadamente 10 y 16 veces, respectivamente). En cambio, los niveles del RNAm de los genes *pds* y *zds2* aumentaron a las 12 semanas solo con respecto a las 8 semanas de cultivo (56 y 7 veces, respectivamente). Por otra parte, los niveles del RNAm de los genes *psy2* y *zds1* fueron 5 a 8 veces mayores a las 4 semanas de desarrollo respecto a los estados del desarrollo posteriores.

Por lo tanto, el desarrollo de la hoja de *D. carota* ejerce un efecto diferencial en los niveles del RNAm de los seis genes analizados, produciendo un aumento en los niveles de RNAm de cuatro de ellos, y una disminución en los niveles de los otros dos.

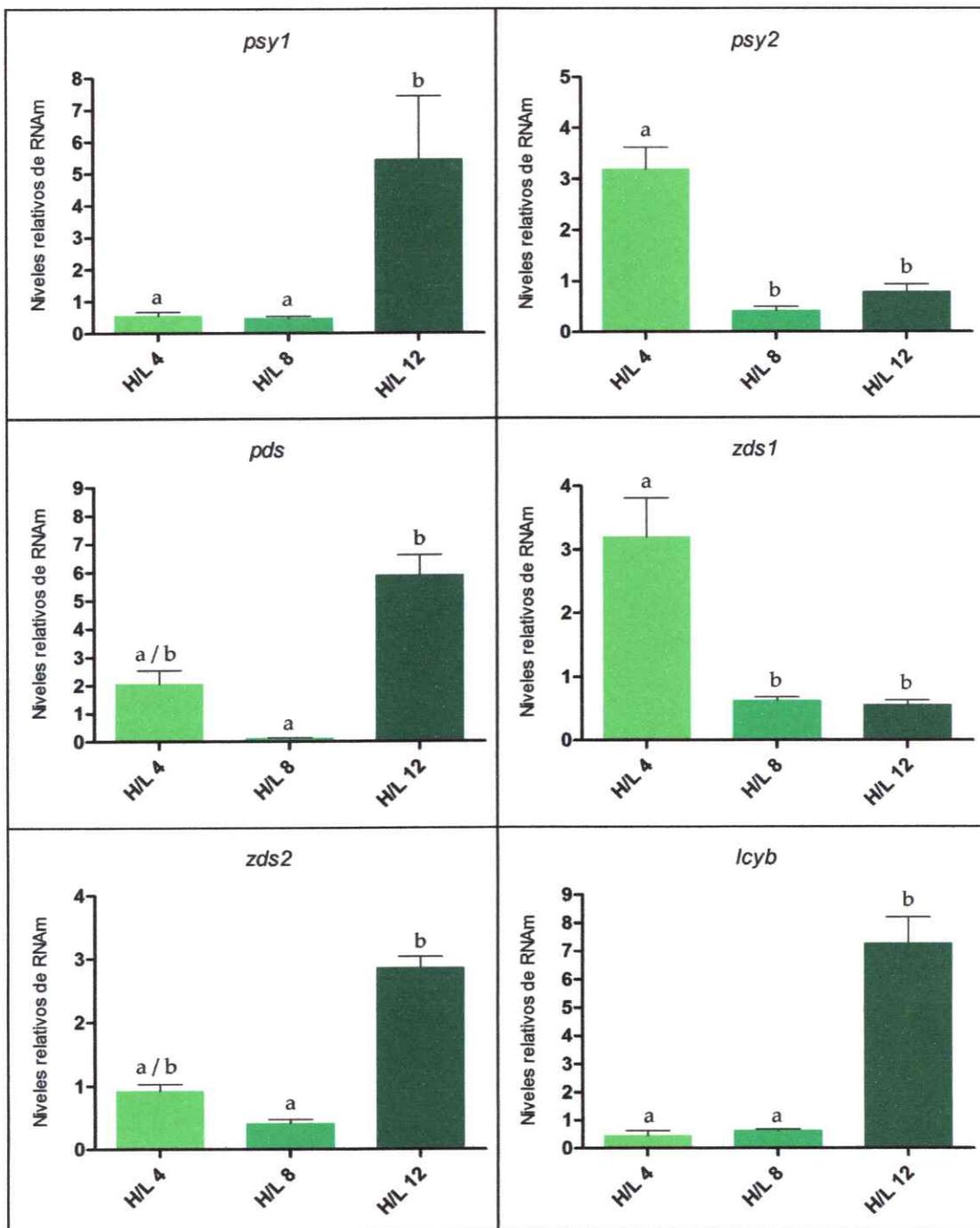


Figura 7. Los niveles de RNAm de los genes *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1*, *zds2* y *lcyb* durante el desarrollo de las hojas de *Daucus carota*. El calibrador utilizado en cada gráfico corresponde al promedio de las réplicas obtenidas en los tres estados de desarrollo. Distintas letras indican diferencias significativas determinadas por test de Kruskal Wallis y post-test de Dunn ($p < 0,05$).

3.3.2 Niveles de RNAm de los genes carotenogénicos durante el desarrollo de la raíz modificada de *D. carota*.

Al evaluar la expresión de los genes carotenogénicos en la raíz modificada de la zanahoria observamos que entre las cuatro y ocho semanas del desarrollo no se presentaron diferencias significativas para los genes analizados, excepto para *psy1*. Este resultado concuerda con la observación visual del desarrollo de la raíz modificada en la oscuridad, la cual alcanza su desarrollo maduro y acumulación de niveles elevados de los carotenoides a las 12 semanas del cultivo, mientras que a las 4 y 8 semanas no se observa un engrosamiento ni coloración naranja en ésta.

Al comparar una raíz no desarrollada (4 semanas) con una raíz modificada en estado maduro (12 semanas), se apreció un aumento significativo en los niveles del RNAm de todos los genes carotenogénicos, excepto *zds1*, desde 2 veces para el gen *psy1* hasta 12 veces para el gen *lcyb* (Figura 8).

Este resultado permite concluir que el desarrollo de la raíz modificada de zanahoria ejerce un efecto positivo en los niveles del RNAm de todos los genes carotenogénicos estudiados, excepto *zds1*. Esto difiere respecto a lo obtenido en la hoja, donde se observó una disminución de los niveles del RNAm de *psy2* y *zds1* vinculada al desarrollo.

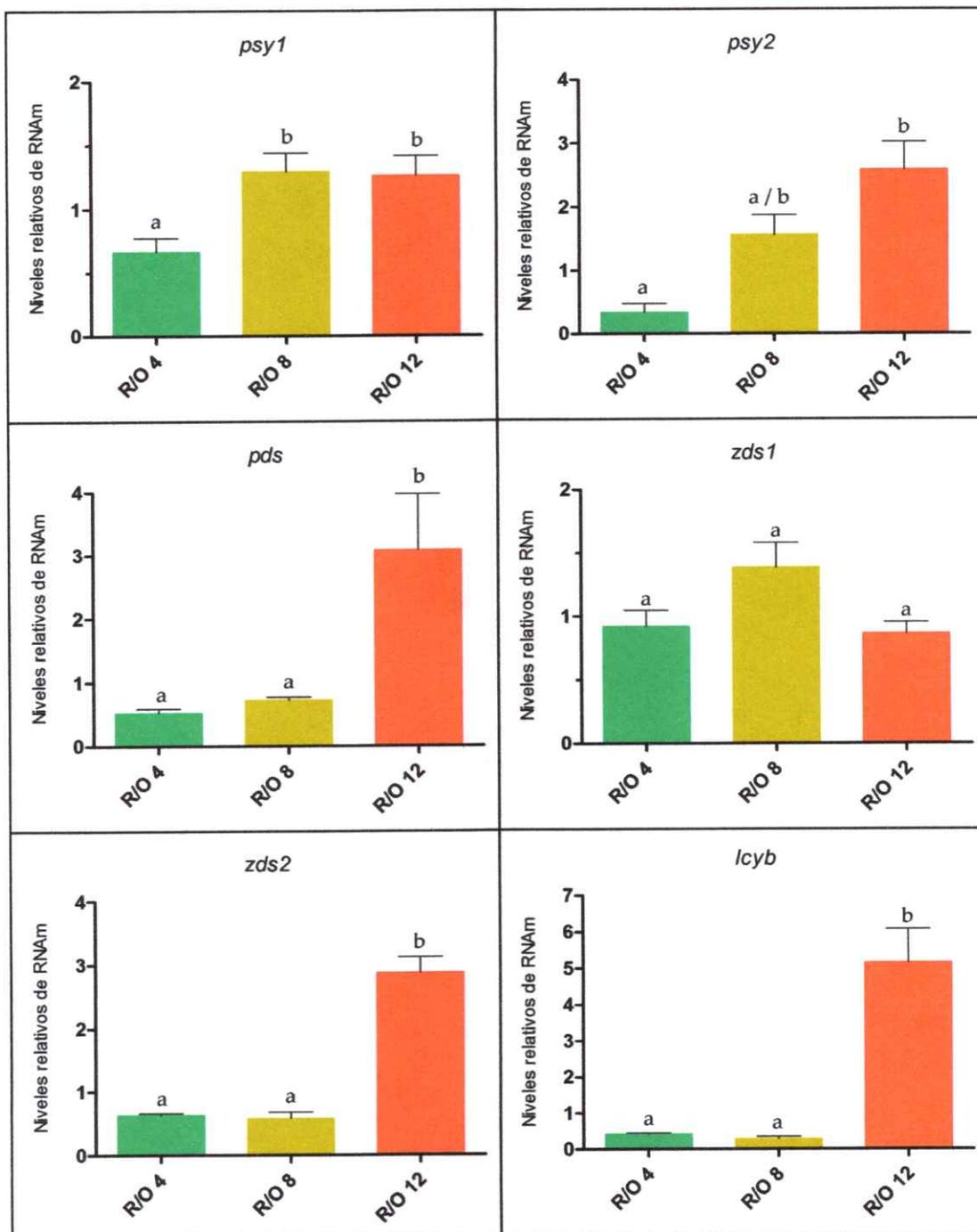


Figura 8. Los niveles de RNAm de los genes *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1*, *zds2* y *lcyb* durante el desarrollo en la oscuridad de la raíz modificada de *Daucus carota*. El calibrador utilizado en cada gráfico corresponde al promedio de las réplicas obtenidas en los tres estados de desarrollo. Distintas letras indican diferencias significativas determinadas por el test de Kruskal Wallis y post-test de Dunn ($p < 0,05$).

3.3.3 Niveles de RNAm de los genes carotenogénicos en las hojas y las raíces modificadas de *D. carota* a las doce semanas del cultivo.

La mayor acumulación de los carotenoides en la raíz modificada de la zanahoria ocurre cuando esta alcanza un estado de desarrollo maduro. Por esta razón, se determinaron él o los genes con la mayor expresión a las 12 semanas de cultivo.

En este estado de desarrollo, el gen *zds2* presentó niveles de RNAm mayores que los de los demás genes, excepto *psy2* (Figura 9A). Estas diferencias variaron entre 12 y 64 veces. Por otra parte, el gen *psy2* presentó niveles de RNAm 40 veces mayores que los del gen *lcyb*. No se observaron diferencias en los niveles de RNAm de los genes *psy1*, *pds*, *zds1* y *lcyb* (Figura 9A).

En la raíz modificada de igual estado de desarrollo, los genes *psy2* y *zds2* presentaron niveles de RNAm mayores que los genes *psy1*, *pds* y *lcyb*, con diferencias desde 27 veces entre los niveles de RNAm de *zds2* y *lcyb*, hasta 158 veces entre los niveles de RNAm de *psy2* y *psy1*. Por otra parte, el gen *zds1* presentó niveles de RNAm 10 veces mayores que los del gen *psy1*. Al igual que en las hojas de las plantas de 12 semanas de cultivo, no se observaron diferencias entre los niveles de RNAm de los genes *psy1*, *pds*, *zds1* y *lcyb* (Figura 9B).

Los resultados anteriores permiten concluir que *psy2* y *zds2* son los genes carotenogénicos con los mayores niveles de RNAm en una planta madura de zanahoria.

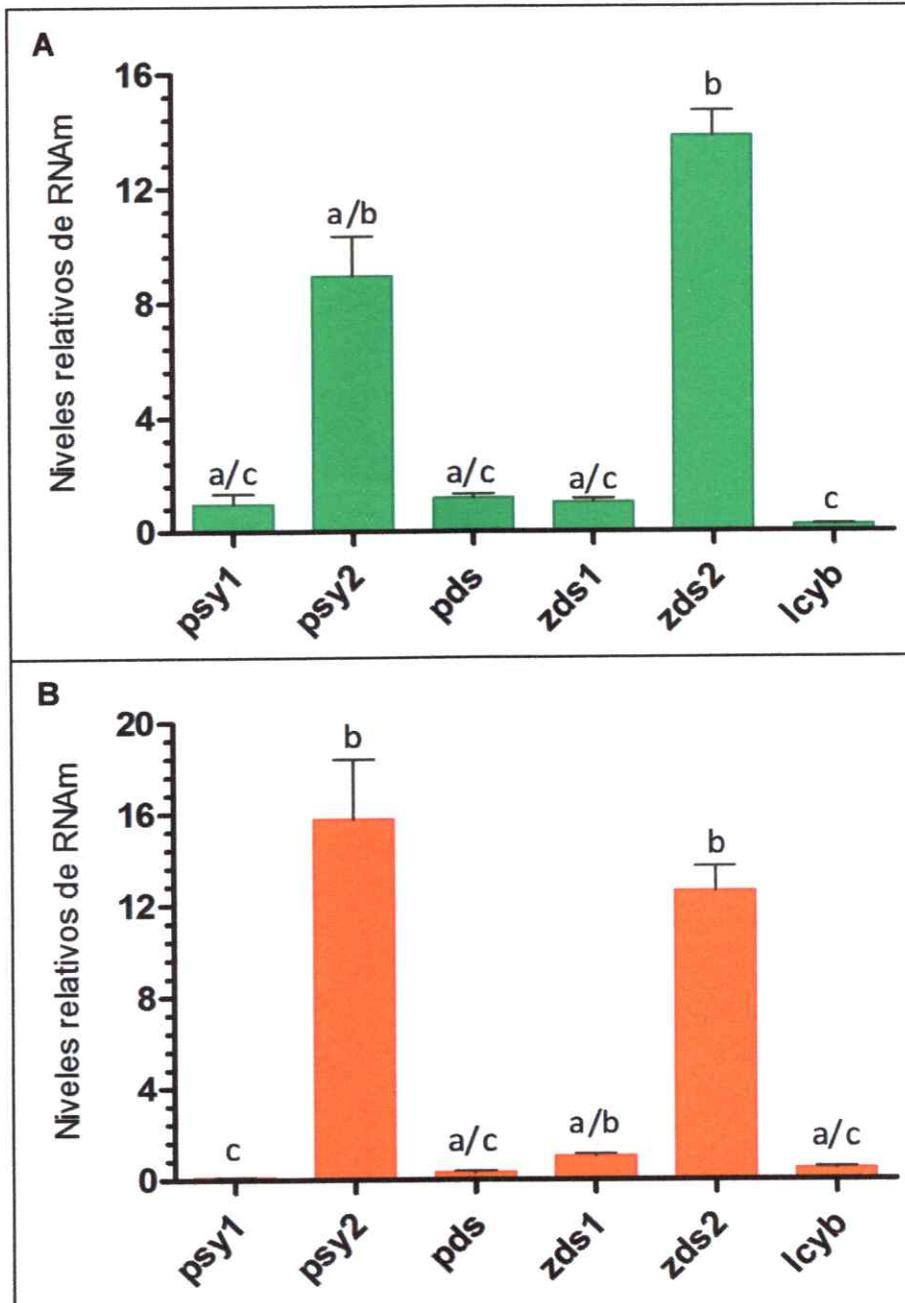


Figura 9. Los niveles de RNAm de los genes *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1*, *zds2* y *lcyb* a las 12 semanas de desarrollo en una planta sometida a condiciones normales de luz y oscuridad. (A) Los niveles registrados en las hojas desarrolladas en la luz, utilizando como calibrador el promedio de las réplicas de *zds1* en este órgano a las 12 semanas de cultivo. (B) Los niveles registrados en la raíz modificada desarrollada en la oscuridad, utilizando como calibrador el promedio de las réplicas de *zds1* en este órgano a las 12 semanas de cultivo. Distintas letras indican diferencias significativas determinadas por el test de Kruskal Wallis y post-test de Dunn ($p < 0,05$).

3.4 Evaluación del efecto de la luz sobre los niveles de RNAm de los genes carotenogénicos

Considerando que la luz inhibe el desarrollo de la raíz modificada de *D. carota* (Stange y col., 2008), decidimos evaluar el efecto que produce la luz sobre los niveles del RNAm de los seis genes carotenogénicos estudiados en la raíz de *D. carota*. Del mismo modo, evaluamos el efecto que produce la oscuridad en las hojas sobre los niveles de RNAm de los mismos genes.

Para ello, se cuantificaron los niveles de RNAm de los seis genes en las hojas sometidas al tratamiento de 48 hrs en oscuridad y en las raíces crecidas en presencia de la luz, a las cuatro, ocho y doce semanas del cultivo (Figuras 10 y 11).

3.4.1 El efecto de la luz en los niveles de RNAm de los genes carotenogénicos en las hojas de *D. carota* en los tres estados del desarrollo.

Al realizar el tratamiento de oscuridad en las hojas de las plantas de *D. carota* fue posible detectar cambios significativos en los niveles del RNAm de todos los genes en al menos un estado del desarrollo, excepto para el gen *lcyb* (Figura 10).

En las hojas de las plantas de cuatro semanas de cultivo sometidas a la oscuridad por 48 hrs. fue posible observar una disminución significativa en los niveles del RNAm de los genes *psy2*, *zds1* y *zds2* (46; 3,8 y 14,3 veces, respectivamente), mientras que los niveles del RNAm del gen *pds* aumentaron 2,4 veces (Figura 10).

En las hojas de las plantas de ocho semanas de cultivo no se observaron diferencias significativas al aplicar el tratamiento de oscuridad, excepto para los niveles del RNAm del gen *psy1*, que disminuyeron 4,3 veces (Figura 10).

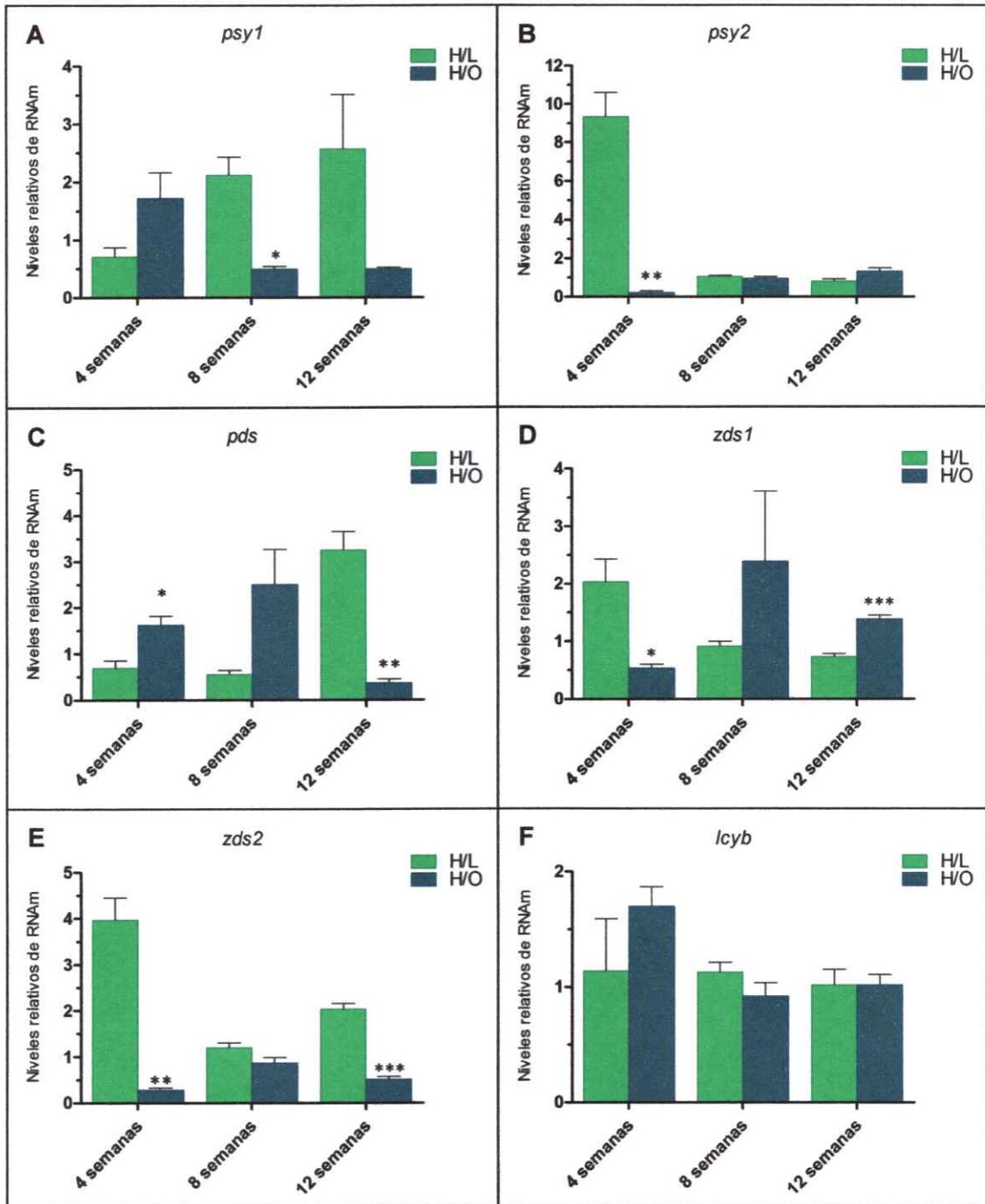


Figura 10. Los niveles de RNAm de los genes *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1*, *zds2* y *lcyb* en las hojas expuestas a la luz y la oscuridad a las 4, 8 y 12 semanas del desarrollo. El calibrador utilizado en cada gráfico corresponde al promedio de las réplicas de los tratamientos de luz y oscuridad para cada estado de desarrollo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los distintos tratamientos, determinadas por test de T no-pareado con corrección de Welch ($p < 0.05$).

Por otra parte, en las hojas de las plantas de doce semanas de cultivo sometidas al tratamiento de oscuridad, se observó una disminución en los niveles del RNAm de los genes *pds* y *zds2* (35,8 y 4 veces, respectivamente), mientras que se produjo un leve aumento de 1,9 veces en los niveles del RNAm del gen *zds1* (Figura 10).

De lo anterior se desprende que la luz tiene efectos diversos en los niveles de RNAm de los genes carotenogénicos en las hojas de *D. carota*, y que su efecto puede causar el aumento y también la disminución de los niveles de RNAm de un mismo gen según el estado de desarrollo de éstas.

Es importante destacar que cada estado de desarrollo posee un calibrador particular, lo que permite evaluar solo las diferencias en los niveles de RNAm generadas por el tratamiento de luz/oscuridad para cada gen y estado del desarrollo.

3.4.2 El efecto de la luz en los niveles del RNAm de los genes carotenogénicos en la raíz modificada de *Daucus carota*, a las cuatro, ocho y doce semanas de cultivo.

A diferencia de las hojas, las raíces no fueron sometidas a un tratamiento de luz, sino que se desarrollaron en la presencia de ésta (fotoperiodo) durante los tres meses del cultivo (sección 2.2.2.1, Materiales y métodos).

Al comparar los niveles del RNAm de las raíces desarrolladas en la luz versus los de las desarrolladas en la oscuridad, se observaron diferencias significativas para todos los genes en los tres estados del desarrollo, excepto en los niveles del RNAm de los genes *psy1*, *pds* y *lcyb* a las ocho semanas del cultivo (Figura 11).

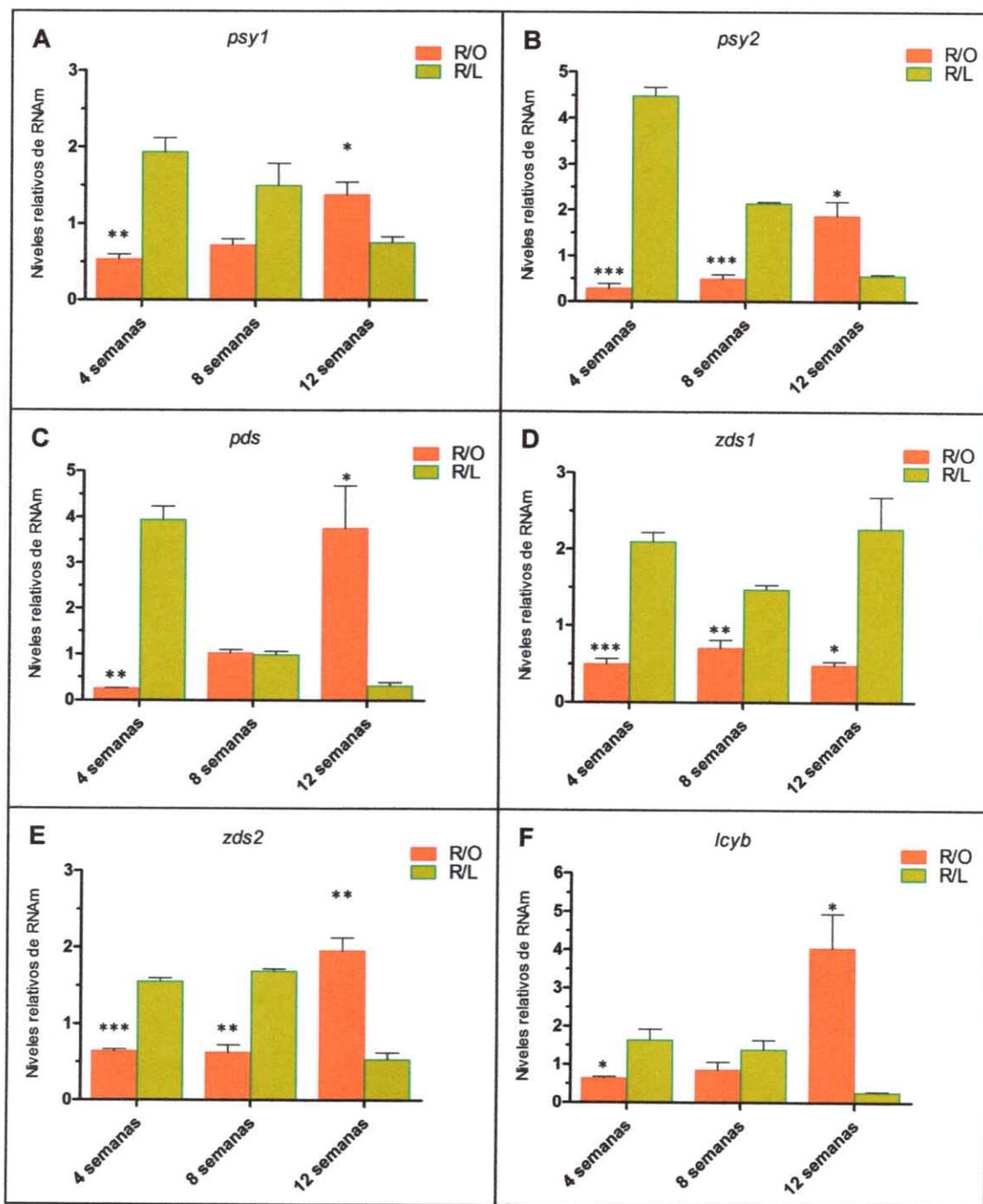


Figura 11. Los niveles de RNAm de los genes *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1*, *zds2* y *lcyb* en las raíces desarrolladas en la luz y la oscuridad a las 4, 8 y 12 semanas del desarrollo. El calibrador utilizado en cada gráfico corresponde al promedio de las réplicas obtenidas en las condiciones de luz y oscuridad para cada estado de desarrollo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los distintos tratamientos, determinadas por test de T no-pareado con corrección de Welch ($p < 0.05$).

Las raíces crecidas en la presencia de la luz durante 4 semanas presentaron mayores niveles del RNAm de todos los genes analizados, con respecto a las raíces crecidas en la oscuridad. Las diferencias fueron de 2 veces para los niveles de RNAm de los genes *zds2* y *lcyb* hasta 16 veces para los de *psy2* y *pds* (Figura 11).

A las ocho semanas se presentó la misma tendencia, observándose un aumento de 3 a 4 veces en los niveles del RNAm de *psy2*, *zds1* y *zds2* (Figura 11).

Sin embargo, en las raíces de doce semanas del cultivo, se observó lo contrario a lo obtenido en los estadios previos de desarrollo para todos los genes, excepto *zds1*. En este estado del desarrollo se observó un aumento significativo de los niveles de RNAm de los genes *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds2* y *lcyb* en la raíz modificada desarrollada en la oscuridad respecto a las crecidas en la luz, obteniéndose diferencias de 2 veces para los niveles de RNAm del gen *psy1* hasta 15 veces para los del gen *lcyb* (Figura 11).

En el caso de la raíz modificada de *D. carota*, a diferencia de lo que ocurre en sus hojas, la luz tiene un efecto positivo en los niveles del RNAm de todos los genes en las etapas tempranas del desarrollo, mientras que en la etapa madura este efecto se enmascara para todos los genes, excepto *zds1*, respecto a los altos niveles de expresión de los genes en una raíz modificada madura crecida en la oscuridad.

Lo anterior se correlaciona con lo observado al graficar los niveles del RNAm durante el desarrollo de la raíz modificada en la oscuridad (Figura 6), en donde se observaron mayores niveles de los RNAm de todos los genes a las doce semanas de desarrollo, excepto de *zds1*.

Cabe recordar que los resultados graficados solo son comparables para cada gen en un estado de desarrollo.

4. DISCUSIÓN

4.1 RT-PCR cuantitativo en tiempo real

El RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) es una técnica actual altamente utilizada en las áreas de genética y biología molecular. Ésta presenta varias ventajas, dentro de las cuales destaca la determinación de los niveles de RNAm en la etapa exponencial de la reacción. Esto permite cuantificar, ya sea absoluta o relativamente, los niveles de RNAm en un órgano y condición determinada, lo cual es de gran importancia, especialmente al estudiar los genes cuyo principal punto de regulación es a nivel transcripcional. Las otras técnicas, como RT-PCR convencional y Northern blot también permiten realizar este tipo de análisis, aunque solo de manera semi-cuantitativa y con una menor sensibilidad.

En los experimentos realizados, se amplificaron fragmentos desde las regiones 3' o 5' no traducibles de cada gen, las cuales son de corta extensión. Se escogieron estas regiones para poder obtener los amplificados específicos y poder diferenciar entre los genes *psy1* y *psy2*, y entre *zds1* y *zds2*, los cuales poseen una baja identidad nucleotídica en estas zonas, mientras que esta asciende a 73 y 88% en la región codificante, respectivamente.

El objetivo de este Seminario de Título fue determinar la expresión de los genes carotenogénicos durante el desarrollo de las plantas de *D. carota* y en tratamientos de las hojas en la oscuridad y de las raíces en la luz. Por esta razón, se escogió la aproximación de cuantificación relativa (Introduction to Quantitative PCR: Methods and application guide, Stratagene 2007) en la cual se mide la concentración

del gen de interés en relación a una muestra control (calibrador), que actúa como punto de referencia de la expresión del gen de interés.

En nuestro caso no contamos con un calibrador típico que sería una planta control o tiempo 0 (cero) de tratamiento. En otros estudios de la expresión de los genes carotenogénicos en las plantas (Cloutault y col., 2008; Diretto y col., 2007; Li, 2008; Welsch, 2008) se ha utilizado como calibrador la muestra o el tratamiento que presentó el menor nivel de expresión (mayores valores de Ct). Sin embargo, no pudimos aplicar esto a nuestros resultados debido a que no siempre la menor expresión se asoció a la misma muestra, posiblemente debido a la amplia gama de tratamientos analizados.

Por lo tanto, escogimos utilizar como calibrador el promedio de los valores de Ct de las muestras a comparar (método utilizado en Poupin y col., 2007). Al tomar la media aritmética como calibrador (punto de referencia), resulta la misma distribución en los resultados que al usar como calibrador una sola muestra, pero se observan diferencias menos acentuadas en las razones de cambio. Este análisis permite así aumentar la certeza en la determinación de las diferencias estadísticas entre los distintos grupos.

Para utilizar la media aritmética de los valores de Ct como calibrador, se verificó que todos los valores tuvieran una distribución normal en cada grupo comparado mediante el programa estadístico NCCS 2007 (Hintze, 2007).

Solo en los casos en que se compararon los niveles del RNAm de los seis genes carotenogénicos en un órgano en un mismo estado de desarrollo (Figuras 8 y 9), se utilizó como calibrador el promedio de las réplicas de la muestra con la menor

expresión (en este caso el gen *zds1*), con el fin de ilustrar de forma más clara los genes que presentaran mayores niveles de RNAm. Sin embargo, estos datos fueron también graficados utilizando como calibrador el promedio de todas las réplicas y se confirmaron las diferencias observadas al utilizar el otro calibrador (datos no mostrados).

Para determinar las diferencias estadísticas entre los distintos grupos comparados se realizaron análisis no paramétricos (Kruskal Wallis), dado que no todas las razones de cambio comparadas presentaron una distribución normal. Esto es esperable, ya que al analizar los datos de la cuantificación absoluta o relativa de los niveles de RNAm, se obtienen tasas de cambio y varianzas que pueden ser muy altas, que no cumplen necesariamente con las características de una distribución normal (Pfaffl y col., 2002).

4.2 El desarrollo de la hoja de *D. carota* genera efectos diferenciales en los niveles de RNAm de los genes carotenogénicos.

El efecto del desarrollo en la expresión génica en las plantas ha sido ampliamente estudiado, identificándose la influencia de variados factores bióticos y abióticos, dentro de los cuales destacan la luz y las hormonas relacionadas con el desarrollo (auxinas, citoquininas y giberelinas).

Durante los tres estados del desarrollo analizados, las hojas presentaron fenotipos similares. Esto se correlaciona con los niveles constantes de los carotenoides en ellas, cercanos a los 400 µg/gr de peso seco, determinados previamente en el laboratorio (Figura 2) y por otros autores (Booth, 1957).

Sin embargo, al analizar los niveles del RNAm de los genes carotenogénicos, se observó un incremento de al menos 3 veces para los genes *psy1*, *pds*, *zds2* y *lcyb* a las 12 semanas de cultivo en comparación con los niveles del RNAm de los genes a las 4 semanas del cultivo, y el mayor aumento fue de los niveles del gen *lcyb* (16,2 veces, Figura 7), seguido por *psy1* (10 veces, Figura 7). Las variaciones en los niveles del RNAm de los genes carotenogénicos durante el desarrollo de la hoja de *D. carota* tendrían relación con la importante función de estos pigmentos en las hojas juveniles y adultas durante la fotosíntesis o bien con las modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales de las enzimas.

En las hojas existe un equilibrio entre la síntesis de los carotenoides y la foto-oxidación de éstos (Simkin y col., 2003), por lo cual debe existir una continua expresión de los genes de la ruta carotenogénica, con el fin de mantener una síntesis estable y alta de los carotenoides, ya que continuamente también se van degradando. El aumento en los niveles de RNAm de los genes *psy1*, *pds*, *zds2* y *lcyb* ligado al desarrollo de las hojas de *D. carota* (Figura 7) podría explicarse por la fisiología particular de una hoja madura, la cual presenta una coloración verde más intensa y es de una textura más gruesa (datos no mostrados). Estas diferencias podrían involucrar a su vez mayores niveles de radicales libres asociados al envejecimiento de las hojas (Zimmermann y Zentgraf, 2005). Considerando que el principal punto de regulación de la ruta carotenogénica ocurriría a nivel transcripcional (Bramley, 2002; Shanker y col., 2003; Cunningham, 2002; Howitt y Pogson 2006; Ito y col., 2009; Römer y Fraser, 2005; Tanaka y col., 2008; Taylor y Ramsay, 2005), los mayores niveles en los RNAm de los genes carotenogénicos serían necesarios para aumentar la síntesis de los carotenoides, con el fin de mantener el nivel de carotenoides constante observado

(Figura 2), que sería necesario para la protección y funcionamiento adecuados de las hojas.

Una hipótesis alternativa sería una regulación a nivel proteico, donde algunas enzimas tendrían mayor estabilidad o actividad en los distintos estados del desarrollo de la hoja. Es probable entonces que a nivel proteico cada enzima efectivamente coincidiera con los niveles de los pigmentos obtenidos en la hoja (Figura 2). Para estudiar esto, la aproximación adecuada sería realizar ensayos de Western Blot y de medición de la actividad de las enzimas.

Por otra parte, los niveles del RNAm de los genes carotenogénicos en las hojas de las plantas maduras de *D. carota* se correlacionan con lo observado previamente en las hojas de otros modelos vegetales. En tomate, el gen *psy2*, de expresión foliar exclusiva, ha sido asociado con la síntesis de los carotenoides principalmente en las hojas maduras (Bartley y Scolnik, 1993; Fraser y col., 1999). Además se ha reportado, en este mismo modelo vegetal, un aumento en los niveles del RNAm del gen *pds* en las hojas, ligado al desarrollo de éstas (Giuliano, 1993). Este aumento podría estar involucrado en el delicado equilibrio que afecta el desarrollo de las hojas, ya que este gen codifica para la enzima encargada de desaturar el fitoeno, disminuyendo así los niveles excesivos de este compuesto que ocasiona una inhibición en la ruta de síntesis del ácido giberélico (GA), el cual está involucrado en el desarrollo vegetal (Qin y col., 2007).

Por otro lado, los niveles del RNAm de los genes *psy2* y *zds1* resultaron ser entre 5 y 8 veces mayores en las hojas de las plantas juveniles en comparación con las de las plantas en estado de desarrollo intermedio y maduro (Figura 7), lo cual podría indicar una activación de estos genes por factores presentes en las etapas

tempranas del desarrollo, donde podrían tener una función importante en la síntesis de los carotenoides acoplada al establecimiento del aparato fotosintético.

El hecho de que tanto los genes *psy1* como *psy2* presenten altos niveles de RNAm en las hojas de zanahoria, el primero en la etapa madura y el segundo en los estados juveniles (Figura 7), indicaría que los niveles de RNAm de estos genes estarían regulados por factores presentes en distintos estados del desarrollo de la hoja, y que ambos tendrían una función en la carotenogénesis en éste órgano.

Lo mismo ocurriría con los genes *zds*, ya que ambos se expresan en la hoja en algún momento del desarrollo de ésta (*zds1* preferentemente en las hojas de plantas juveniles y *zds2* en las hojas de las plantas maduras, Figura 7). Dado que *D. carota* es el único organismo donde se ha reportado la presencia de dos genes *zds*, sería interesante estudiar más detalladamente los elementos relacionados a la regulación de estos dos genes y la función de las proteínas codificadas por ellos.

Por lo tanto, el desarrollo ejerce efectos diferentes en los seis genes carotenogénicos estudiados en las hojas de *D. carota*, al generar un aumento en los niveles de RNAm de algunos genes (*psy1*, *pds*, *zds2* y *lcyb*) y una disminución en los niveles de otros (*psy2* y *zds1*, Figura 7). Esto podría asociarse a la presencia de activadores o inhibidores de la transcripción de los distintos genes en los distintos estados del desarrollo, a diferencias en la estabilidad de los RNAm o a modificaciones post-transcripcionales de ellos, en los distintos estados del desarrollo de las hojas de *D. carota*.

4.3 El desarrollo de la raíz modificada de *D. carota* se correlaciona con el aumento de los niveles de RNAm de la mayoría de los genes carotenogénicos.

D. carota presenta un desarrollo típico de una planta dicotiledónea, pero forma una raíz modificada de reserva, la cual en estado maduro acumula una gran cantidad de carotenoides, en especial β -caroteno, en paralelo a su desarrollo en la oscuridad (Figura 2).

Los elevados niveles de los carotenoides observados en la raíz madura de la zanahoria se correlacionan positivamente con el aumento significativo en los niveles del RNAm de todos los genes analizados, excepto *zds1*, el cual presenta niveles constantes durante el desarrollo (Figura 8).

Al comparar los niveles de RNAm entre las 4 y las 12 semanas del cultivo, el mayor aumento se observa en los niveles del RNAm del gen *lcyb* (12,4 veces; Figura 8), seguido por *psy2* (7,7 veces; Figura 8). El gen *zds1* fue el único gen analizado que no presentó variaciones en sus niveles de RNAm durante el desarrollo de la raíz modificada, lo cual podría deberse a una mayor estabilidad del RNAm de *zds1* o de la enzima codificada por éste gen, o bien a que la expresión de este gen (y por lo tanto la enzima ZDS1) tendría una función más importante en la carotenogénesis en la hoja de zanahoria.

El efecto positivo del desarrollo en los niveles del RNAm de los genes de la ruta carotenogénica ha sido determinado también en otros modelos vegetales. Durante la maduración de los frutos del tomate, en la cual ocurre una transición de los cloroplastos a los cromoplastos, aumenta la expresión de los genes *psy1* y *pds*, entre 10 y 20 veces (Pecker y col., 1996; Bramley, 2002; Ronen y col., 1999), lo cual estaría

regulado a nivel transcripcional (Corona y col., 1996; Mann y col., 2000). El mismo patrón se observa en las naranjas "Cara cara", donde la expresión del gen *psy* aumenta con el estado de maduración de los frutos, relacionándose además positivamente con la acumulación de fitoeno (Tao y col., 2007).

Nuestros resultados nos permiten establecer una correlación entre los niveles de los carotenoides, el estado del desarrollo de la raíz modificada y la expresión de los genes carotenogénicos. Por esta razón proponemos que la regulación de la ruta carotenogénica en la raíz de la zanahoria ocurriría principalmente a nivel transcripcional, sin descartar la posibilidad de que ocurran modificaciones post-transcripcionales o que las enzimas carotenogénicas sufran modificaciones que aumenten su actividad durante el desarrollo de la raíz modificada.

4.4 Los genes *psy2*, *zds2* y *lcyb* son más relevantes en las plantas maduras de *D. carota*

El gen *lcyb* presentó el mayor aumento de los niveles de RNAm durante el desarrollo de las hojas (16 veces mayor a las 12 semanas con relación a las 4 semanas) y de la raíz modificada de la zanahoria (12, 4 veces al comparar los mismos dos estados, Figuras 7 y 8).

Dado que a las 12 semanas de desarrollo se acumulan elevados niveles de los carotenoides en la raíz modificada de zanahoria, determinamos los genes que presentan los mayores niveles de RNAm en este estado del desarrollo, ya que estos, junto a *lcyb*, serían los candidatos a ser los genes reguladores de la ruta.

En este estado del desarrollo, los genes con los mayores niveles de RNAm en las hojas y en la raíz modificada son *psy2* y *zds2* (Figura 9). En la raíz, los niveles del RNAm de ambos genes sobrepasan entre 30 y 160 veces los de los genes *psy1*, *pds* y *lcyb*, sin observarse diferencias significativas entre *psy2* y *zds2*. En las hojas, el gen *zds2* es el que presenta los mayores niveles de RNAm. En este caso la diferencia es menos acentuada que en la raíz, variando entre 11,4 y 64 veces con respecto a todos los demás genes carotenogénicos, excepto *psy2* (Figura 9).

El gen *psy* ha sido propuesto en otros modelos vegetales como el principal punto de regulación de la ruta carotenogénica (Fraser y col., 2002; Li y col., 2008; von Lintig y col., 1997; Welsch y col., 2000; Welsch y col., 2003). Dado que la regulación transcripcional es el principal mecanismo regulatorio propuesto para la ruta carotenogénica (Bramley, 2002; Cunningham, 2002; Howitt y Pogson 2006; Ito y col., 2009; Römer y Fraser, 2005; Shanker y col., 2003; Tanaka y col., 2008; Taylor y Ramsay, 2005), los altos niveles de RNAm de los genes *psy2* y *zds2* en la raíz modificada madura de zanahoria (Figura 9) podrían asociarse a los niveles abundantes de los carotenoides en este órgano (Figura 2). Sin embargo, debido a que los carotenoides se acumulan en la raíz modificada madura de zanahoria solo en ausencia de luz, otros mecanismos regulatorios podrían actuar en la modulación de esta ruta en éste órgano.

Es importante destacar que la raíz modificada de zanahoria es un órgano de reserva, que no posee cloroplastos y que no está naturalmente expuesto a la luz, lo que si ocurre en las hojas. Esto permite explicar que solo el gen *zds2* presente los mayores niveles de RNAm en las hojas de 12 semanas de cultivo, y no los genes *psy2* y *zds2*, como ocurre en la raíz modificada, ya que un aumento excesivo en los niveles

del RNAm del gen *psy* podría ser nocivo para la fisiología de la hoja, al disminuir los niveles de GGPP disponibles, el cual es precursor de varios compuestos esenciales en las hojas (por ejemplo, los tocoferoles y la clorofila, Cunningham, 2002).

Nuestros resultados indican que los seis genes carotenogénicos analizados son expresados tanto en las hojas como en la raíz modificada de *D. carota*, variando su expresión según el estado de desarrollo de cada órgano, por lo que estos genes no tendrían una expresión órgano específica. Resultados previos de SGPT realizados para el gen *lcyb* avalan este hecho (Pizarro, 2008).

Debido a que las hojas se encuentran naturalmente expuestas a la luz y las raíces se desarrollan en la oscuridad, el aumento en los niveles del RNAm de los genes carotenogénicos en ambos órganos indicaría la presencia de cajas regulatorias en los promotores de estos genes en respuesta a variados elementos, entre ellos la luz (activaría la transcripción en las hojas y en la raíz crecida en presencia de luz) y las hormonas relacionadas con el crecimiento, lo cual explicaría el aumento en los niveles del RNAm de los genes carotenogénicos en paralelo al desarrollo de la raíz modificada en la oscuridad.

Para determinar directamente la función de cada gen en la biosíntesis de los carotenoides en la zanahoria, se debería analizar el fenotipo de las mutantes en alguno de estos genes o disminuir los niveles de RNAm de ciertos genes mediante silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT), sobre todo de aquellos genes que codifican para la misma enzima, como es el caso de los genes *psy1*, *psy2*, *zds1* y *zds2*. Al respecto, los trabajos realizados en el laboratorio mediante SGPT indican que efectivamente el gen *lcyb* es requerido para la síntesis de los carotenoides en las

hojas y en la raíz modificada de *D. carota*, ya que en las plantas que poseen una reducción en los niveles del transcrito del gen *lcyb* se observa una disminución de entre un 60% y 40% en los niveles de β -caroteno, en las hojas y la raíz modificada, respectivamente (Pizarro, 2008). Por ello, sería interesante caracterizar el promotor de este gen y de los genes *psy2* y *zds2*, con el fin de determinar las cajas regulatorias que son activadas en las hojas y la raíz modificada.

4.5 La luz es necesaria para la expresión de los genes carotenogénicos en las hojas de *D. carota*.

La luz es vital para las plantas, ya que actúa en la modulación de la mayoría de las respuestas vegetales, principalmente durante el crecimiento y el desarrollo vegetal (Casal y Yanovsky, 2005). La ruta carotenogénica es una vía activada por este estímulo ambiental en órganos naturalmente expuestos a la luz (Welsch y col., 2003).

La mayor parte de la evidencia del efecto de la luz en la ruta carotenogénica proviene de los estudios realizados en las hojas, ya que durante el proceso de etiolación (conversión de etioplastos a cloroplastos al exponer las hojas a la luz) se inducen transcripcionalmente varios de los genes de la ruta carotenogénica. Lo anterior ha sido descrito en las hojas de tabaco (Woitsch y Römer, 2003), pimentón (Simkin y col., 2003), maíz (Albrecht y Sandmann, 1994), mostaza (von Lintig y col., 1997), tomate y *Arabidopsis* (Hirschberg, 2001), entre otros.

Debido a que las hojas de zanahoria se encuentran naturalmente expuestas a la luz y debido a las funciones de los carotenoides durante la fotosíntesis y en la protección frente al exceso de energía lumínica y el estrés oxidativo, éstos tendrían

una tasa de recambio mayor en las hojas (Simkin y col., 2003) que en la raíz modificada, que crece en la oscuridad.

Al comparar los niveles de RNAm de cada uno de los seis genes estudiados en las hojas crecidas en la luz y en las hojas sometidas a oscuridad por 48 horas, fue posible observar una disminución significativa en los niveles de RNAm de los genes *psy1*, *psy2*, *zds1* y *zds2* en las hojas de plantas de 4 u 8 semanas de cultivo sometidas al tratamiento de oscuridad (entre 4 y 46 veces, Figura 10).

Por otra parte, el mayor efecto observado al someter a la oscuridad las hojas de las plantas de 12 semanas de cultivo fue en los niveles del RNAm de *zds2* y *pds*, los cuales disminuyeron 4 y 36 veces respectivamente, en relación a los niveles de estos genes en las hojas en fotoperíodo (Figura 10).

Los mayores niveles de RNAm de los genes *psy2* y *zds1* se observaron en la etapa temprana del desarrollo de la hoja (4 semanas, Figura 7). Durante esa misma etapa del desarrollo de la hoja se observó además la mayor inducción por luz de estos dos genes (Figura 10), lo que refuerza la hipótesis de que estos genes serían activados en etapas tempranas del desarrollo de la hoja e indica que su activación estaría mediada por luz principalmente. Por otra parte, los genes *pds* y *zds2* presentaron los mayores niveles de RNAm en las hojas de 12 semanas del cultivo (Figura 7), momento en el cual ambos genes presentan también una activación mediada por luz (Figura 10). Esto indicaría que estos dos genes estarían regulados tanto por el estado de desarrollo de la hoja como por la luz.

El gen *zds2* fue el único que presentó un mayor nivel de su RNAm en las hojas juveniles y también en las maduras en presencia del fotoperíodo, lo cual destaca nuevamente la importancia de este gen en la ruta carotenogénica en las hojas de *D. carota*.

El efecto positivo de la luz en los niveles foliares del RNAm de los genes *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1* y *zds2* (Figura 10) podría ocurrir mediante la activación de la transcripción de estos genes o la estabilización de sus RNAm. Esto se ha descrito en otros modelos vegetales, particularmente para los genes *psy* y *pds*. En las plántulas de mostaza y de *Arabidopsis*, se ha establecido la activación mediada por la luz del gen *psy* (von Lintig y col., 1997; Welsch y col., 2000), el cual posee en su promotor elementos de respuesta a la luz, incluido uno que se encuentra presente en otros genes carotenogénicos (*pds* de tomate) y en los genes relacionados a la fotosíntesis, como la proteína de unión a la clorofila *a/b* de la mostaza y *Arabidopsis* (Welsch y col., 2007). Esto último sería una evidencia de la gran coordinación presente entre el establecimiento del aparato fotosintético y la síntesis de los carotenoides en las hojas.

Los niveles del RNAm de *lcyb* no se vieron afectados por los tratamientos de oscuridad, lo que sugiere una activación de este gen mediada por el desarrollo, más que por la luz (Figuras 7 y 10), o bien que el RNAm de *lcyb* posee una estabilidad mayor y un tratamiento de 48 horas de oscuridad es insuficiente para observar una disminución en sus niveles RNAm.

4.6 La luz provoca efectos contrarios en los niveles de RNAm de los genes carotenogénicos en la raíz juvenil y madura de *D. carota*.

Al comparar las raíces modificadas de las zanahorias crecidas en la luz con las desarrolladas en la oscuridad, se observó el mismo patrón de niveles de RNAm para todos los genes analizados, excepto *zds1* (Figura 11). Los seis genes carotenogénicos analizados presentaron los mayores niveles de RNAm en la raíz juvenil crecida en presencia del fotoperíodo (Figura 11), lo cual se revirtió completamente a las 12 semanas de desarrollo, donde los niveles del RNAm fueron significativamente mayores en la raíz desarrollada en la oscuridad (entre 2 y 15 veces; Figura 11), para todos los genes, excepto *zds1*. Esto se puede explicar por el desarrollo característico y el patrón de acumulación de los carotenoides de la raíz modificada de la zanahoria. En una planta juvenil de zanahoria, la raíz modificada aún no presenta un crecimiento secundario, sino que es delgada en toda su extensión, tanto en la porción sobre la tierra como bajo ésta (en donde es de color blanco; Figura 3). Además, acumula muy bajas cantidades de carotenoides (Figura 2), posiblemente debido a la necesidad de un estado de desarrollo más avanzado para su síntesis. En cambio, la porción que queda sobre la tierra recibe la luz en condiciones de fotoperíodo, al igual que las hojas, lo cual explicaría su comportamiento similar al de un órgano fotosintético. Lo anterior sería válido también para las raíces de las plantas de 8 semanas de cultivo.

La inversión en los niveles de RNAm de casi la totalidad de los genes carotenogénicos a las 12 semanas se explicaría por el nivel de desarrollo maduro que alcanza la raíz crecida bajo la tierra, mientras que la porción de la raíz expuesta a la luz prácticamente no alcanza un desarrollo mayor al observado en los estadios anteriores (Figuras 3 y 11). En este punto, los factores activadores de la transcripción

o estabilización de los RNAm de los genes carotenogénicos, o bien las posibles modificaciones post-transcripcionales relacionados al desarrollo serían más relevantes que el efecto activador de la luz en la raíz de la zanahoria.

Es importante recalcar, además, que la ausencia de la luz por sí sola no sería un factor suficiente para activar la síntesis de los carotenoides en la raíz de la zanahoria, ya que las raíces crecidas en la oscuridad de las plantas de 4 semanas de cultivo presentan expresión de los genes carotenogénicos, aunque en menor medida que las raíces maduras (Figuras 8 y 11), pero carecen prácticamente de carotenoides (Figura 2). Sin embargo, la ausencia de la luz sí sería esencial para lograr el desarrollo normal y total de la raíz modificada, lo cual conlleva a su vez a la activación de la ruta carotenogénica, ya sea a nivel transcripcional, post-transcripcional o post-traduccional. Esto se corroboró al poner bajo tierra segmentos de la raíz crecida durante 8 semanas en presencia del fotoperíodo, observándose luego de 3 semanas una reversión en su fenotipo, marcada por un aumento en su grosor y coloración naranja (Stange y col., 2008).

El hecho de que los niveles de RNAm de *zds1* sean mayores en la raíz crecida en la luz que en la raíz desarrollada en oscuridad (Figura 11) indicaría que este gen es activado en mayor medida por la luz y no por factores asociados al estado de desarrollo de la raíz.

5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

- El trabajo desarrollado durante este seminario de título contribuyó en dilucidar el efecto del desarrollo y la luz en la expresión de los genes carotenogénicos en las hojas y la raíz modificada de *D. carota*.
- El desarrollo de las hojas de *D. carota* genera un aumento en los niveles de RNAm de los genes *psy1*, *pds*, *zds2* y *lcyb*, y una disminución en los niveles de RNAm de *psy2* y *zds1*, mientras que el desarrollo de la raíz modificada de la zanahoria se correlaciona con un aumento en los niveles del RNAm de todos los genes estudiados, excepto *zds1*.
- El gen *lcyb* es el gen que presenta el mayor aumento en los niveles de RNAm durante el desarrollo de las hojas y la raíz modificada (entre las 4 y 12 semanas de cultivo), por lo cual sería un punto importante de regulación de la ruta carotenogénica durante el desarrollo.
- En una planta madura, que presenta los máximos de los carotenoides totales y de β -caroteno, los genes *psy2* y *zds2* presentan los mayores niveles de RNAm.
- La luz tiene un efecto diferencial en los niveles de RNAm de los genes carotenogénicos en las hojas y provoca un aumento en los niveles de RNAm de todos los genes en las etapas tempranas del desarrollo de la raíz. Sin embargo, este efecto se revierte en una raíz madura desarrollada en la oscuridad, excepto para el gen *zds1*.
- La primera hipótesis es parcialmente cierta, ya que durante el desarrollo aumentan los niveles de RNAm de todos los genes carotenogénicos en la raíz

modificada de *D. carota*, excepto *zds1*, mientras que el desarrollo de la hoja genera el aumento en los niveles de RNAm de algunos genes y la disminución en los niveles de otros.

- La segunda hipótesis sería también parcialmente cierta, ya que en presencia de la luz aumentan los niveles del RNAm de todos los genes carotenogénicos en algún estado de desarrollo de las hojas de *D. carota*, excepto *lcyb*, pero también aumentan los niveles de RNAm en las etapas tempranas del desarrollo de la, lo cual se revierte en una etapa madura.
- Los resultados obtenidos durante este seminario de título han sentado las bases para los futuros estudios de la funcionalidad *in vivo* de los genes *psy2*, *zds2* y *lcyb*, como también para la identificación y caracterización de las cajas regulatorias presentes en los promotores de estos genes, los cuales serían claves en la regulación de la ruta carotenogénica en las hojas expuestas a luz y en la raíz modificada de *D. carota* desarrollada en la oscuridad.
- El estudio de la actividad de las enzimas carotenogénicas de *D. carota* dará origen a posteriores avances en la modificación de la cantidad y composición de los carotenoides en las plantas, lo cual es de alta relevancia debido al valor nutricional de ellos en la dieta humana y a las ventajas agronómicas que otorgan a las plantas que los sintetizan.

Parte de los resultados presentados en este seminario de título dieron origen a una publicación: Stange C, Fuentes P, Handford M y Pizarro L (2008). *Daucus carota* as a novel model to evaluate the effect of light on carotenogenic gene expression. *Biological Research* 41 (3): 289-301.

6. REFERENCIAS

- Adams-Philips L., Barry C., Giovannoni J. 2004. Signal transduction system regulating fruit ripening. *Trends Plant Sci.* 9: 331-338.
- Albrecht M., Sandmann G. 1994. Light-stimulated carotenoid biosynthesis during transformation of maize etioplasts is regulated by increased activity of isopentenyl pyrophosphate isomerase. *Plant. Physiol.* 105: 529-534.
- Aluru M., Xu Y., Guo R., Wang Z., Li S., White W. y Rodermel S. 2008. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *J. Exp. Bot.* 59: 3551-3562.
- Al-Babili S., von Lintig J., Haubruck H. y Beyer P. 1996. A novel, soluble form of phytoene desaturase in *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is Hsp 70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation. *The Plant Journal* 9: 601-612.
- Al-Sady B., Ni W., Kircher S., Schäfer E. y Quail P. 2006. Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell* 23: 439-446.
- Armstrong G.A. y Hearst J.E. 1996. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J* 10: 228-237.
- Ballesteros M.L., Bolle C., Lois C.M., Moore J.M., Vielle-Calzada J.P., Grossniklaus U. y Chua N. 2001. LAF1, a MYB transcription activator for phytochrome A signaling. *Genes Dev.* 15: 2613-2625.
- Baranska M., Baranski R., Schulz H. y Nothnagel T. 2006. Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta* 224: 1028-1037.
- Bartley G. y Scolnik P. 1993. cDNA cloning expression during fruit development and genome mapping of PSY2, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *J. Biol. Chem.* 268: 25718-25721.
- Booth V.H. 1957. Carotene in the leaves of the carrot. *Journal of the science of Food and Agriculture* 8 (6): 371:376.
- Bramley P. 2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J. Exp. Bot.* 53: 2107-2113.
- Breimer L. 1990. Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol. Carcinog.* 3: 188-197.

- Britton G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal* 9:1551-1558.
- Britton G. 1998. Overview of carotenoid biosynthesis. En: G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.), *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism*. Birkhauser Verlag. Basel, Switzerland, 13-147.
- Bustin, S.A. 2004. A-Z of Quantitative PCR. Capítulo 3: Quantification strategies in real-time PCR. International University Line, 1-23
- Camara B. 1993. Plant phytoene synthase complex: component enzymes, immunology, and biogenesis. *Meth. Enzymol.* 214: 352-365.
- Casal J.J. y Yanovsky M. J. 2005. Regulation of gene expression by light. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 501-511.
- Chattopadhyay S., Ang L.H., Puente P., Deng X.W. y Wei N. 1998. Arabidopsis bZIP protein HY5 directly interacts with light responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell* 10: 673-683.
- Chen H., Zhang J., Neff M.M., Hong S., Zhang H., Deng X. y Xiong L. 2008. Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *PNAS* (105) 11: 4495-4500.
- Clotault J., Peltier D., Berruyer R., Thomas M., Briard M. y Geoffriau E. 2008. Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *J. Exp. Bot.* 59: 3563-3573.
- Corona V., Aracri B., Kosturkova G.E., Bartley L., Pitto L., Giorgetti P.A., Scolnik P.A. y Giuliano G. 1996. Regulation of carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development. *Plant Journal* 9: 505-512.
- Crozier A., Kamiya Y., Bishop G. y Yolota T. 2000. Biosynthesis of hormone and elicitor molecules. En: B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones (eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologist, 865-872.
- Cunningham F.X. Jr y Gantt E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 49: 557-83.
- Cunningham, F.X. Jr. 2002. Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure Appli. Chem.* 74: 1409-1417.

- Davuluri G.R., Van Tuinen A., Mustilli A.C., Manfredonia A., Newman R., Burgess D., Brummell D.A., King S.K., Palys J., Uhlig J., Pennings H.M. y Bowler C. 2004. Manipulation of DET1 expression in tomato results in photomorphogenic phenotypes caused by post-transcriptional gene silencing. *Plant J.* 40: 344-354.
- Diretto G., Al-Babili S., Tabaza R., Papacchioli V., Beyer P. y Giuliano G. 2007. Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of bacterial mini-pathway. *PLoS ONE* 4:e350.
- Dong H., Deng Y., Mu J., Lu Q., Wang Y., Xu Y., Chu C., Chong K., Lu C. y Zuo J. 2007. The Arabidopsis Spontaneous Cell Death1 gene, encoding a z-carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. *Cell Research* 17: 458-470.
- Esterbauer H., Gebiki J., Puhl H. y Jurgens G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13: 341-391.
- Fraser P.D., Kiano J., Truesdale M., Schuch W. y Bramley P. 1999. Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Mol. Biol.* 40:687-698.
- Fraser P.D., Romer S., Shipton C.A., Mills P.B., Kiano J.W., Misawa N., Drake R.G., Schuch W. y Bramely P.M. 2002. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *PNAS* 99(2): 1092-1097.
- Fuentes P., Pizarro L., Handford M. y Stange C. 2009. The effect of light on carotenogenic gene expression during carrot (*Daucus carota* L.) development. Enviado el 24 de Agosto de 2009 a la revista *Journal of Experimental Botany*.
- Giorio G., Stigliani A.L. y D'Ambrosio C. 2007. Agronomic performance and transcriptional analysis of carotenoid biosynthesis in fruits of transgenic HighCaro and control tomato lines under field conditions. *Transgenic Res.* 16: 15-28.
- Giorio G., Stigliani A.L. y 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 Journal* 275: 527-535.
- Giovannoni J.J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16:S170-S180.
- Giuliano G., Bartley G.E. y Scolnik P.A. 1993. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell* 5: 379-387.

- Grotewold E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 761-780.
- Hintze J. 2007. NCSS and GESS. NCSS, LLC. Kaysville, Utah. www.ncss.com
- Hirschberg J. 2001. Carotenoids biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 210-218.
- Howitt C.A. y Pogson B.J. 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ.* 29: 435-445.
- Ito M., Yamano Y., Tode C. y Wada A. 2009. Carotenoid synthesis: Retrospect and recent progress. *Arch. Biochem. Biophys.* 483(2): 224-228.
- Just B.J., Santos C.A.F., Fonseca M.E.N., Boiteux L.S., Oloizia B.B. y Simon P.W. 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.
- Kato M., Ikoma Y., Matsumoto H., Sugiura M., Hyodo H. y Yano M. 2004. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol.* 134: 824-837.
- Kita M., Kato M., Ban Y., Honda C., Yaegaki H., Ikoma Y. y Moriguchi T. 2007. Carotenoid accumulation in japanese apricot (*Prunus mume Siebold & Zucc.*): Molecular analysis of carotenogenic gene expression and ethylene regulation. *J. Agric. Food Chem.* 55: 3414-3420.
- Lamers P.P., Janssen M., De Vos R.C., Bino R.J. y Wijffels R.H. 2008. Exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell factory applications. *Trends Biotechnol.* 26: 631-638.
- Li F., Vallabhaneni R. y Wurtzel E.T. 2008. PSY3, a New Member of the Phytoene Synthase Gene Family Conserved in the Poaceae and Regulator of Abiotic Stress-Induced Root Carotenogenesis. *Plant Physiology* 146: 1333-1345.
- Mann V., Harker M., Pecker I. y Hirschberg J. 2000. Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nature Biotechnology* 18: 888-892
- Mayne S. 1996. β -carotene, carotenoids and disease prevention in humans. *FASEB J.* 10: 690-701.

- Nelson J.L., Bernstein P.S., Schmidt M.C., Von Tress M.S. y Askew E.W. 2003. Dietary modification and moderate antioxidant supplementation differentially affect serum carotenoids, antioxidant levels and markers of oxidative stress in older human. *J. Nut.* 133: 3117-3123.
- Pecker I., Gabbay R., Cunningham F.X.Jr y Hirschberg J. 1996. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene β -cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Molecular Biology* 30: 807-819.
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29 (9): 2002-2007.
- Pfaffl M.W., Horgan G.W. y Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30(9): e36.
- Pizarro L. 2008. Estudio de la función del gen licopeno β -ciclase (*lcyb*) en la biosíntesis de carotenoides en *Daucus carota*, Tesis de Magíster. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile
- Pizarro L. y Stange C. 2009. Review: Light dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia e Investigación Agraria* 36(2): 143-161.
- Poupin M.J., Federici F., Medina C., Matus J. T., Timmermann T. y Arce-Johnson P. 2007. Isolation of the three grape sub-lineages of B-class MADS-box *TM6*, *PISTILLATA* and *APETALA3* genes which are differentially expressed during flower and fruit development. *Gene* 404: 10-24.
- Qin G., Gu H., Ma L., Peng Y., Deng X.W., Chen Z. y Qu L.J. 2007. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid and gibberellins biosynthesis. *Cell Research* 17: 471-482.
- Rao A.V. y Rao L.G. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological Res.* 55: 207-216.
- Rodrigo M.J., Marcos J.F., Alférez F., Mallent M.D. y 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. *Journal of Experimental Botany* 54 (383): 727-738.
- Römer S. y Fraser P.D. 2005. Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta* 221: 305-308.

- Ronen G., Cohen M., Zamir D. y Hirshberg J. 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of gene for lycopene epsilon cyclase is down regulated during ripening and is elevated in the mutant delta. *Plant J.* 17: 341-351.
- Schmid V. H. 2008. Light-harvesting complexes of vascular plants. *Cell Mol. Life Sci.* 65: 3619-3639.
- Shanker V., Bhalla R. y Luthra R. 2003. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J. Biosci.* 28: 637-646.
- Shewmaker C.K., Sheehy J.A., Daley M., Colburn S. y Ke D.Y. 1999. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J.* 20:401-412.
- Simkin A.J., Zhu C., Kuntz M., Sandmann G. 2003. Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis en pepper (*Capsicum annuum*) leaves. *J. Plant Physiology* 160: 439-443.
- Snodderly D. 1995. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 1448S-1461S.
- Stange C., Fuentes P., Handford M. y Pizarro L. 2008. *Daucus carota* as a novel model to evaluate the effect of light on carotenogenic gene expression. *Biol. Res.* 41: 289-301.
- Takano H., Obitsu S., Beppu T. y Ueda K. 2005. Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3 (2): Identification of extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. *J. Bacteriol.* 187: 1825-1832.
- Tanaka Y., Sasaki N. y Ohyima A. 2008. Biosynthesis of plants pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* 54(4): 733-749.
- Tanumihardjo S.A. y Yang Z. 2005. Carotenoids: Epidemiology of health effects. En: Caballero B, Allen L, Prentice A (eds). *Encyclopedia of human nutrition*, 2° edición. Elsevier Ltd., Oxford, 339-345.
- Tao N., Hu Z., Liu Q., Xu J., Cheng Y., Guo L., Guo W. y Deng X. 2007. Expression of phytoene synthase gene (*psy*) is enhanced during fruit ripening of Cara Cara navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Cell Rep.* 26: 837-843.
- Taylor M. y Ramsay G. 2005. Carotenoid biosynthesis in plant storage organs: recent advances and prospects for improving plant food quality. *Physiologia Plantarum* 124: 143-151.

- Telfer A. 2005. Too much light? How beta-carotene protects the photosystem II reaction centre. *Photochem. Photobiol. Sci.* 4: 950-956.
- Tepperman J.M., Zhu T., Chang H.S., Wang X. y Quail P.H. 2001. Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 98: 9437-42.
- Vishnevetsky M., Ovadis M., Vainstein A. 1999. Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci.* 4: 232-235.
- Von Lintig J., Welsch R., Bonk M., Giuliano G., Batschauer A. y 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.
- Welsch R., Beyer P., Hugueney P., Kleinig H. y von Lintig J. 2000. Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* 211: 846-854.
- Welsch R., Medina J., Giuliano G., Beyer P. y von Lintig J. 2003. Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 523-534.
- Welsch R., Maass D., Voegel T., DellaPenna D. y Beyer P. 2007. Transcription Factor RAP2.2 and Its Interacting Partner SINAT2: Stable Elements in the Carotenogenesis of *Arabidopsis* Leaves. *Plant Physiology* 145: 1073-1085.
- Welsch R., Wü F., Bär C., Al-Babili S. y Beyer P. 2008. A Third Phytoene Synthase Is Devoted to Abiotic Stress-Induced Abscisic Acid Formation in Rice and Defines Functional Diversification of Phytoene Synthase Genes. *Plant Physiology* 147: 367-380.
- Woitsch S. y Römer S. 2003. Expression of xanthophyll biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation. *Plant Physiol.* 132: 1508-1517.
- Ye X., Al-Babili S., Klot A., Zhang J., Lucca P., Beyer P. y Potrykus I. 2000. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305.
- Zhu C., Yamamura S., Nishihara M., Koiwa H. y Sandmann, G. 2003. cDNAs for the synthesis of cyclic carotenoids in petals of *Gentiana lutea* and their regulation during flower development. *Biochem. et Biophys. Acta* 1625: 305-308.
- Zimmermann P. y Zentgraf U. 2005. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular & Molecular Biology Letters* 10:515-534.