

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS BIOQUÍMICAS Y**  
**BIOTECNOLÓGICAS**  
**PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA**



**EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DEL GEN *zds1* DE *Daucus carota*  
(zanahoria) EN *Arabidopsis thaliana spc1-1* y *Nicotiana tabacum* (tabaco)**

**Presentado por la bachiller:**

Lilia Magaly Alvarez Mejía

**Para optar el Título Profesional de:**

**INGENIERA BIOTECNÓLOGA**

**ASESOR:** Dr. Ivan Paz Aliaga

**Co-ASESOR:** Ph.D. Claudia Stange Klein

**AREQUIPA – PERÚ**

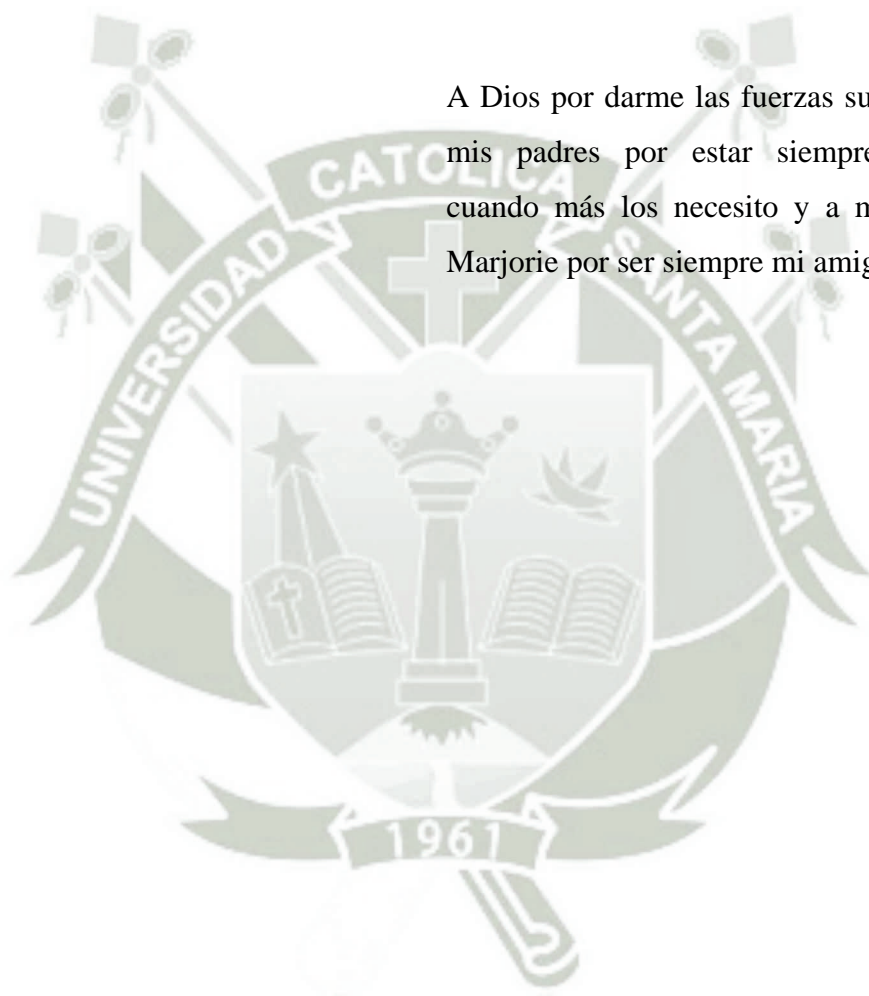
**2014**

El presente trabajo de tesis “EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DEL GEN *zds1* DE *Daucus carota* (zanahoria) EN *Arabidopsis thaliana spc1-1* y *Nicotiana tabacum*”, realizado en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, Santiago-Chile.



## DEDICATORIA

A Dios por darme las fuerzas suficientes, a mis padres por estar siempre conmigo cuando más los necesito y a mi hermana Marjorie por ser siempre mi amiga.



## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que contribuyeron de manera directa e indirecta en el desarrollo de esta Tesis, no sólo con conocimientos; también con entusiasmo y apoyo.

Agradecer a mi familia por su amor, compañía e impulsarme en todos mis logros, por sus enseñanzas, consejos, cariño, comprensión y apoyo incondicional que me han dado. A mi tutor Iván Paz Aliaga por la oportunidad de asesorarme, brindarme sus orientaciones, enseñanzas y observaciones en la tesis.

A mi co-tutor Claudia Stange, integrante de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por confiar en mí y aceptarme como estudiante, estar siempre dispuesta a darme su ayuda, consejos tanto en lo personal como en el laboratorio, a mis compañeros del Laboratorio por enseñarme y hacer grato día a día. A Sebastián y Angélica por su apoyo, a mis compañeros de grupo que me acogieron, a todos los demás presentes por mantener y hacer crecer esta gran familia, a las personas de los otros grupos por los gratos momentos que compartimos.

De manera muy especial a Luisa por apoyarme, ayudarme y acogerme en su hogar en los momentos más difíciles

A los miembros del jurado por su apoyo, observaciones, enseñanzas y buenos deseos.

A mis amigas de la Universidad Ale y Kathy por compartir conmigo cinco años asistiendo a clases, estudiando, saliendo, compartiendo momentos de alegría, relax, tristeza, anécdotas, por sus abrazos y buenos deseos.

## ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
Δ	Planta mutante
aa	Aminoácidos
ABA	Acido abscísico
A.th	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BP	Border primer
Bret	Bromuro de etidio
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de Calcio
CaMV	Virus del mosaico de coliflor
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	Nitrato de calcio tetrahidratado
cDNA	ADN complementario
CRTISO	Caroteno isomerasa
CTAB	Cetil trimetilamonio
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de Cobre
D.c	<i>Daucus carota</i>
DcZDS1	Gen ζ-caroteno desaturasa de <i>Daucus carota</i>
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMAPP	Dimetalil pirofosfato
dNTPS	Bases nitrogenadas
DO	Densidad óptica
DXP	1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato

DXS	Enzima DXP sintasa
EDTA	Acido etilendiaminotetraácetico
EST	Base de datos de secuencias génicas
FP	Fluorescencia
g	Gramos
GFP	Proteína fluorescente verde
GGPP	Geranil-geranil pirofosfato
GGPPS	Enzima geranil-geranil pirofosfato sintasa
h	Horas
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Acido bórico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IPI	Enzima isopentenil pirofosfato isomerasa
IPP	Isopentenil pirofosfato
Kb	Kilobases
KCl	Cloruro de Potasio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotasio
KNO <sub>3</sub>	Nitrato de potasio
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LCYB	Enzima licopeno β-ciclase
LCYE	Enzima licopeno ε-ciclase
LP	Left primer
Lut	Luteína
lycβ1	Enzima licopeno β-ciclase 1

lycβ2	Enzima licopeno β-ciclasa 2
M	Molar
mg/L	Miligramos por litro
mg/mL	Miligramos por mililitro
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidratado
min	Minutos
mL	Mililitro
mL/min	Mililitros por minuto
mM	Milimolar
MnSO <sub>4</sub>	Sulfato de manganeso
MS	Medio Murashinge & Skoog
NaCl	Cloruro de sodio
Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Si	Silicato de sodio
nd-1	Non dormant-1
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NTR	Región no traducible
p/p	Razón peso-peso
p/v	Razón peso-volumen
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDS	Enzima fitoeno desaturasa

PM	Estándar de peso molecular
ppm	Partes por millón
PSII	Fotosistema II
PSY	Enzima fitoeno sintasa
qPCR	PCR cuantitativo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP	Right primer
rpm	Revoluciones por minuto
s/t	Gen sin codón de término
seg	Segundos
SGPT	Silenciamiento genico post-transcripcional
TAE	Solución formada por Tris, acetato y EDTA
T-DNA	ADN foráneo
μL	Microlitros
μM	Micromolar
v/v	Razón volumen-volumen
Wt	Tipo silvestre
Z-ISO	Enzimas ζ- caroteno isomerasa
ZDS	ζ- caroteno desaturasa
ZDS1	ζ- caroteno desaturasa 1
ZEP	Enzima zeaxantina epoxidasa
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	Sulfato de zinc heptahidratado

## LISTA DE TABLAS

**Tabla I.** Enzimas de restricción utilizadas (BioLabs® Inc.)

**Tabla II.** Partidores usados para la amplificación de fragmentos por PCR



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas
- Figura 2.** Biosíntesis de licopeno a fitoeno.
- Figure 3.** Fenotipo de mutante *Spc1*.
- Figura 4.** Análisis en Tiempo Real para los genes *zds1* y *zds2* durante el desarrollo de *D. carota*.
- Figura 5.** Análisis de RT-PCR en Tiempo Real de zanahorias silenciadas en *zds2*.
- Figura 6.** Análisis de HPLC de carotenoides en las zanahorias silenciadas en *zds2*.
- Figura 7.** Plántulas doble silenciadas.
- Figura 8.** Análisis de RT-PCR cuantitativo de zanahorias co-transformadas con pHG/z2 y pMD/z1N.
- Figura 9.** Esquema de la clonación del fragmento de interés en el vector de entrada.
- Figura 10.** Esquema de la recombinación sitio-específica.
- Figura 11.** Esquema de los vectores de entrada y destinación empleados en esta tesis.
- Figura 12.** Amplificación del gen *zds1* sin codón de término de la traducción.
- Figura 13.** Digestión enzimática de la construcción pCR8/*zds1* s/t.
- Figura 14.** Digestión de la construcción pGWB5/*zds1* s/t con SacI.
- Figura 15.** PCR de colonia de *A. tumefaciens* transformado con el vector pGWB5/*zds1*.
- Figura 16.** Localización subcelular de la proteína DcZDS1.
- Figura 17.** Caracterización de la inserción del T-DNA en alelo recesivo *Spc1* proveniente de la colección Salk T-DNA.
- Figura 18.** Análisis molecular para la mutación en *Spc1* en la mutante de *A. thaliana* *spc1-1*.
- Figura 19.** Esquema de la construcción pGWB2/z1A.
- Figura 20.** Cultivo de *Arabidopsis thaliana* *spc1-1*.
- Figura 21.** Amplificación del gen 18S de las líneas de *A. thaliana* obtenidas.
- Figura 22.** Amplificación del fragmento para mutación en *Spc1* de las líneas de *A. thaliana* obtenidas.
- Figura 23.** Amplificación del fragmento *nptII* en las líneas transgénicas de *A. thaliana* para *Dczds1*.
- Figura 24.** Esquema del gen *Dczds1* en la construcción pGWB2/Z1A.
- Figura 25.** Amplificación del fragmento de la región 3'UTR de *zds1* de *Daucus carota* de las líneas transgénicas de *A. thaliana*.

**Figura 26.** Determinación de la integridad del ARN extraído de las líneas *A. thaliana* transformadas con *Dczds1*.

**Figura 27.** Amplificación de gen 18S de cDNA de las líneas de *A. thaliana* transgénicas para *Dczds1*

**Figura 28.** Amplificación de gen *zds1* de *D. carota* de las líneas transgénicas de *A. thaliana* para *Dczds1*.

**Figura 29.** Cuantificación de Clorofila de las líneas *A. thaliana* *spc1-1* que expresan *Dczds1*.

**Figura 30.** Cuantificación de Carotenoides totales de las líneas *A. thaliana* *spc1-1* que expresan *Dczds1*.

**Figura 31.** Cuantificación de Carotenoides de las líneas *A. thaliana* *spc1-1* que expresan *Dczds1*.



## RESUMEN

Los carotenoides son compuestos presentes en todas las plantas y algunas bacterias, hongos y algas. En plantas, estas poseen un rol en fotosíntesis, fotoprotección, biosíntesis de fitohormonas y proveen el color a frutas y flores. Son reconocidos como nutrientes necesarios en la dieta humana debido a que son precursores de la vitamina A y antioxidantes. La ruta de biosíntesis de los carotenoides en plantas ha sido ampliamente estudiada, describiéndose los genes y las enzimas involucradas. Sin embargo, los aspectos regulatorios y la funcionalidad no han sido completamente dilucidados. Se han reportado algunas plantas, como *Daucus carota*, poseen genes parálogos que codifican para enzimas con igual actividad. Se ha identificado dos genes  $\zeta$ -caroteno desaturasa (*zds*), denominado *zds1* y *zds2* que codificarían para la enzima ZDS, involucrada en la síntesis del licopeno a partir del  $\zeta$ -caroteno. Resultados previos indican que el gen *zds2* puede ser suplido por otro gen endógeno, posiblemente *zds1*. Considerando estos antecedentes, en el presente trabajo de investigación se evaluó la funcionalidad y localización subcelular del gen *zds1* de *Daucus carota* utilizando *Arabidopsis thaliana* mutante *spc1-1* y *Nicotiana tabacum* como modelos biológicos vegetales. Se utilizó la clonación de *Dczds1* en vectores de expresión mediante la tecnología Gateway® para la complementación heteróloga del gen *Dczds1* en *A. thaliana* mutante *spc1-1* y localización subcelular en *Nicotiana tabacum*. Se determinó que ZDS1 de *Daucus carota* está localizada en plastidios y es una enzima funcional porque es capaz de complementar la ruta biosintética de los carotenoides en *Arabidopsis thaliana spc1-1*, mutante heterocigota en el gen *Spc1* que codifica para ZDS de *A.thaliana*. Las plantas transgénicas que portan el gen *Zds1* de *D. carota* presentan un mayor nivel de carotenoides comparadas con plantas silvestres y mutantes; ello indica que *Dczds1* puede intervenir en la expresión génica y la acumulación de carotenoides en plantas.

**Palabras claves:** Carotenoides, *Daucus carota*, localización subcelular,  $\zeta$ -caroteno desaturasa (*zds*).

## ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>HIPÓTESIS</b>	2
<b>OBJETIVOS</b>	
<b>Objetivo General</b>	3
<b>Objetivos Específicos</b>	3

### CAPÍTULO I: MARCO TEORICO

1. Carotenoides: Estructura y Función.	4
2. Biosíntesis de carotenoides	7
3. Regulación de la ruta carotenogénica en las plantas	9
4. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo para el estudio de carotenoides	10
5. Importancia del gen <i>zds</i> ( $\zeta$ .caroteno desaturasa) en la biosíntesis de los carotenoides	12
6. El gen <i>zds</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
7. Los genes <i>zds</i> .	15
8. <i>Nicotiana tabacum</i> y expresión transitoria	20
9. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	21

### CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Biológico	22
Bacteriano	22
Vegetal	22
2. Reactivos	22
3. Cultivos Bacterianos	23
3.1. Cultivo de <i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
3.2. Quimiocompetencia de células de <i>Escherichia. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>	23
3.3. Transformación de células quimio-competentes	24
3.4. Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para la transformación transitoria en <i>Nicotiana tabacum</i> .	24
3.5. Cultivo de <i>A. tumefaciens</i> para el Método del FloralDip.	25

4.	Cultivos vegetales	25
4.1.	Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> spc1-1	25
4.2.	Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
4.3.	Cultivo de <i>Nicotiana tabacum</i> .	26
5.	Métodos de Biología Molecular	26
5.1.	Extracción de ADN genómico de plantas	26
5.2.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	27
5.3.	Extracción de RNA de plantas	28
5.4.	Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	29
5.5.	Amplificación del gen <i>zds1</i> con <i>Pfu</i> DNA polimerasa	29
5.6.	Adición de Adenina a los extremos del amplificado	30
5.7.	Digestiones enzimáticas	30
6.	Construcciones Genética	30
6.1.	Vectores usados en este trabajo	32
6.2.	Generación de la construcción pGWB5/ <i>zds1</i>	33
6.2.1.	Clonación del gen <i>zds1</i> s/t en el vector de entrada pCR8®	33
6.2.2.	Recombinación Gateway ® entre los vectores de entrada y de destinación	34
7.	Obtención de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> spc1-1 y <i>Nicotiana tabacum</i> que expresan el gen <i>zds1</i> de <i>D. carota</i> .	34
7.1.	Transformación transitoria de hojas de tabaco con <i>Agrobacterium</i> <i>Tumefaciens</i> que porta el vector pGWB5/ <i>zds1</i> s/t	34
7.2.	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> spc1-1 con <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> que porta el vector pGWB2/Z1A	34
8.	Localización Subcelular del gen <i>zds1</i> de <i>Daucus carota</i> mediante Microscopía de fluorescencia	35
9.	Determinación de la cantidad y la composición de los carotenoides	35
9.1.	Extracción de Pigmentos	35
9.2.	Cuantificación de los pigmentos totales mediante espectrofotometría	36
9.3.	Composición de pigmentos mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	36
10.	Adquisición y Procesamiento de Imágenes	37
11.	Análisis estadístico	37

12. Diseño de partidores	37
--------------------------	----

### CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Localización Subcelular de DcZDS1	39
1.1. Clonación del gen <i>zds1</i> s/t en el vector de entrada pCR8.	39
1.2. Construcción del vector binario pGWB5/ <i>zds1</i> s/t.	41
1.3. Obtención de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformado con el vector pGWB5/ <i>zds1</i> .	42
1.4. Determinación de la localización sub-celular de la proteína DcZDS1	43
2. Transformación y obtención de las plantas <i>Arabidopsis thaliana spc1-1</i> que portan el gen <i>zds1</i> de <i>Daucus carota</i>	46
2.1 Análisis molecular para determinar la mutación en <i>A. thaliana spc1-1</i>	46
2.2 Transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana spc1-1</i> con el vector pGWB2/z1A.	48
2.3 Análisis molecular para determinar la transgénesis de las líneas de <i>Arabidopsis thaliana spc1-1</i> que portan el gen <i>zds1</i> de <i>Daucus carota</i> .	49
3. Análisis de la expresión del transgen en en líneas de <i>A. thaliana spc1-1</i> transgénicas para <i>Dczds1</i> .	54
4. Determinación de la Composición y Concentración de Pigmentos Carotenoides en <i>A. thaliana spc1-1</i> transformadas con pGWB2/Z1A	56
<b>CONCLUSIONES</b>	62
<b>RECOMENDACIONES</b>	63
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	64

## INTRODUCCIÓN

Los carotenoides han atraído por más de un siglo el interés de investigadores de diferentes áreas del conocimiento incluyendo la química, bioquímica, biología, ciencia y tecnología de los alimentos, medicina, farmacia y nutrición. Los carotenoides son pigmentos naturales ampliamente distribuidos, responsables del color amarillo, naranja y rojo de las frutas, raíces, flores, pescados, invertebrados y pájaros y ocurren invariablemente en los cloroplastos de las plantas superiores, aunque en este tejido fotosintético su color está enmascarado por el de la clorofila. También se encuentran en las algas, bacterias, hongos y levaduras. Se estima que la naturaleza produce aproximadamente 100 millones de toneladas de carotenoides al año.

Los genes que codifican muchas enzimas de la ruta sintética de los carotenoides han sido clonados a partir de una variedad, y algunos de ellos se han caracterizado genéticamente, todas las enzimas conocidas de la vía son codificadas por genes en el núcleo, y luego son importados a los plastidios, a pesar de todo este conocimiento existe un número limitado de mutantes en la ruta biosintética.

*Daucus carota* es una planta, al igual que otras plantas, posee genes carotenogénicos duplicados. No obstante, junto con *Malus domestica*, son las únicas plantas reportadas que se han identificado dos genes z-caroteno desaturasa (*zds*), denominados *zds1* y *zds2*. En resultados previos a esta tesis, se determinó que la *zds1* era capaz de suplir la función de la *zds2*, pero la *zds2* no puede reemplazar a la *zds1* durante las primeras etapas de crecimiento de la zanahoria. Es por ello que se quiere conocer si la *zds1* es funcional en sistemas heterólogos como *A. thaliana spc1-1*, una mutante en *spc1* que codifica para *zds* de *A. thaliana* y en *N. tabacum*.

## HIPÓTESIS

Si el gen *zds1* de *Daucus carota* es funcional es posible que complete la ruta sintética de carotenoides en *Arabidopsis thaliana spc1-1* y sea capaz de expresarse en *Nicotiana tabacum*.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la funcionalidad del gen *zds1* de *Daucus carota* en *Arabidopsis thaliana* mutante *spc1-1* y la localización subcelular en *Nicotiana tabacum*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la localización sub-celular de la proteína *zds1* mediante expresión transitoria en *Nicotiana tabacum*.
- Transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* heterocigotas en la mutación de *spc1* con el gen *zds1* de *Daucus carota*.
- Identificar mediante PCR las plantas mutantes que portan el gen *zds1* de *Daucus carota*.
- Evaluar la expresión del gen *zds1* de *Daucus carota* en plantas mutantes que portan el gen *zds1* de *Daucus carota*.
- Determinar la composición y cuantificar los carotenoides presentes en plantas adultas mutantes que portan el gen *zds1* de *Daucus carota* mediante HPLC.

## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1. Carotenoides: Estructura y Función.

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides de naturaleza lipofílica que son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos (plantas, algas y cianobacterias) y algunas bacterias y hongos no fotosintéticos<sup>1</sup>. Su estructura consta de 8 unidades isoprenicas unidas en sus extremos, constituyendo en su mayoría polienos de 40 carbonos. Los característicos colores de los carotenoides como el amarillo, naranja, y rojo son debido un sistema de dobles enlaces conjugados que les confieren la propiedad de actuar como cromóforos<sup>2</sup>, moléculas capaces de absorber luz y generar color.

Los carotenoides toman su nombre de la zanahoria (*Daucus carota*), una planta que acumula altos niveles de estos pigmentos en la raíz<sup>3,2</sup>. Las cientos de estructuras de carotenoides conocidos hasta la fecha se pueden dividir en dos grandes grupos (Figura 1): los carotenos, que contienen solo átomos de carbono e hidrogeno y las xantófilas, que poseen además sustituyentes oxigenados<sup>4,2</sup>. En las plantas, son sintetizados y acumulados principalmente en los plastidios<sup>5</sup> y se almacenan en las membranas tilacoidales asociadas a los centros cosechadores de la luz en los cloroplastos<sup>5</sup>. Además, se ha reportado que estos compuestos también son almacenados, tanto en las membranas y los cuerpos grasos de los cromoplastos como en las estructuras cristalinas dentro del estroma<sup>6,5,7,8</sup>.

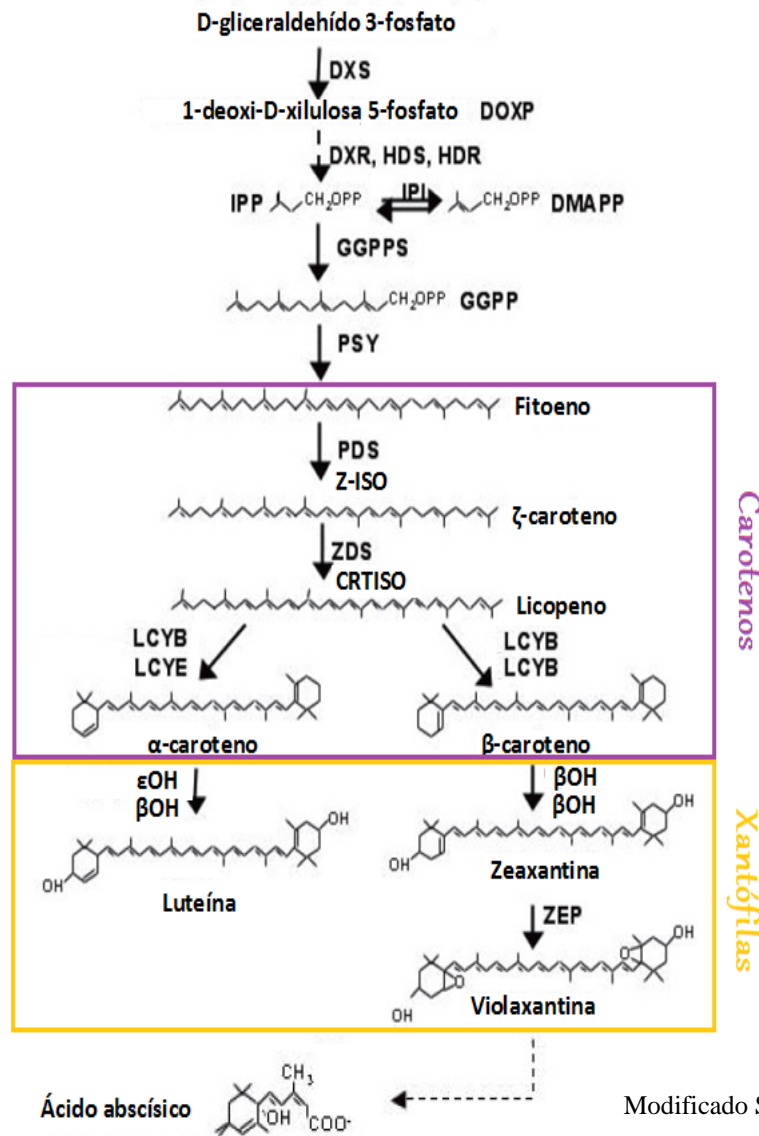
En plantas y algas, los carotenoides son sintetizados y acumulados al interior de plastidios, principalmente en cloroplastos y cromoplastos<sup>5</sup>. En los cloroplastos, los carotenoides en conjunto con clorofilas, se localizan en las membranas tilacoidales y constituyen componentes esenciales de la maquinaria fotosintética, en donde están involucrados en el ensamblaje de los fotosistemas y juegan un papel importante en la captación de la luz<sup>7</sup>. Mientras que por otro lado, estos pigmentos también pueden ser localizados en cuerpos lipídicos o estructuras cristalinas

ubicadas al interior de cromoplastos presentes en flores, frutas y raíces modificadas<sup>7,9,8</sup>.

Pero los carotenoides son mucho más que solo pigmentos. El papel fisiológico que ejercen estos compuestos en plantas es muy amplio. En plastidios estos actúan como pigmentos accesorios en los complejos cosechadores de luz, en los cuales absorben luz de la región azul y parte de la región verde del espectro visible (450-570 nm), transfiriendo posteriormente la energía absorbida a las clorofilas durante el proceso de la fotosíntesis<sup>10,11,12,13</sup>. Además, los carotenoides corresponden a precursores en la biosíntesis de ácido abscísico (ABA) y estrigolactonas, importantes fitohormonas para el crecimiento y desarrollo de las plantas<sup>14</sup>. El ABA está involucrado en la dormancia de semillas, maduración y diferenciación de células vegetales embrionarias, regulación de la apertura estomática y tolerancia a estrés abiótico<sup>15,16,17</sup> mientras que las estrigolactonas están involucradas en el establecimiento de relaciones simbióticas con micorrizas, estimulación de la germinación de plantas parásitas y la inhibición de las ramificaciones de los brotes<sup>18,19</sup>. Finalmente y por su característica de otorgar colores rojos, naranjos y amarillos a distintos órganos de las plantas (principalmente flores y frutos), facilitan la polinización y dispersión de semillas<sup>20, 7</sup>.

En los animales, los carotenoides cumplen una función esencial, son precursores de la vitamina A, la cual participa en múltiples procesos como la visión, la respuesta inmune, el crecimiento y la reparación del tejido epitelial, la reproducción, el mantenimiento de las membranas de la superficie de los ojos y la integridad del epitelio respiratorio, urinario y tracto intestinal<sup>21</sup>.

También ejercen en animales un rol como antioxidantes, previniendo enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer y enfermedades degenerativas relacionadas con el envejecimiento<sup>22,23,24,25</sup>. Por esta razón, los carotenoides se utilizan como suplemento en formulaciones alimenticias en animales y humanas, e incluso como colorantes naturales en la industria alimenticia y cosmética<sup>26</sup>. Debido a que los mamíferos no sintetizan carotenoides de forma natural, éstos se deben ingerir en la dieta para poder ser metabolizados.



Modificado Stange y col, 2008

**Figura 1. Ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas.** Diagrama que indica las enzimas (gris) y principales productos de la biosíntesis de carotenoides en plantas. Además se indica el color del metabolito cuando corresponde (rectángulos coloreados en productos). **DXS:** 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa, **DXR:** DOXP reductoisomerasa, **HDS:** hydroxymethylbutenyl difosfato sintasa, **HDR:**hydroxymethylbutenyl difosfato reductasa, **DXP:** 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomera-sa, **IPP:** Isopentenil pirofosfato, **IPI:** isopentenil pirofosfato isomerasa, **DMAPP:** dimetilalil pirofosfato, **GGPPS:** geranilgeranil pirofosfato sintasa, **GGPP:** geranil-geranil pirofosfato, **PSY:** fitoeno sintasa, **PDS:** fitoeno desaturasa, **Z-ISO:** ζ-caroteno isomerasa, **ZDS:** ζ-caroteno desaturasa, **CRTISO:** caroteno isomerasa, **LCYE:** licopeno ε-ciclasa, **LCYB:** licopeno β-ciclasa, **βOH:** β-caroteno hidroxilasa, **εOH:** ε-caroteno hidroxilasa y **ZEP:** zeaxantina epoxidasa.

## 2. Biosíntesis de carotenoides

La ruta sintética de los carotenoides fue dilucidada la última mitad del siglo XX usando bioquímica (desde 1960) y enfoques moleculares (década de 1980). Los principales avances en la identificación de genes y enzimas de la vía se han hecho desde la década de 1990. La caracterización de plantas mutantes defectuosos en carotenoides (*Arabidopsis*, tomate), algas (*Chlamydomonas sp.*), y cianobacterias (*Synechocystis sp.*) y el desarrollo de cepas de *E. coli* modificadas con genes carotenogénicos de bacterias (*Erwinia sp.*) contribuyó sustancialmente a la identificación de muchos de los genes de la ruta antes de que finalizara el siglo<sup>5</sup>. En la primera década del siglo XXI, se han identificado más genes biosintéticos. Hoy en día se tiene conocimiento de los genes y enzimas que catalizan las reacciones fundamentales de la vía de biosíntesis de carotenoides en las plantas<sup>3</sup>.

Como todos los isoprenoides, los carotenoides se sintetizan a partir de prenil pirofosfatos como el isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero, el dimetalil pirofosfato (DMAPP). En plantas existen dos vías independientes para la formación de estos precursores carotenogénicos, pero, los carotenoides son principalmente sintetizados a partir del IPP y DMAPP producidos por la ruta plastidial del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP)<sup>27</sup>, como se muestra en la figura 1. En esta ruta ocurre la condensación del piruvato con el gliceraldehido 3-fosfato, para dar lugar al 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP) por medio de la enzima DXP sintasa (DXS), seguido de una reacción catalizada por la enzima DXP reductoisomerasa (DXR) y una cascada de otras reacciones que llevan finalmente a la síntesis de IPP y DMAPP<sup>29</sup>. La condensación de 3 moléculas de IPP con DMAPP da lugar a geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), un precursor de muchos isoprenoides plastidiales incluyendo los carotenoides y cuya síntesis es catalizada por la enzima GGPP sintasa (GGPPS)<sup>30,31</sup>. El primer paso que da origen a un carotenoide en la ruta, es la generación de una molécula de 40 carbonos denominada fitoeno a partir de la condensación de dos moléculas de GGPP (Figura 1). Esta reacción es catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY) y es considerada el principal paso limitante en la ruta de biosíntesis de carotenoides<sup>32,33,14</sup>. El fitoeno es, entonces, desaturado para dar origen al cromóforo con dobles enlaces conjugados que forma la estructura base de los carotenoides vegetales y determina las propiedades

fisicoquímicas y biológicas característica<sup>34</sup>. Es así como el fitoeno, un compuesto incoloro, tras ser sometido a una serie de 4 desaturaciones y 2 isomerizaciones, es transformado en licopeno: un carotenoide rojo. Estas desaturaciones son catalizadas por las enzimas fitoeno desaturasa (PDS) y  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS), dando lugar en forma secuencial al fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno, neurosporeno y finalmente licopeno<sup>5</sup>. Adicionalmente, esta moléculas sufren isomerizaciones catalizadas por las enzimas  $\zeta$ -caroteno isomerasa (Z-ISO) y caroteno isomerasa (CRTISO), las que permitirán finalmente la formación de all-trans-licopeno, configuración estable requerida para las reacciones subsiguientes. A continuación, el licopeno sufre ciclaciones a ambos extremos de su cadena, representando este suceso el primer punto de ramificación en la ruta de biosíntesis de carotenoides. Por un lado se forma  $\alpha$ -caroteno, el cual presenta un anillo  $\epsilon$  en un extremo y un anillo  $\beta$  en el otro y cuya síntesis es catalizada por las enzimas licopeno  $\epsilon$ -ciclasa (LCYE) y licopeno  $\beta$ -ciclasa (LCYB), respectivamente. Mientras que por la otra vía de la ruta, se forma  $\beta$ -caroteno, molécula con 2 anillos  $\beta$ , uno en cada extremo, y cuya síntesis es catalizada de forma única por la enzima LCYB. La hidroxilación de los anillos de los carotenos genera las xantófilas como la luteína (formada a partir del  $\alpha$ -caroteno) y la zeaxantina (formada a partir del  $\beta$ -caroteno). En el caso de la formación de luteína participan las enzimas  $\epsilon$ -hidroxilasa ( $\epsilon$ OH) y  $\beta$ -hidroxilasa ( $\beta$ OH), mientras que en la síntesis de zeaxantina solo participa la  $\beta$ OH. La zeaxantina puede ser epoxidada dos veces por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP) para formar violaxantina, la cual posteriormente puede ser modificada para dar origen finalmente a la fitohormona ácido abscísico (ABA).

Tanto carotenos como xantofilas pueden ser modificados a posterioridad para dar lugar a la gran diversidad de carotenoides encontrados en plantas y otros organismos<sup>1</sup>. La degradación de los carotenoides genera apocarotenoides, una clase de compuestos muy variable estructuralmente distribuidos en la naturaleza<sup>35,31,36,1</sup> y entre los que se encuentran compuestos biológicamente activos como el ABA y las estrigolactonas; además de otros aun no identificados<sup>37,38,19</sup>.

### 3. Regulación de la ruta carotenogénica en las plantas

A pesar de la relevancia de los carotenoides para la vida vegetal, la comprensión de cómo las células de plantas regulan la acumulación de estos metabolitos esenciales es todavía limitada, la regulación de la biosíntesis de carotenoides es altamente compleja e incluye factores interrelacionados como las interconexiones con otras rutas metabólicas relacionadas, el tipo y morfología del plastidio en el que se acumulan, el estadio de desarrollo de la planta y los estímulos medioambientales y está regulada tanto transcripcional y post-transcripcionalmente<sup>3</sup>.

Se ha descrito en diferentes modelos que la luz, captada por los fotoreceptores fitocromos y criptocromos, ejerce una regulación positiva sobre la expresión de estos genes<sup>39,40,41,42</sup>. Por ejemplo en *Arabidopsis thaliana* y la planta de mostaza *Sinapsis alba*, se demostró que los niveles de expresión del gen que codifica para *PSY* aumentan por efecto de la luz<sup>39</sup>. En plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) también se ha reportado un aumento de los transcritos de los genes carotenogénicos  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (*bhy*), zeaxantina epoxidasa (*zep*) y violaxantina de-epoxidasa (*vde*) al exponer las plantas a condiciones de luz<sup>43</sup>. En zanahoria recientemente se ha logrado identificar el promotor de este gen observando la presencia de diversas cajas regulatorias que responden a distintos estímulos (hormonas vegetales y luz). Experimentalmente se corroboró de que efectivamente la luz y hormonas producen un aumento de expresión del gen en plántulas de zanahoria y plantas de tabaco<sup>44</sup>.

Otro de los puntos de regulación ocurriría a nivel del secuestro y la acumulación de carotenoides. Esto estaría determinado en parte por la biogénesis de diferentes tipos de plastidios<sup>45,46</sup>. Los carotenoides en cromoplastos se encuentran en forma de plastoglóbulos o cristales de mayor estabilidad frente a la degradación lumínica en comparación a los carotenoides presentes en cloroplastos<sup>47,50</sup>. En relación a esto, recientemente se determinó que la tasa de síntesis y degradación de los carotenoides en las hojas es muy elevada<sup>49</sup>. Otro punto de regulación está dado por la activación de la ruta por producto final. En este contexto se ha descrito que el ABA presenta una retroalimentación positiva sobre la expresión del gen *PSY* en *A. thaliana*<sup>42</sup>.

En última instancia, otro tipo de regulación es la redundancia génica, que corresponde a los casos en donde se ha reportado que dos o más genes codifican para enzimas con la misma actividad. En la planta modelo *A. thaliana*, existe una copia única de cada gen carotenogénico que codifica para las enzimas de la ruta, con la excepción de las enzimas GGPS, IPI y caroteno- $\beta$  hidroxilasa para las cuales existen 11, 2 y 2 genes respectivamente<sup>50</sup>. En tomate (*Solanum lycopersicum*), también se ha reportado más de un gen carotenogénico que codifica para enzimas con la misma actividad. En este caso, el paso de licopeno a  $\beta$ -caroteno es llevado a cabo por dos enzimas LCYB dependiendo del órgano que sintetice el pigmento. Es así como existe una enzima específica de cloroplastos (hojas) llamada LCYB y otra específica de cromoplastos (frutos) denominada CYC-B<sup>51</sup>. En plantas de naranja (*Citrus sinensis*), también se han reportado dos enzimas licopeno  $\beta$ -ciclasas, Cs $\beta$ -LCY1 y Cs $\beta$ -LCY2. Esta última, posee una expresión específica en cromoplastos y una marcada inducción en la pulpa y la piel del fruto<sup>52</sup>. De manera muy similar al caso anterior, en plantas de papaya (*Carica papaya L.*), recientemente se han reportado dos genes que codifican para enzimas licopeno  $\beta$ -ciclasas (*lcy $\beta$ 1* y *lcy $\beta$ 2*). Se detectó una mutación en el gen *lcy $\beta$ 2* que genera una enzima inactiva, lo que impide la conversión de licopeno en  $\beta$ -caroteno específicamente en el fruto. Esto se traduce en una variedad de papaya cuya pulpa es roja, mientras que la variedad de papaya que posee ambas enzimas activas, presenta una pulpa amarilla. Además, la expresión de *lcy $\beta$ 2*, a diferencia de *lcy $\beta$ 1*, está fuertemente inducida durante la maduración del fruto<sup>53</sup>.

#### 4. *Arabidopsis thaliana* como modelo para el estudio de carotenoides

Los primeros avances fueron en plantas en que se acumulan cantidades masivas de carotenoides en cromoplastos, como pimiento (*Capsicum annuum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), flores de marigold (*Tagetes sp.*) y narciso (*Narcissus sp.*)<sup>5,32,33</sup>. Debido a que la *Arabidopsis thaliana* carece de cromoplastos, no se puede usar para investigar los procesos relacionados este tipo particular de plastidio. Sin embargo, la docilidad de la *Arabidopsis* a cambios moleculares y genéticos es una importante ventaja para el estudio de la biología en planta y biosíntesis de carotenoides. El uso de mutantes de *Arabidopsis* con perfiles

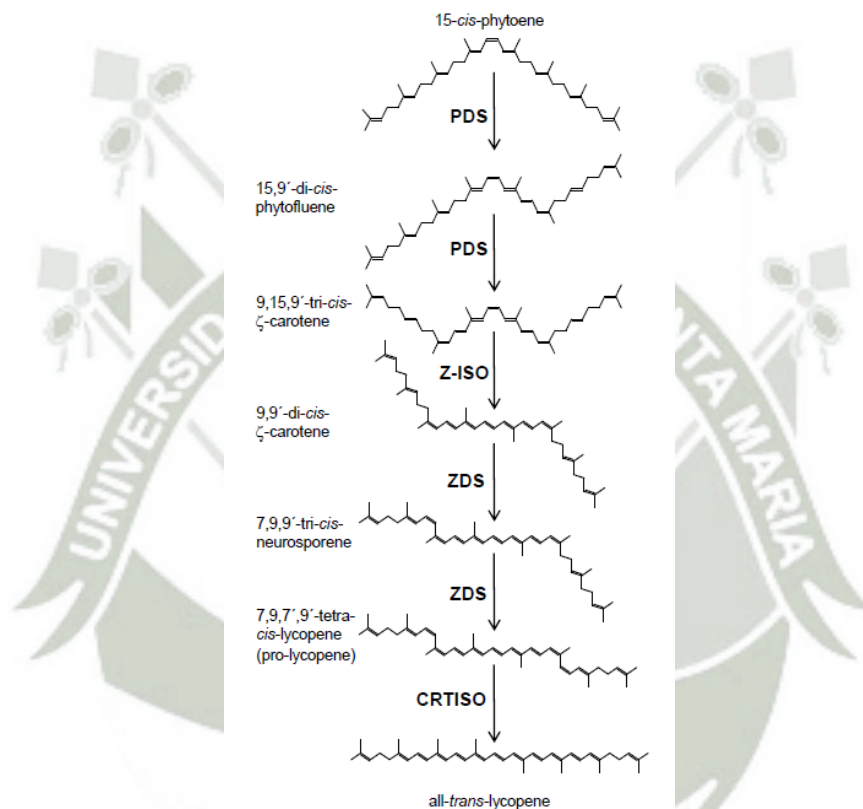
carotenoides alterados ha facilitado una comprensión más profunda de la función de los carotenoides<sup>54,42</sup> y en la fotosíntesis de carotenoides en cloroplastos. En particular, la caracterización de *Arabidopsis*, *Chlamydomonas* y mutantes *aba* con defectos en la biosíntesis de xantofila ha contribuido de manera significativa para aclarar el papel de xantofilas individuales de fotoprotección en las plantas y las algas<sup>55,56,57,58,59,60,12</sup>. La detección de mutantes de *Arabidopsis* con deficiencias en pasos específicos de la vía de carotenoides ha conducido adicionalmente a la identificación de varios genes biosintéticos. Además, los conocimientos y herramientas en *Arabidopsis* respecto a los procesos de desarrollo o respuestas ambientales que envuelve cambios en la producción de los carotenoides representan ventajas sobre otras plantas para el estudio de la regulación de la vía.

Poco después de la secuenciación del genoma *Arabidopsis* (AGI, 2000), una amplia información sobre genes candidatos de *Arabidopsis* y enzimas implicadas en la biosíntesis de isoprenoides (incluyendo carotenoides) podría ser ensamblado mediante la combinación de homología de secuencias<sup>61</sup>. La base de datos de la ruta sintética de los carotenoides, AtIPD ([www.atipd.ethz.ch](http://www.atipd.ethz.ch)), fue compilado usando información de los modelos de ruta de isoprenoides y genes de base de datos pública de la ruta metabólica como BioPathAt<sup>61,62</sup>, AraCyc ([www.arabidopsis.org/BioCyc](http://www.arabidopsis.org/BioCyc)), KEGG ([www.genome.jp/kegg](http://www.genome.jp/kegg)), y SUBA ([suba.plantenergy.uwa.edu.au](http://suba.plantenergy.uwa.edu.au)), y de la literatura<sup>63</sup>. Manualmente se eliminó la redundancia de la base de datos y mejoró el alcance y la calidad de anotación de los genes y las rutas implicadas en la biosíntesis de isoprenoides. En AtIPD puede buscarse o extraer datos y se encuentran enlaces externos relacionados con modelos de ruta de isoprenoides, actividad y localizaciones subcelulares de enzimas.

Existe una colección de herramientas y conocimiento generado para *Arabidopsis* que se puede utilizar para comprender y manipular mecanismos moleculares para controlar la biosíntesis de carotenoides en las plantas.

## 5. Importancia del gen *zds* ( $\zeta$ -caroteno desaturasa) en la biosíntesis de los carotenoides

La enzima *zds* ( $\zeta$ -caroteno desaturasa) en plantas es requerida para la desaturación del  $\zeta$ -caroteno (amarillo pálido), a neurosporeno (amarillo naranja) y pro-licopeno (rojo-rosado) como se observa en la Figura 2<sup>5,64</sup> y la forma enzimática activa de la desaturasa es una proteína asociada a la membrana<sup>65,66,67,68</sup>, mutaciones en dicho gen o defectos en la actividad ZDS, causan alteraciones fisiológicas graves.



**Figura 2. Biosíntesis de licopeno a fitoeno.** PDS: fitoeno desaturasa, Z-ISO: 15-cis- $\zeta$ -caroteno isomerasa, ZDS:  $\zeta$ -caroteno desaturasa, CRTISO: caroteno isomerasa.

En naranjas, se describió un mutante denominado Pinalate, la cual presenta frutos de color amarillo, en vez del color anaranjado. Este fenotipo se debe a una acumulación de z-caroteno, que refleja la ausencia de actividad z-caroteno desaturasa. Esta mutación solo afecta a los frutos, ya que en hojas los niveles de carotenoides son normales. Además, dado que el ABA es uno de los productos finales de la ruta de biosíntesis de carotenoides, las naranjas Pinalate tuvieron reducidos niveles ABA solo asociado a los frutos<sup>69</sup>.

La mutante non dormant-1 (nd-1) en las plantas de girasol presenta una gran alteración en el locus del gen *zds*, lo que genera, plantas viables sólo en condiciones de luz tenue. Además, posee una gran acumulación de z-caroteno, y un fenotipo vivíparo (semillas que germinan antes de tiempo)<sup>70</sup>. Finalmente, Bautista y col. reportan una cianobacteria con el gen *zds* mutado que presenta gran fotosensibilidad, por lo que solo crece en condiciones de poca luz, lo que merma su crecimiento.

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

## 6. El gen *zds* en *Arabidopsis thaliana*

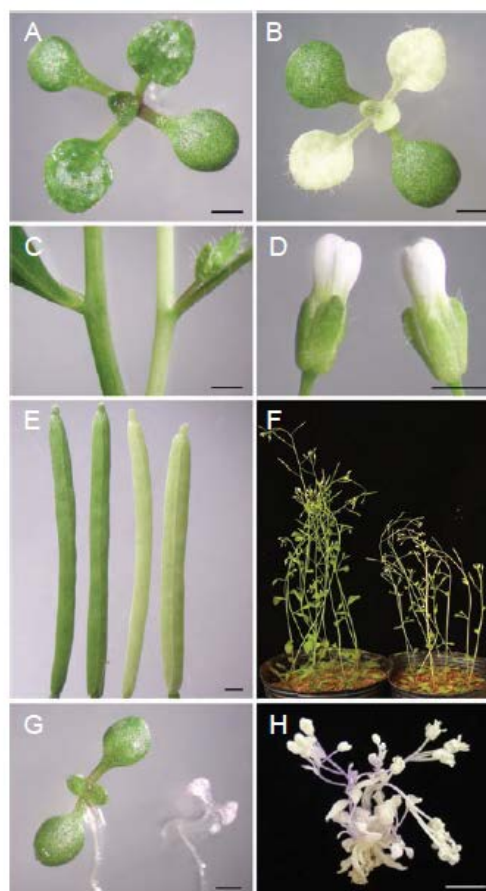
A pesar de la gran cantidad de conocimiento en la bioquímica de carotenoides, solo un número limitado de mutantes en la biosíntesis de carotenoides ha sido caracterizado en plantas superiores.

Dong y col. reportaron la caracterización del gen *zds* de *Arabidopsis* (AT3G04870), ellos encontraron que el gen *Arabidopsis Spontaneous Cell Death1 (Spcl)* codifica para *zds* ( $\zeta$ -caroteno desaturasa). Mutaciones en el gen *spcl/zds* causa daño en la biosíntesis de carotenoides, lo que lleva a graves daños en el desarrollo y fenotipo, deficiencia de ABA y muerte celular espontánea de las plantas mutantes. Ello demuestra que *zds* es esencial para la biosíntesis de carotenoides, por lo tanto juega un papel crítico en el desarrollo y crecimiento de la planta.

La *Arabidopsis* mutante *spcl-1* fue identificada por “screen” genético para mutantes con lesiones de muerte celular espontánea. Bajo condiciones de crecimiento normales, *spcl-1* tiene cotiledones y raíces normales pero con ciertas lesiones cloróticas en ciertas hojas. (Figura 1A y 1B). Las hojas de las mutantes *spcl-1* eran a menudo amarillentas con manchas blancas, pero morfológicamente normal. Además, las inflorescencias, flores y silicuas se volvieron amarillas, acompañando a la formación de clorosis (Figura 1C-1E). En etapas posteriores al desarrollo,

algunas hojas amarillentas podrían convertirse en verde claro. Las plantas maduras *spc1-1* eran un poco más pequeñas que las plantas WT (Figura 1F) y fueron capaces de establecer las semillas con una reducción de la fertilidad.

En un cruce entre *spc1-1* y plantas WT, toda la progenie F1 (n=27) mostró un fenotipo de crecimiento normal, lo que indica que la mutación es recesiva. En la progenie F2 obtenida a partir de plantas F1, el fenotipo mutante segregado es en una proporción de 3:1 (WT: *spc1-1*= 236:67), lo que sugiere que *spc1-1* es una mutación recesiva. Las mutantes *spc1-1* presentan un mosaico de muerte celular y acumulación de superóxido<sup>71</sup>.



**Figure 3. Fenotipo de mutante *Spc1*.** (A) A dos semanas de WT. (B) A dos semanas de *spc1-1*. (C) Inflorescencias de WT (izquierda) y *spc1-1* (derecha). (D) Flores de WT (izquierda) y *spc1-1* (derecha). (E) Silicuotas de WT (izquierda) y *spc1-1* (derecha). (F) Plantas maduras de WT (izquierda) y *spc1-1* (derecha). (G) Siete días WT (Col-0; derecha) y *spc1-2* (izquierda). (H) A ocho semanas de *spc1-2* germinadas y crecidas en medio MS. Todas las plantas fueron crecidas bajo luz blanca continua. Bar: (A-G) 1 mm and (H) 5 mm (Dong y col., 2007).

El genoma de la planta mutante *spc1-1* contiene una única inserción de T-DNA, que es vinculado con el fenotipo mutante. Identificaron una mutante denominada SALK\_033039. Esta mutante tiene una inserción T-DNA en el exón 2 de *SpC1*. Para confirmar el alelismo entre estas dos mutantes, cruzaron *spc1-1* plantas homocigotas con SALK\_033039 plantas heterocigóticas para la inserción de T-DNA en *SpC1*. En la progenie F1, aunque aproximada 50 % de plantas (n = 22) mostraron un fenotipo WT, otro medio de plantas (n = 21) mostraron un fenotipo *spc1-1* similar (Figura 3E), coherente con la predicción de que las plantas F1 deberían mostrar el fenotipo del alelo débil. De ello, esta mutante fue nombrada como *spc1-2*.

La mutante *spc1-2* muestra un fenotipo más grave en comparación con *spc1-1* (Figuras 3), es una variante fuerte y causa una detención completa del desarrollo luego de la germinación, por lo que se trata de un fenotipo letal. Además, presenta un desarrollo anormal de cloroplastos, baja fotoprotección, nivel reducido del fotosistema II, deficiencias de ABA e insuficiente señalización retrógrada (plastidio-núcleo) causada por la pérdida de función de la enzima ZDS.

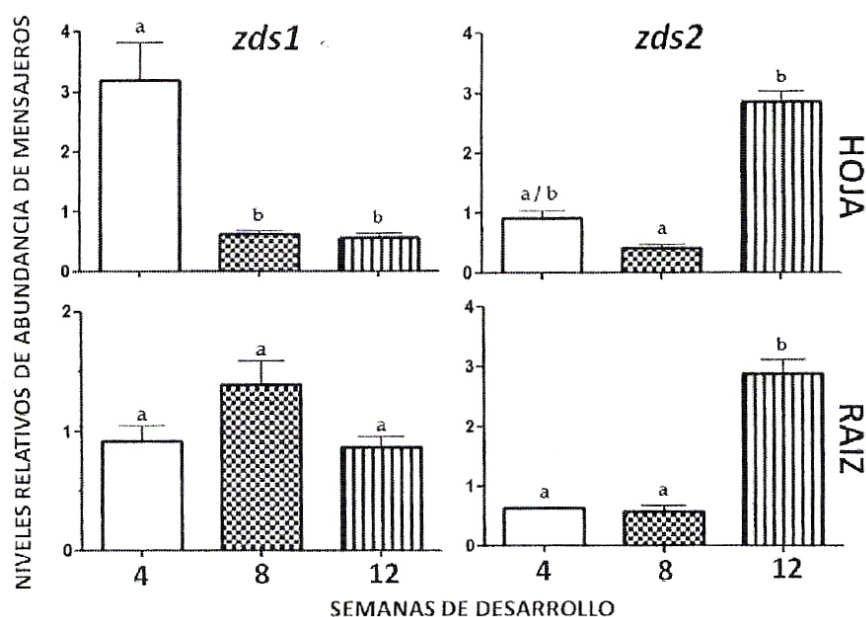
*SpC1* es un gen en el genoma de *Arabidopsis*. La comparación de la secuencia genómica de ADNc reveló que *spc1* contenía 13 exones y 12 intrones. La comparación de secuencias sugiere que *spc1* codifica un putativo *zds*, similar a otras enzimas en la ruta de biosíntesis de carotenoides *spc1/zds* parece estar altamente conservada en plantas mayores. Como *spc1* es un gen de una sola copia en *Arabidopsis* y es una *zds* funcional entonces las mutaciones *spc1* causan alteración de la biosíntesis de carotenoides.

## 7. Los genes *zds*.

Al igual que en tomate se han descrito dos genes para *psy* (*psy1* y *psy2*), *Daucus carota* y *Malus domestica* han sido las únicas plantas en que se han identificado dos genes *z*-caroteno desaturasa (*zds*): *Dczds1* (DQ222430), *Dczds2* (DQ192189)<sup>72</sup>, *Mdzds1* (AF429983) y *Mdzds2* (GO546818)<sup>73</sup>.

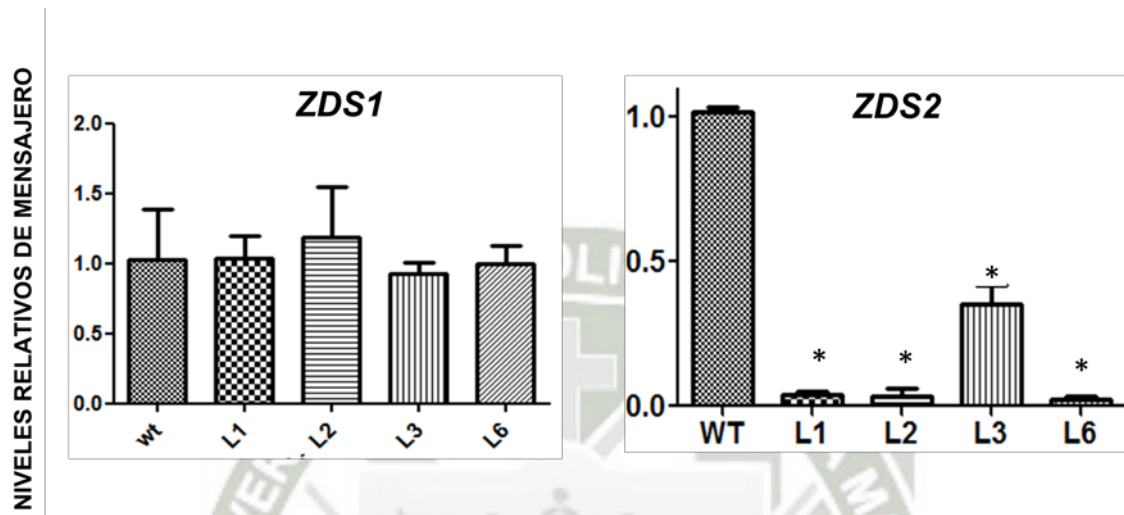
En zanahoria la secuencia anotada para *zds1* es 2078pb, de los cuales 1722pb corresponden a la región codificante. Para *zds2*, la secuencia es de 2038pb y su región codificante consta de 1728pb; estos genes poseen en la región codificante 88% de identidad nucleotídica y 91% de identidad aminoacídica. En las regiones 5'NTR y 3'NTR la identidad nucleotídica es de 24 y 53% respectivamente<sup>74</sup>.

Se han realizado ensayos de expresión mediante RT-PCR en tiempo real, determinando que tanto *zds1* como *zds2* aumentan su expresión durante el desarrollo de hojas y raíz modificada, y que *zds2* tiene una expresión dos veces superior a *zds1* en la raíz de reserva<sup>75</sup> (Figura 4). Ello propone que la existencia de dos genes *zds*, responde al hecho que la hortaliza sintetiza carotenoides en contextos completamente distintos. Por una parte en sus hojas, expuestas a la luz (Foto-periodo 16h luz) y por otra parte, en su raíz de reserva, en condiciones de oscuridad justificando que los genes codifican para enzimas con la misma actividad pero que permitan una regulación diferencial u órgano-específica (tejido fotosintético o raíz de reserva)<sup>74</sup>.



**Figura 4. Análisis en Tiempo Real para los genes *zds1* y *zds2* durante el desarrollo de *D. carota*.** Se utilizaron zanahorias crecidas en condiciones normales de raíz en oscuridad y hoja en condiciones de foto-periodo (16h luz). El calibrador en cada gráfico corresponde al promedio de las réplicas obtenidas en los tres estados de desarrollo. Se utilizó como calibrador el gen de ubiquitina y las distintas letras indican diferencias significativas entre las muestras (Fuentes, 2009).

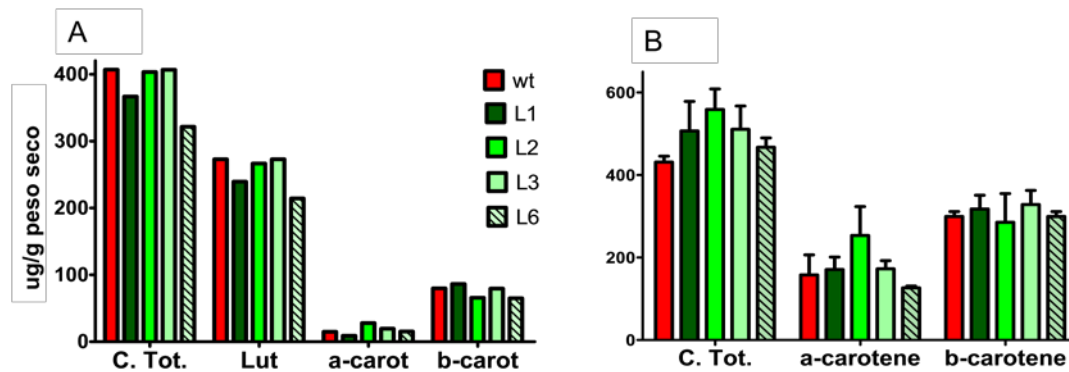
Como se observó que el gen *zds2* tiene una expresión mayor que *zds1* en raíz, silenciaron el gen *zds2* (SGPT) logrando gatillar un alto nivel de silenciamiento en cuatro líneas analizadas (Figura 5). Tres de ellas poseen sobre un 95% de silenciamiento, el silenciamiento es específico para el gen *zds2* porque los niveles de mensajero para *zds1* no presentan diferencias significativas con respecto a la planta silvestre<sup>74</sup>.



**Figura 5. Análisis de RT-PCR en Tiempo Real de zanahorias silenciadas en *zds2*.** Niveles de abundancia relativa de los genes *zds1* y *zds2*, a partir de hojas de plantas silvestres y transgénicas. WT: zanahoria silvestre. L1, L2, L3, L6: líneas transgénicas obtenidas de la embriogénesis somática. Los valores se normalizaron respecto a los niveles de expresión del gen 18S de plantas de zanahoria silvestre. Los resultados de plantas silvestres se ajustaron a 1. Los resultados con diferencias significativas se indican con un asterisco. (Flores, 2010)

El análisis de pigmentos por HPLC de las plantas silenciadas en *zds2*, en la hoja los niveles de los principales carotenoides como  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y luteína no existe diferencias significativas con las plantas silvestres de *Daucus carota* (Figura 6A). En raíz se logra apreciar que solo la L2 muestra un aumento estadísticamente significativo con respecto a una planta silvestre, en las otras líneas no se observan diferencia significativa<sup>74</sup> (Figura 6B). Intentaron silenciar la *zds1* pero no hubo explantes viables porque se necrosaban en las primeras etapas del desarrollo de la planta. Ello sugiere que la *zds2* no es importante en el desarrollo de la planta ni en la

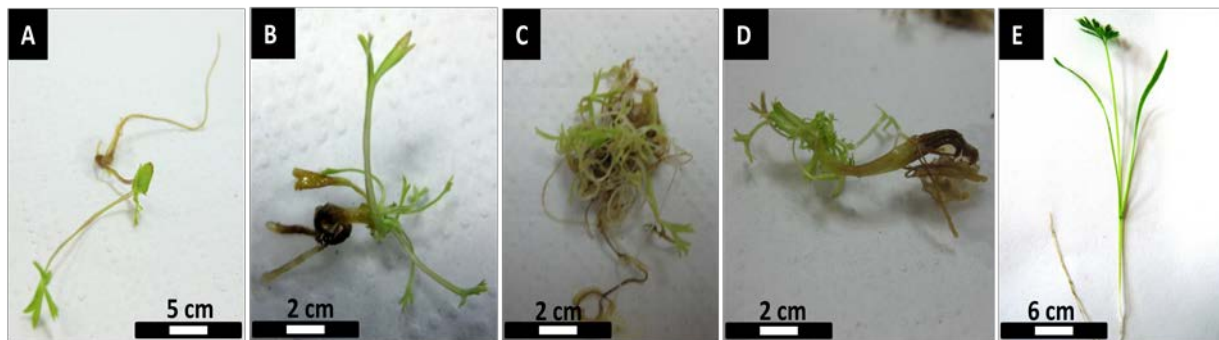
síntesis de carotenoides, en cambio, la *zds1* es fundamental en las primeras etapas de desarrollo de la zanahoria y no puede ser suplida por la *zds2*<sup>74</sup>.



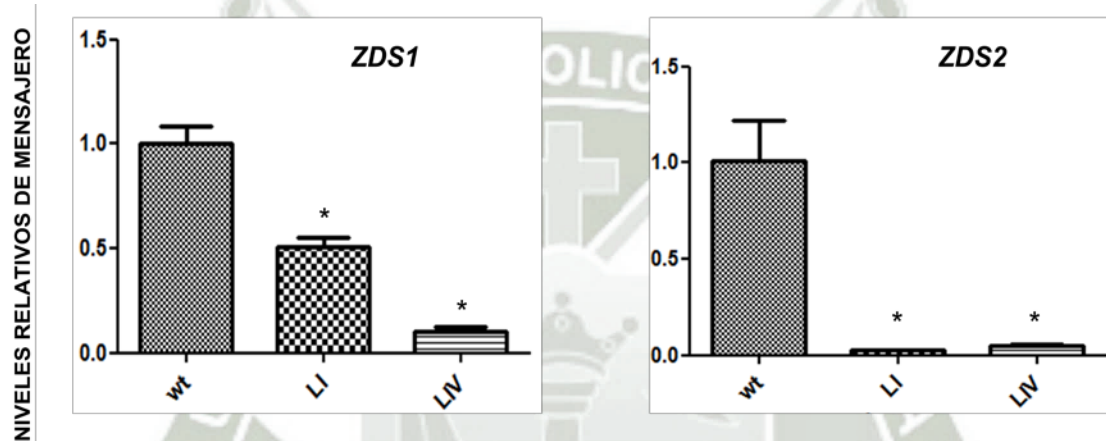
**Figura 6. Análisis de HPLC de carotenoides en las zanahorias silenciadas en *zds2*.**

Composición de los carotenoides totales (Total),  $\alpha$ -caroteno (a-carotene) y  $\beta$ -caroteno (b-carotene) tanto para raíz (A) como para hojas (B). En el caso de las hojas, además se determinó el nivel de luteína (Lut). El análisis se realizó para 4 líneas transgénicas (L1, L2, L3, L6) y zanahorias silvestres (wt). El asterisco (\*) indica diferencias significativas. (Flores, 2010).

Plántulas silenciadas en *zds1* y *zds2* fueron obtenidas con mucho esfuerzo (Figura 7). De las 4 plántulas obtenidas, sólo la LI presenta un fenotipo relativamente normal, el resto de las líneas (LII, LIII, LIV) no presentan una apariencia comparable a la de una plántula obtenida de un proceso normal de embriogénesis somática. La línea II presenta un incipiente tejido foliar, no obstante, junto con las líneas LIII y LIV tienen un tamaño muy reducido y no muestran el desarrollo de una raíz principal clara<sup>74</sup>. Dos plántulas fueron analizadas por qPCR (Figura 8), y existe una buena correlación entre el fenotipo de las líneas y los niveles de silenciamiento. La línea LI que posee un 59% de silenciamiento, tiene un fenotipo mucho más parecido al de una plántula silvestre que la línea IV que posee un 89% de silenciamiento y su fenotipo dista mucho del de una plántula normal<sup>74</sup>.



**Figura 7. Plantulas doble silenciadas en *zds2*.**A) Línea 1 (LI) B) Línea 2 (LII) C) Línea 3 (LIII) D) Línea 4 (LIV) E) Plántula silvestre (Flores, 2010) (Flores, 2010)



**Figura 8. Análisis de RT-PCR cuantitativo de zanahorias co-transformadas con pHG/z2 y pMD/z1N.** Se determinaron los niveles de abundancia relativa de los genes *zds1*, *zds2*. WT: zanahoria silvestre. LI, LIV: líneas transgénicas obtenidas de la embriogénesis somática. Los valores se normalizaron respecto a los niveles de expresión del gen 18S y los niveles de mensajero de plantas de zanahoria silvestres se ajustaron a 1. Los resultados con diferencias significativas se indican con un asterisco (\*) (Flores, 2010)

Se estuvo intentando amplificar la *zds2* a partir de cDNA y no se consiguió, además se realizó una búsqueda en una base de datos de secuencia génica (EST) y se encontró para *zds1* y no para *zds2*.

Es por ello, que en esta tesis se estudió la funcionalidad del gen *zds1* y se evaluó su localización subcelular.

## 8. *Nicotiana tabacum* y expresión transitoria

El tabaco (*Nicotiana tabacum*) es un modelo vegetal extremadamente versátil para el cultivo de células y tejidos e ingeniería genética. La mayoría de los descubrimientos en este campo en el campo se han originado a partir de experimentos con plantas de tabaco como: in vitro en medio de cultivo, primeras plantas transgénicas, expresión génica y experimentos de estabilidad de genes, expresión de transgenes<sup>94</sup>.

La expresión transitoria mediada por *Agrobacterium* (Agroinfiltración) se basa en la infiltración de cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* en hojas de las plantas intactas. La bacteria posteriormente transfiere un segmento de ADN, llamada ADN de transferencia o T-ADN, en las células vegetales. Para ello, se usan los vectores binarios que puede llevar a insertos de hasta más de 100 kpb. El ADN transferido a una célula de planta se trasladará al núcleo, donde sus genes pueden ser transcritos y expresado. La mayoría de las células de la planta en la región infiltrada expresa el transgén y la expresión alcanza su nivel más alto de 2-3 días después de la infiltración. En etapas posteriores de la expresión se apaga mediante el silenciamiento de ARN. Una limitación de la agro infección es el pequeño tamaño de la inserción (< 2 kb) en el genoma viral. Indiscutiblemente, la principal ventaja de agroinfiltración sobre la transformación estable es su velocidad. Además, en comparación con otros sistemas de expresión transitoria (transformación de protoplastos, bombardeo de partículas y la microinyección), tiene las ventajas de que es barato, porque se basa en una tecnología simple. La Agroinfiltración es utilizada en muchos tipos de experimentos; como estudiar la función de genes, la producción de proteínas, la interacción huésped-patógeno, la interacción proteína-proteína y localización de la proteína. El *Agrobacterium* se aplica ya sea usando vacío o por la infiltración de la jeringa. Considerando que la infiltración al vacío tiene la ventaja de que hojas o plantas enteras pueden infiltrarse a la vez, la infiltración de la jeringa es más fácil y se utiliza con mayor frecuencia para la producción de proteínas a pequeña escala. La principal ventaja de la infiltración de jeringa es que diferentes genes, ya sea solo o en combinación, se puede expresar en una única hoja. Agroinfiltración jeringa ha sido aplicado con éxito en una variedad

de especies de plantas prefiriendo la *Nicotiana tabacum* (tabaco), porque esta planta tiene un ciclo de vida corto, tiene hojas grandes y fácilmente infiltrables y no muestra necrosis tras la infiltración con las cepas de *Agrobacterium*<sup>94</sup>.

## 9. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. La muestra se desplaza con una fase móvil que puede ser un líquido. Esta fase móvil se hace pasar de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente<sup>93</sup>.

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada, por su sensibilidad, fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y su gran aplicabilidad a sustancias de interés industrial y científico<sup>93</sup>.

Desde finales de 1970, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se ha convertido en un procedimiento ampliamente utilizado para la determinación de los carotenoides, principalmente debido a que la técnica de separación, no es destructivo y, más importante, se consigue una mayor resolución. Sin embargo, la mayoría de los informes en la literatura de acuerdo con el análisis de un número limitado de alimentos. La aplicación de HPLC para el análisis de los carotenoides en los alimentos está siendo desarrollado y mejorado debido a la naturaleza complicada de estos procedimientos<sup>93</sup>.

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Material Biológico

##### Bacteriano

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

Genotipo de la cepa de *E. coli* DB3.1: F- gyrA462 endA1 glnV44  $\Delta$ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5  $\Delta$ leu mtl1.

Genotipo de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101: C58, plásmido Ti curado, GenR, RifR.

##### Vegetal

*Arabidopsis thaliana spc1-1*: Col0

*Arabidopsis thaliana* silvestre: Col0

*Nicotiana tabacum* variedad Xanthi NN y *Daucus carota* variedad Nantes (solo para obtención de cDNA).

#### 2. Reactivos

Se emplearon los reactivos de la calidad adecuada respecto a las técnicas de biología molecular desarrolladas. Estos productos fueron obtenidos de las empresas y marcas registradas como Invitrogen, Fermentas, Promega, Axygen, New England Biolabs, Biorad, Merck, US Biological, MO BIO laboratories Inc., Phyto Technology Laboratories y Sigma-Aldrich.

### 3. Cultivos Bacterianos

#### 3.1 Cultivo de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  se creció en medio LB líquido (1% (p/v) de triptona, 0.8%(p/v) de NaCl, 0,5%(p/v) de extracto de levadura), a 37°C con una agitación de 200 rpm. Para medio LB sólido, a la mezcla de LB líquido se le agregó agar 1.6% (p/v) y se incubó en una placa de Petri durante 16 h a una temperatura de 37°C. Tanto para el cultivo líquido como para el sólido, se agregó los antibióticos correspondientes a la resistencia otorgada por el vector (espectinomicina 100 mg/mL o kanamicina 100 mg/mL).

Para el crecimiento de *A. tumefaciens* se incubó en medio LB líquido y sólido con los antibióticos rifampicina (10mg/L) para la selección cromosómica y gentamicina (50mg/L) para la selección del plásmido Ti, además del antibiótico correspondiente para la selección del plásmido de interés (kanamicina 100 mg/mL). El cultivo líquido con *Agrobacterium* se incubó durante 20 h, con una agitación de 200 rpm, mientras que el cultivo sólido fue de 48 h, ambos a temperatura de 28°C. A partir de los cultivos líquidos se realizó un respaldo en glicerol al 33% de cada clon y se almacenó a -80°C.

#### 3.2 Quimiocompetencia de células de *Escherichia. coli* y *Agrobacterium tumefaciens*

Se induce estado de “competencia” en bacterias para poder introducir DNA foráneo con alta eficiencia dentro de ellas. Una alternativa es el uso de agentes químicos permite debilitar la estructura de su pared celular que junto al shock térmico permite que se pueda introducir en las células DNAs derivados de otras fuentes.

Un cultivo de *E. coli* DH5 $\alpha$  se incubó a 37°C hasta alcanzar una D.O.600 de 0,5, después se centrifugó a 4°C durante 10 min a 5000 g, y se resuspendió en 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M. Luego, se centrifugó nuevamente a 4°C por 5 min a 5000 g y el

precipitado se resuspendió en 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M. Finalmente, se incubaron las células a 4°C durante 30 minutos y se almacenaron en glicerol 33% a -80°C. Para el caso de *A. tumefaciens*, el cultivo se incubó a 28°C hasta alcanzar una D.O.600 sobre 0,5. Las células se mantuvieron en hielo durante 10 min y se centrifugó a 4°C durante 20 min a 3000 g, para posteriormente resuspenderlas en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM. Finalmente, las células se congelaron con nitrógeno líquido para ser almacenadas a -80°C hasta su utilización.

### 3.3 Transformación de células quimio-competentes

Para la transformación de *A. tumefaciens* se descongeló en hielo una alícuota de 100 µl de células quimio-competentes de *A. tumefaciens* y se mezcló con 300ng del vector de destinación con el respectivo inserto (pGWB5/z1ST). Luego, se aplicó el golpe térmico a las células incubando la mezcla en nitrógeno líquido durante 5 min. Posteriormente, se descongeló a 23°C durante 15 min. La mezcla se cultivó en agitación en medio LB líquido a 28°C durante 18 h. Finalmente, las células se centrifugaron, se eliminó la mayor parte del sobrenadante y se resuspendieron en el volumen remanente. La mezcla de la transformación se cultivó en placas de Petri con medio LB sólido con los antibióticos adecuados para la selección (rifampicina 10 mg/mL, gentamicina 100 mg/mL y kanamicina 100 mg/mL) por 48 h a 28°C.

### 3.4 Cultivo de *Agrobacterium. tumefaciens* para la transformación transitoria en *Nicotiana tabacum*.

Para la preparación de este cultivo, se inoculó 80 µL de *A. tumefaciens* transformadas (sección II, 3) con el vector pGWB5/z1ST (sección III, 2) en 30 mL de LB con los antibióticos respectivos y se crecieron de manera convencional en agitación durante 24 h a 28°C. Luego, se centrifugó por 5 min a 5500 g, se eliminó el sobrenadante y resuspendió en MS líquido<sup>76</sup> con acetosiringona a una concentración final de 25 mM. Finalmente, se incubó por 2 h en agitación a 28°C antes de utilizarlo para infectar el tejido vegetal.

### 3.5 Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* para el Método del FloralDip

El Floral dip es el primer método que la mayoría de biotecnólogos vegetales aprenden con el fin de establecer una línea transgénica y es el método más comúnmente utilizado para transformar *Arabidopsis*. Es la forma más fácil de modificar genéticamente una planta. En esta técnica, se sumergen inflorescencias de *Arabidopsis thaliana* en una solución de *A. tumefaciens*, sucrosa y Silwet L-77<sup>82</sup>.

Para la preparación de este cultivo, se inoculó 80  $\mu$ L de *A. tumefaciens* transformadas en 30 mL de LB con los antibióticos respectivos y se crecieron de manera convencional en agitación durante 24 h a 28°C. Luego, se centrifugó por 5 min a 5500 g, se eliminó el sobrenadante y resuspendió en solución fresca de sacarosa 5% hasta una D.O.600 de 0,8. La solución se colocó en vasos precipitados altos y se agregó Silwet L-77 a una concentración de 0,05% y se mezcló bien.

## 4 Cultivos vegetales

### 4.1 Cultivo de *Arabidopsis thaliana* spc1-1

Para el cultivo de *Arabidopsis thaliana* silvestre y mutante se usó el método hidropónico con lana de roca. En cada contenedor se colocó una semilla sobre cada soporte de lana de roca humedecidas con medio hidropónico. Se llevó a un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 en oscuridad a temperatura constante de 22°C. El medio hidropónico que se usó para el cultivo comprende los siguientes macronutrientes: 125 mM  $\text{KNO}_3$ , 150 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 75 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , y micronutrientes: 5mMKCl, 5 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1 mM  $\text{MnSO}_4$ , 200  $\mu$ M  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 150  $\mu$   $\text{CuSO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si}$ , 10 mM Fe-dietilenetriaminapentaacetato; el medio se agitó constantemente protegido de la luz para lograr pH 6.

#### 4.2 Cultivo de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *A. thaliana* silvestres y transformantes se esterilizaron con 1ml de cloro 50% (v/v) con una gota de tween 20 por 7 minutos en agitación. Posteriormente, se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril. Finalmente, las semillas se sembraron en placas petri con medio MS sólido (Medio basal Murashige & Skoog 0,44%, mioinositol 100 ppm, sacarosa 20% y agar-agar 7%) a pH 5,8, además se agregó kanamicina 25mg/L si eran semillas provenientes de la transformación con FloralDip. Las placas fueron colocadas en un incubador con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 de oscuridad a una temperatura de 22°C. Al cabo de 4 semanas las plantas tuvieron un tamaño adecuado para los experimentos.

#### 4.3 Cultivo de *Nicotiana tabacum*.

Para la transformación transitoria de tabaco se usaron plantas cultivadas *in vitro*. Para esto se esterilizaron las semillas con una solución de detergente y cloro (5%) por 10 min. Posteriormente, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Finalmente, las semillas se sembraron en frascos de vidrio con medio MS sólido (Medio basal Murashige & Skoog 0,44%, mioinositol 100 ppm, sacarosa 20% y agar-agar 7%) a pH 5,8. Al cabo de 6 semanas las plántulas fueron trasladadas a invernadero y cultivadas en el sistema hidropónico con un fotoperiodo de 16 h de luz a una temperatura de 22°C hasta cumplir los tres meses, momento en el cual fueron utilizadas.

### 5 Métodos de Biología Molecular

#### 5.1 Extracción de ADN genómico de plantas

Para la extracción de DNA genómico se siguió el protocolo descrito por Doyle y Doyle en 1987; que consta de una etapa de lisis de células, degradación de proteínas y de purificación. Para ello, se congelaron aproximadamente 200mg de tejido vegetal en nitrógeno líquido y se homogenizaron con 0,6 ml de CTAB (cetil trimetilamonio bromuro) al 2%, adicionando 1,4M de NaCl, EDTA 20mM

y Tris pH 8 100mM. El homogenizado se mantuvo a 60°C por 30 minutos y se agregó nuevamente 0,4 ml de CTAB e incubó a 70°C por 5 minutos. Luego, se agregó 200µl de mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), centrifugó y separó la fase acuosa (superior) de la orgánica. La fase acuosa que contiene el ADN se transfirió a otro tubo Eppendorf para precipitar el ADN con isopropanol por 40 minutos a -20°C. Posteriormente, se centrifugó, lavó el precipitado con etanol 70%, se volvió a centrifugar y eliminó el sobrenadante; el precipitado se secó a temperatura ambiente por 10 minutos y resuspendió en agua nanopura.

## 5.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las siglas PCR significan "**P**olimerase **C**hain **R**eaction", Reacción en Cadena de la Polimerasa. La PCR es una técnica para la síntesis "in vitro" de secuencias específicas de ADN. La PCR se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5' → 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados cebadores (primers). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA que se desea amplificar.<sup>92</sup>

Partiendo de este principio, la reacción en Cadena de la Polimerasa es la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

**1ª Desnaturalización** del ADN doble cadena.

**2ª Hibridación** de los cebadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras

**3ª Extensión** del cebador por actuación de la DNA polimerasa.<sup>92</sup>

Las reacciones de PCR estarán compuestas por: 1X de tampón de la enzima, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de los partidores sentido y antisentido (Tabla I), 0,2 mM de dNTPS y 1U de Taq polimerasa, además de ADN, cADN o cultivo bacteriano como molde.

El programa estándar utilizado tuvo como paso inicial la desnaturalización del ADN por 4 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de: 40 segundos de desnaturalización a 94°C, 35 segundos de hibridación a 52°C y 40 segundos para la extensión a 72°C. Finalmente, se dejó a 72°C por 10 minutos.

Para visualizar el ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Este fue preparado con tampón TAE 1X (Tris-acetato 40mM y EDTA 1 mM, pH 8) y bromuro de etidio (Bret) 1µg/mL. Las muestras fueron mezcladas con el tampón de carga (Azul de bromofenol 0,25%, xilenecyanol 0,25% y glicerol 80%) previo a ser cargadas en el gel.

### 5.3 Extracción de RNA de plantas

Se utilizó el método de TRIZOL® Reagent (Invitrogen), siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante. Comienza con la homogenización de la muestra con el reactivo TRIZOL®, es agregado el cloroformo el homogenizado tiene dos fases, la acuosa es la que contiene RNA, este es precipitado por isopropanol; es lavado para remover impurezas y resuspendido en agua libre de RNAasas. En la etapa de la homogenización, se utilizó un mortero para moler 50-100mg de material vegetal en nitrógeno líquido con 1ml de TRIZOL® Reagent. En la separación, se incubó el homogenizado por 5 minutos de 15 a 30°C, luego se agregó 200µl de cloroformo y se agitó por 15 segundos e incubó 30°C por 3 minutos. Después, se centrifugó a 12000g por 15 minutos a una temperatura de 4°C. En la precipitación, se transfirió la fase acuosa (clara) a un nuevo tubo Eppendorf y se precipitó el RNA con 500 µl de isopropanol e incubó 10 minutos a 30°C y centrifugó a 12000g por 10 minutos a 4°C. En el lavado, se removió el sobrenadante, se lavó el pellet con 1ml de etanol-DEPC 75% y se centrifugó a 7500g por 5 minutos a 4°C. Después se secó el pellet a temperatura de ambiente por 10 minutos luego se redisolvió el RNA en 20µl de agua DEPC (Dietil pirocarbonato) luego se incubó por 10 minutos a 60°C, se cuantificó en NanoDrop™.

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

Se trató 7 $\mu$ g de ARN extraído con DNasaI (Fermentas). Este tratamiento estuvo compuesto por: 1X tampón de la enzima con MgCl<sub>2</sub>, 40 U de inhibidor de RNasa y 1U de DNasaI y se siguió las instrucciones del fabricante. Se llevó a 37°C por 35 minutos y se puso en hielo, luego se agregó 50mM EDTA-DEPC y nuevamente a hielo.

Para la síntesis de cADN se utilizó Transcriptasa Reversa Improm-II (Promega). Se mezcló 9,5  $\mu$ l de ARN tratado con DNasaI con 30 $\mu$ M de partidor AP (5'-CGCCACGCGTCGACTAGTAC TTTTTTTTTTTTTTTTTT -3') durante 5 minutos a 70°C, luego los tubos se pusieron en hielo por 5 minutos y se agregó el Mix RT que consiste en: 5X Tampón de la enzima, 40U de inhibidor de RNasa, 250mM de MgCl<sub>2</sub>, 25mM dNTPs, 600U de Transcriptasa Reversa y se completó hasta 37,5 $\mu$ l con agua-DEPC. El programa continuó con 5 minutos a 25°C para la hibridación, luego 60 minutos a 42°C para la extensión y finalizó con la inactivación de la enzima sometiendo la reacción a 70°C durante 15 minutos.

#### 5.5 Amplificación del gen *zds1* con *Pfu* DNA polimerasa

Las reacciones de PCR estaban compuestas por: 1X de tampón de la enzima con Mg<sup>+2</sup>, 0,2  $\mu$ M de los partidores sentido y antisentido (Tabla I), 0,2 mM de dNTPs y 2,5 U *Pfu* DNA polimerasa, además de DNA plasmídico pCR8/z1ATG.

El programa utilizado tuvo como paso inicial de desnaturalización del ADN por 3 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de: 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 35 segundos de hibridación a 65°C y 4 minutos para la extensión a 72°C. Finalmente, se realizó la extensión a 72°C por 8 minutos.

Para visualizar el fragmento amplificado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Este fue preparado con tampón TAE 1X (Tris-acetato 40mM y EDTA 1 mM, pH 8) y bromuro de etidio (Bret) 1 $\mu$ g/mL. Las muestras fueron mezcladas con el tampón de carga (Azul de bromofenol 0,25%, xilenecyanol 0,25% y glicerol 80%) previo a ser cargada en el gel.

## 5.6 Adición de Adenina a los extremos del amplificado

La reacción estuvo compuesta por: 1X de tampón de la enzima con  $MgCl_2$  50mM, 0,2  $\mu$ M de dATPs, 1U de Taq polimerasa y 200ng de DNA amplificado. Se dejó 30 minutos a 72°C.

## 5.7 Digestiones enzimáticas

Para determinar la orientación del gen *zds1* en las construcciones pCR8/*zds1*ST se digirió con las enzimas de restricción SacI y EcoRV. La reacción contenía 200 ng del DNA plasmidial de la construcción, buffer Tango 1X, y 10 U de la enzima SacI. Esta reacción se incubó por 1 h a 37°C. Luego se agregó buffer Tango hasta 2X y 5 U de la enzima EcoRV y se volvió a incubar por 1 h a 37°C. Para determinar la orientación en que se clonó el gen *zds1* en el vector de destinación pGWB5, se digirió con la enzima de restricción SacI. La reacción contenía 250 ng del DNA plasmidial de la construcción, buffer Tango 1X, y 5 U de la enzima SacI. Esta reacción se incubó por 2 h a 37°C. Las reacciones de digestión enzimática fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa y las bandas visualizadas mediante tinción con Bromuro de Etidio (BrEt).

**Tabla I.** Enzimas de restricción utilizadas (BioLabs® Inc.)

Enzima de Restricción	Sitio de corte
SacI	5'... GAGCTC... 3' 3'... C $\uparrow$ TCGAG... 5'
EcoRV	5'... GATATC... 3' 3'... CTA $\uparrow$ TAG... 5'

## 6. Construcciones Genéticas

Las construcciones generadas fueron obtenidas por medio de la metodología Gateway® la cual se basa en las propiedades de recombinación sitio-específicas del bacteriófago lambda ( $\lambda$ ) para realizar las etapas de clonamiento y sub-clonamiento en la obtención de las construcciones genéticas.

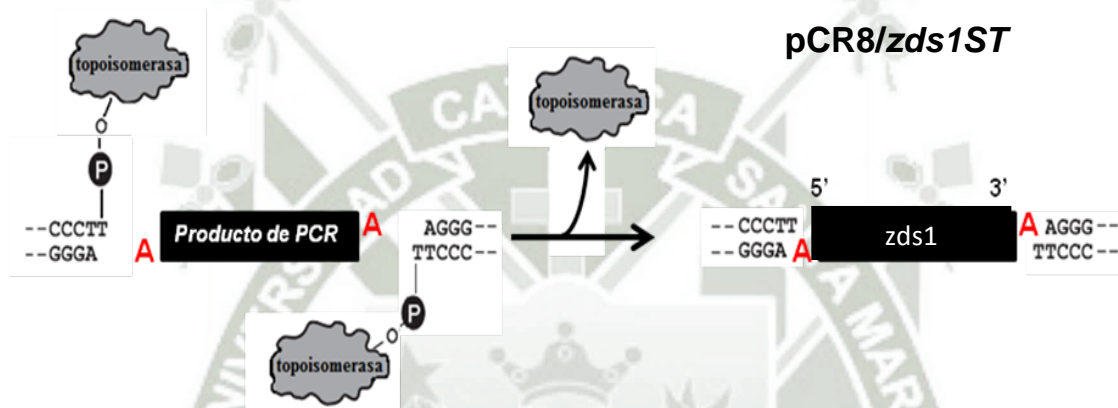
Para ingresar la secuencia de interés a esta plataforma de clonación Gateway®, existen vectores denominados “vectores de entrada”. Estos vectores cuentan con una

enzima del tipo topoisomerasa unida covalentemente a ellos (Figura 9). Esta enzima se denomina comercialmente TOPO® y es capaz de ligar las hebras de DNA de la secuencia de interés, en este caso un producto de PCR, con dicho vector de entrada.

Una vez realizada la clonación, la enzima es escindida del vector, y se obtiene el vector de entrada con el gen de interés (Figura 9).

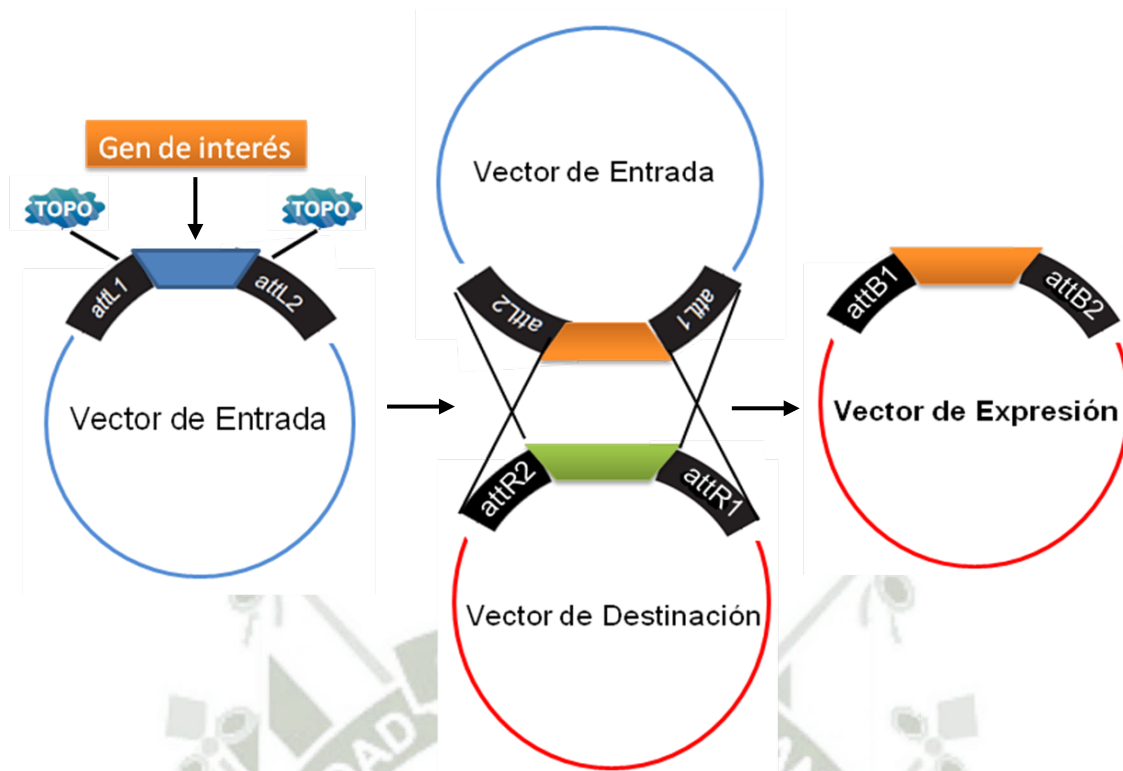
Luego de clonar el fragmento de interés en el vector de entrada, éste se transfiere al vector final de destinación mediante recombinación sitio específico (Figura 10).

Existe una amplia gama de estos vectores dependiendo del estudio que se desee realizar. En este trabajo se utilizó los vectores de destinación pGWB5 y pGWB2.



**Figura 9. Esquema de la clonación del fragmento de interés en el vector de entrada.** El producto de PCR que presenta una base adenina en sus extremos se introducirá por medio de una unión de la base A con una timina libre presente en los extremos del vector pCR8, obteniendo de esta manera la construcción pCR8/*zds1*.

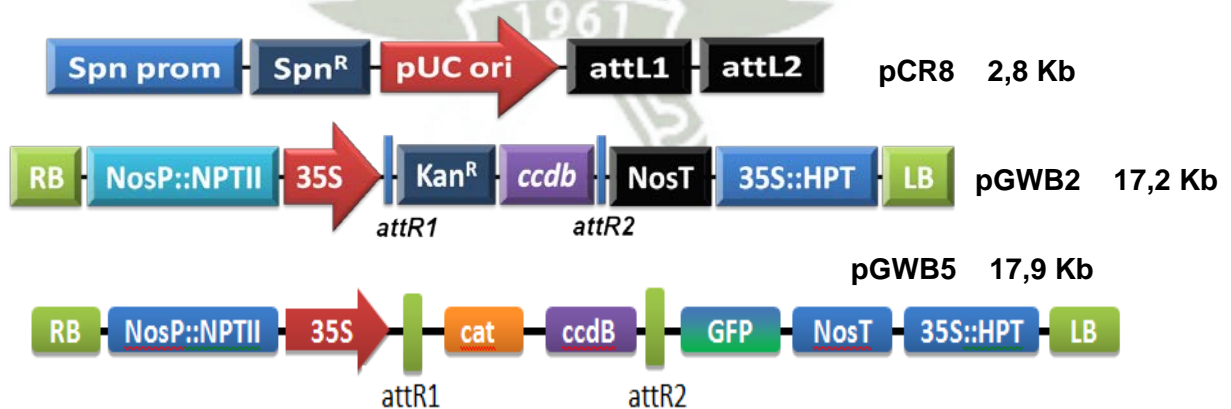
Este mecanismo de recombinación requiere de una enzima denominada LR Clonasa® que pertenece a la familia de las integrasas y tiene la capacidad de generar interacciones intra e inter-moleculares. Esta característica permite que la enzima pueda realizar la recombinación completa a través de un mecanismo de corte y ligación de las hebras (Figura 10). Para ello se ponen en contacto el vector de entrada que posee clonado el gen de interés entre los sitios attL y el vector de destinación en presencia de la LR Clonasa®. Producto de la recombinación sitio-específica entre los sitios attL del vector de entrada y attR del vector de destinación, se generan dos productos, uno de ellos es el vector de destinación con el gen de interés (Figura 10).



**Figura 10. Esquema de la recombinación sitio-específica.** En este proceso las las secuencias attL y attR presentes en el vector de entrada y de destino, recombinana para dar origen el vector de expresión que porta el gen de interés flanqueado de Iso sitios attB. La LR Clonasa® es la enzima que permite cortar y ligar el material genético.

### 6.1 Vectores usados en este trabajo

A continuación se muestra un esquema de los vectores utilizados en este trabajo y a partir de las cuales se diseñaron las construcciones obtenidas en el mismo.



**Figura 11. Esquema de los vectores de entrada y destino empleados en esta tesis.** pCR8, vector de entrada para la clonación del gen *zds1* de *Daucus carota*.

También se esquematizan los vectores de destinación usados para integrar de manera estable (PGWB2) o transitoria (pGWB5) el gen *zds1* de *Daucus carota* en el genoma de las plantas. Cada uno de estos vectores posee uno o dos promotores 35S y los genes de resistencia a antibióticos (kanamicina, higromicina, espectinomicina). pGWB5 posee además el gen reportero *Gfp* que permitirá generar una proteína de fusión con el gen *zds1* para observar la localización subcelular del gen de interés.

## 6.2 Generación de la construcción pGWB5/*zds1*

### 6.2.1 Clonación del gen *zds1* s/t en el vector de entrada pCR8®

Se amplificó el cDNA del gen *zds1* de *D. carota* (DQ222430) sin el codón de término de la traducción (s/t) (Tabla I) para generar una proteína de fusión al gen reportero *Gfp*, el cual codifica una proteína que bajo UV fluoresce de color verde y permite identificar la localización organelar de la proteína a la cual se encuentra fusionada.

Las condiciones de amplificación se estandarizaron mediante un PCR en gradiente. Para la amplificación de este gen se usó un partidor en sentido ATG y uno en antisentido sin terminador y la enzima PFU polimerasa (Fermentas) y se agregó colas de una base “A” en cada extremo del amplificado para facilitar su clonación en el vector de entrada (5.6). A partir de los productos del PCR se realizó la ligación del gen *zds1* s/t al vector de entrada pCR8/GW/TOPO. Para ello se tomó 150 ng del producto de PCR, 50 ng de vector, 1mL de la solución salina (0,2 M de NaCl y 0,01 M de MgCl<sub>2</sub>) y la enzima topoisomerasa presente en el vector. La mezcla de la reacción de ligación se incubó durante 18 h a 23°C antes de transformar las células quimio-competentes de *E. coli* DH5α mediante un golpe térmico.

### 6.2.2 Recombinación Gateway® entre los vectores de entrada y destinación

Para los experimentos de localización sub-celular del gen *zds1* se recombinó el vector pCR8/*zds1*ST con el vector de destinación pGWB5, el cual posee un promotor 35S y el gen que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP) (Figura 11). Para ello se mezcló 100 ng de la construcción pCR8/*zds1*ST, 240 ng del vector de destinación pGWB5, y 2 µL de la enzima LR Clonasa™ II Invitrogen para completar 10 µL de reacción de recombinación.

La mezcla de la reacción se incubó por 18 h a 23 °C. Para detener la reacción se agregó 1 µL de proteinasa K (Invitrogen) y se incubó durante 10 min a 37°C. Finalmente, se transformaron las bacterias quimio-competentes de *E. coli* DH5α por golpe térmico y se seleccionaron los clones transformantes en placas de Petri con LB sólido con los antibióticos respectivos.

## 7. Obtención de plantas de *Arabidopsis thaliana spc1-1* y *Nicotiana tabacum* que expresan el gen *zds1* de *D. carota*.

### 7.1 Transformación transitoria de hojas de tabaco con *Agrobacterium tumefaciens* que porta el vector pGWB5/*zds1 s/t*

La agro-infiltración se realizó en *N. tabacum* en donde se perfundió la suspensión de *A. tumefaciens* (sección II, 3.1) por la cara abaxial de hojas jóvenes usando una jeringa de 5 mL sin aguja y presionando suave y firmemente hasta observar la infiltración de una amplia región de la hoja<sup>77</sup>. Luego de 4 días, las hojas fueron cosechadas para los análisis.

### 7.2 Transformación de *Arabidopsis thaliana spc1-1* con *Agrobacterium tumefaciens* que porta el vector pGWB2/Z1A

Se utilizó el método del Floral Dip. Se cortó las inflorescencias a las plantas, conservó las silicuas y se sumergió en la solución (sección II, 7.2) por 30 segundos; se colocó en una bandeja y se cubrió con papel aluminio por un

periodo de 24 horas y luego se trató a las plantas normalmente cubriéndolas con plástico. Se repitió el procedimiento a la semana, se quitó el medio hidropónico cuando las silicuas maduraron y cosechó las semillas maduras.

## 8. Localización Subcelular del gen *zds1* de *D. carota* mediante Microscopía de fluorescencia

Para realizar los experimentos de localización subcelular se utilizó la construcción pGWB5/*zds1*ST, la cual cuenta con un promotor 35S doble y el gen que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP). El análisis de la localización subcelular se realizó verificando la fluorescencia de GFP en tejido vegetal de tabaco (hoja) transformado transitoriamente con el vector pGWB5/*zds1*ST mediante *A. tumefaciens* que porta este vector. Para lograr esta actividad se agro-infiltró hojas de tabaco con un clon de *Agrobacterium* que porta la construcción pGWB5/*zds1*ST. Luego de transcurridos 4 días de incubación a 23°C, se realizaron cortes muy finos del tejido infiltrado de hojas y se le sacó la lámina adaxial de cada hoja. Estas muestras fueron observadas bajo un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX70). Como control negativo se utilizaron muestras infiltradas con *Agrobacterium* transformado con el vector 35SCaMV:GFP y como control positivo se usaron muestras transformadas con 35S:recA:YFP.

## 9. Determinación de la cantidad y la composición de los carotenoides

### 9.1 Extracción de Pigmentos

Se molió tejido vegetal en presencia de N<sub>2</sub> líquido en un mortero y se homogenizó con 1 ml de solución de hexano/acetona/etanol (2/1/1 v/v). Se agitó durante 2 minutos en vortex y luego se mantuvo en hielo y oscuridad por 2 minutos. Después de centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos 4°C, se colectó la fase orgánica. Finalmente, la fase orgánica se secó en un concentrador a temperatura media quedando preparada para la cuantificación y análisis de pigmentos. Todo el proceso de extracción se realizó en oscuridad y frío.

## 9.2 Cuantificación de los pigmentos totales mediante espectrofotometría

Los carotenoides secados se resuspendieron en 1,5ml de acetona y se midió la absorbancia de esta solución a 470nm, 662nm, 645nm para determinar la cantidad de pigmentos totales (carotenoides totales y clorofila) mediante las siguientes fórmulas<sup>78</sup>:

$$C_a = 11.75 A_{662} - 2.350 A_{645}$$

$$C_b = 18.61 A_{645} - 3.960 A_{662}$$

$$C_{x+c} = 1000 A_{470} - 2.270 C_a - 81.4 C_b/227$$

Donde:

$C_a$ : Clorofila a,

$C_b$ : Clorofila b,

$C_{x+c}$ : Carotenoides totales

Para calcular el peso seco, se multiplicó el peso fresco por un factor de conversión calculado a partir del cociente entre el peso después y antes de la deshidratación de tres muestras de tejido.

Una vez obtenido los valores de absorbancia, las muestras se volvieron a secar en el concentrador a temperatura media y guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización para HPLC. Una vez obtenido los valores de absorbancia, las muestras se volvieron a secar con nitrógeno gaseoso y guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización para HPLC.

## 9.3 Composición de pigmentos mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para determinar la composición y la cantidad de los pigmentos presentes en las muestras obtenidas a partir de la extracción realizada anteriormente, se usó un equipo de HPLC Shimadzu, modelo LC-10AT con detector de diodos. La extracción de los carotenoides se resuspendió en 300 mL de acetona y se utilizó para el análisis de HPLC. Estos pigmentos se separaron por HPLC en una columna de fase reversa RP-18 Lichrocart 125-4 (Merck). Como fase móvil se utilizó acetonitrilo/metanol/isopropanol (85/10/5 v/v), con un flujo de 1,5 ml/min a temperatura ambiente, en condiciones isocráticas. Los espectros de cada máximo de elución fueron obtenidos utilizando un detector con arreglo de

diodos. Los carotenoides fueron identificados de acuerdo a sus espectros de absorción (Figura 12), tiempos de retención y comparación con estándares específicos para cada carotenoide<sup>79</sup>. Para la cuantificación de los carotenoides se usó el programa computacional LC-Solutions®, el cual determinó la cantidad de cada carotenoide como el área bajo la curva de cada pico. Con lo mencionado anteriormente se logró asignar de manera precisa un carotenoide a determinado pico.

Finalmente, para determinar la concentración de los carotenoides, se correlacionó el área correspondiente a los picos de interés con la concentración de los carotenoides totales obtenida previamente por espectrofotometría, y se calculó la concentración de los carotenoides detectados.

## 10. Adquisición y Procesamiento de Imágenes

Para la adquisición de imágenes *in vivo* se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX70) provisto de una cámara (Micropublisher 3.3, QImaging). Las imágenes fueron procesadas en Adobe Photoshop CS5.1 (San José, CA, USA).

## 11. Análisis estadístico

Los datos son presentados como promedios  $\pm$  desviación estándar, y los experimentos se realizaron por triplicado. El análisis estadístico fue realizado usando el programa GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). El nivel de probabilidad para la significación estadística fue de: ns,  $p > 0,05$ , no significativo; \*,  $0,01 < p < 0,05$ ; \*\*,  $0,001 < p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

## 12. Diseño de partidores

Partidores usados para la amplificación del gen *zds1* y el análisis de los clones. Los partidores se mantuvieron a una concentración de 250  $\mu\text{M}$  y se diluyeron a 10  $\mu\text{M}$  para su uso.

**Tabla II.** Partidores usados para la amplificación de fragmentos por PCR

Partidor	Secuencia (5' to 3')	Descripción
18S -F	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT	Se utilizan para verificar la integridad del ADN genómico. Amplifica un fragmento de 196pb del gen ARN ribosomal 18S.
18S -R	ACAATGATCCTTCCGCAGGT	
nptII-F	CAAGATGGATTGCACGCA	Amplifica el gen nptII y se utilizó para confirmar la inserción de la construcción pG/z1A. Amplifican un fragmento de 655pb.
nptII-R	CTATGTCCTGATAGCGGT	
Z1_3N-F	CACCTAACGACCTTGCGAAAAACA	Amplifica un fragmento de 295pb que incluye la región 3' NTR del gen <i>zdsI</i> .
Z1_3N-R	GAATTCAACCAAGTAAACGTATCCC	
Z1_ATG-F	ATGGCCGCCGCTTCTTCGTCTTTG	Amplifica un fragmento de 1719pb a partir del sitio de inicio hasta el final sin codón de término.
z1_ST-R	GACAAGGGTAACTCAGCTTCTGTA G	
LP-F	TCAGGTTGATTCCTTTGGATG	Se utilizan para verificar la mutación en <i>zds</i> de <i>A. thaliana</i> deberá amplificar una fragmento de 436-736pb
RP-R	TTCTCAGCACCCACCTACATC	
LB1.3	ATTTTGCCGATTTGGAAC	

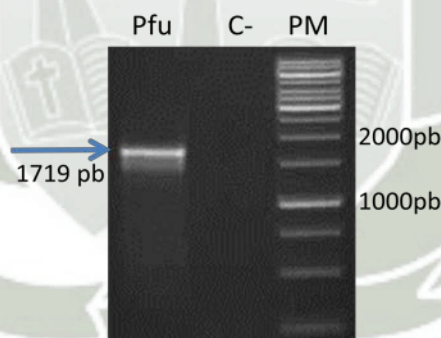
## CAPÍTULO III

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 1. Localización Subcelular de DcZDS1

1.1 Clonación del gen *zds1* s/t en el vector de entrada pCR8.

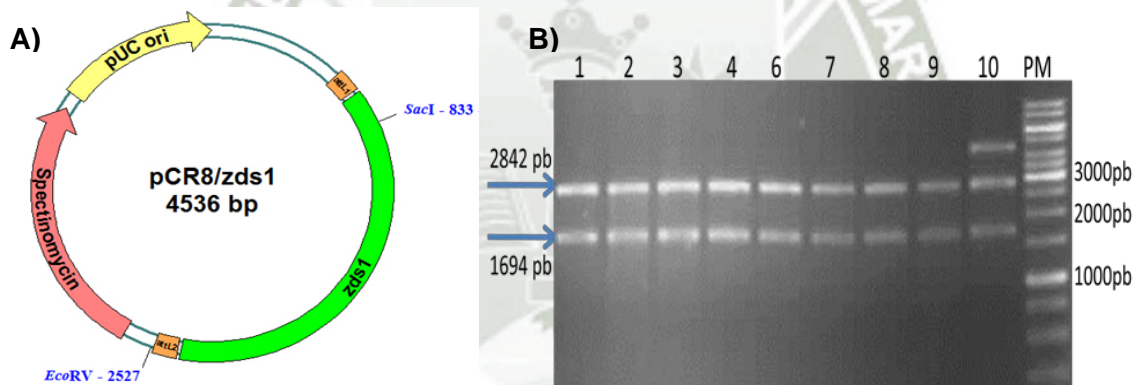
Para obtener la construcción *zds1* s/t en pCR8 se comenzó con amplificar el gen *zds1* de *D. carota* sin el codón de término a partir del vector pCR8/z1A generado en el tesis de título de Guillermo Wegener<sup>80</sup> el cuál contenía la secuencia completa del gen *zds1* y con los partidores Z1\_ATG sentido y Z1-ST antisentido (sección II, 10; Tabla I). En la Figura 12 se muestra la amplificación del fragmento de 1719 pb correspondiente al gen *zds1* sin el codón terminador de la traducción (*zds1* s/t). El control negativo (carril C-, Figura 12) no presenta amplificado, lo que refleja una correcta manipulación de las muestras y desarrollo de la técnica.



**Figura 12. Amplificación del gen *zds1* sin codón de término de la traducción.** Se amplificó un fragmento de 1719pb correspondiente al gen *zds1* de *D. carota* a partir de DNA plasmidial (vector pCR8/z1A). Como control negativo (C-) se usó agua como molde. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con BrEt. PM: Estándar de peso molecular de 1Kb.

Una vez obtenido el amplificado del gen *zds1* de *D. carota* se llevó a cabo la reacción de ligación con el vector pCR8 y la transformación de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante golpe térmico (sección II, 3).

De las colonias obtenidas se seleccionaron nueve y se incubaron por 16 h en medio LB líquido con el antibiótico espectinomicina (50mg/L). Luego, se extrajo el DNA plasmidial mediante kit de extracción, el cual se digirió con las enzimas de restricción SacI y EcoRV para corroborar la presencia y orientación del gen en el vector. La enzima SacI corta una vez en el inserto, mientras que la enzima EcoRV corta una vez en el vector pCR8. De las nueve colonias digeridas para la construcción, se obtuvieron ocho colonias que presentaron dos bandas de 2842 y 1694pb (Figura 13); de acuerdo a lo esperado para un vector que porta el cDNA del gen *zds1* en orientación sentido respecto del origen de replicación pUC y del sitio attL1. El patrón de bandas para el inserto del gen en antisentido es distinto del esperado (274 y 4262 pb).

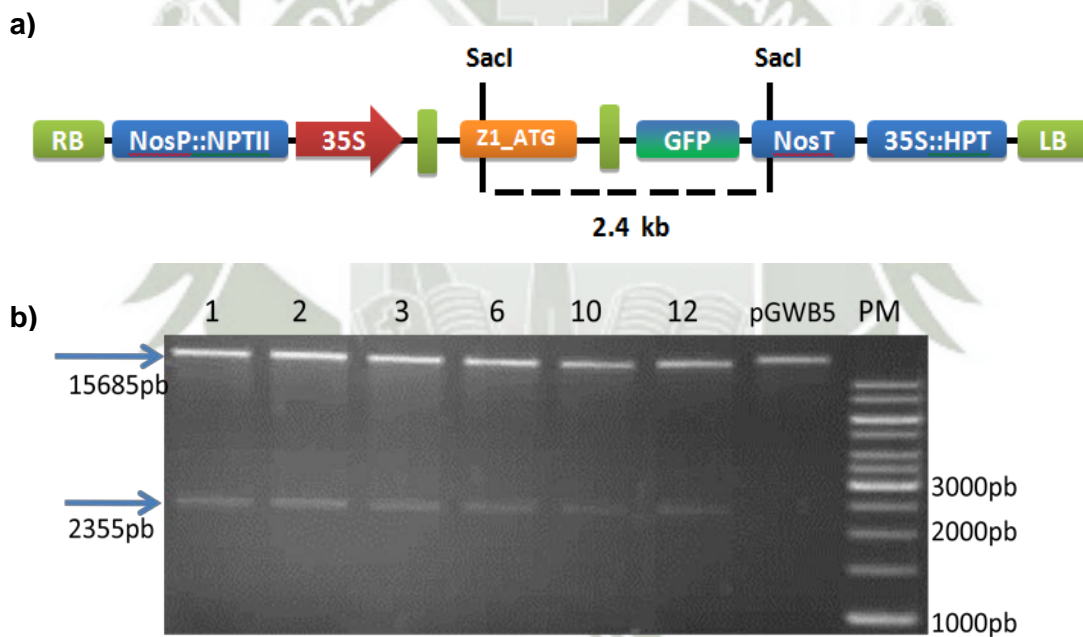


**Figura 13. Digestión enzimática de la construcción pCR8/*zds1* s/t.** A) Esquema del vector pCR8/*zds1* s/t donde se indica el sitio de corte de las enzimas SacI y EcoRV y el gen *zds1* de *D. carota* clonado en orientación sentido. B) Carriles 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 y 10: Digestión del DNA plasmidial de nueve clones que portan el vector pCR8/*zds1* s/t (sin codón de término) con las enzimas SacI y EcoRV. Las flechas indican los tamaños de 2842pb y 1694pb esperados en los clones en orientación sentido del gen. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con Bret. PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb.

## 1.2 Construcción del vector binario pGWB5/*zds1* s/t.

Una vez obtenido los clones positivos de pCR8 que portan el fragmento de *zds1* s/t en orientación sentido, se procedió a generar la construcción pGWB5/*zds1* s/t mediante recombinación sitio-específica (Tecnología Gateway®, sección II, 6) con el vector pGWB5 (17961pb), el cual permite fusionar genes de interés a la proteína GFP. Es así como se podrá determinar mediante fluorescencia de esta proteína, la localización sub-celular de la proteína DcZDS1.

Una vez realizada la recombinación, se realizaron los análisis moleculares que permitieron corroborar la orientación en sentido del gen *zds1* con respecto al promotor 35S presente en el vector pGWB5. Esta construcción fue digerida con la enzima de restricción *SacI*, la cual presenta un sitio de corte en el vector de expresión y otro en el gen *zds1*. (Figura 14A).

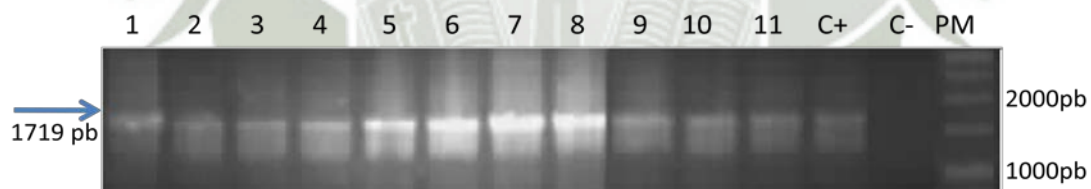


**Figura 14. Digestión de la construcción pGWB5/*zds1* s/t con *SacI*.** a) Esquema de la digestión indicando los sitios de restricción de *SacI* en el vector pGWB5/*zds1* s/ty el tamaño de 2355pb esperado para una orientación sentido respecto al promotor. b) Carriles 1, 2, 3, 6, 10, 12 y pGWB5 digeridos con *Sac I*: Digestión del DNA plasmidial de seis clones que portan el vector pGWB5/*zds1* s/t (sin codón de término). Las flechas indican los tamaños de 2355pb y 15685pb esperados en los clones en orientación sentido del gen. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con Bret. PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb.

Se observó que colonias de las cuales se extrajo DNA plasmidial y fueron digeridas presentaron dos bandas de 15685 pb y 2355 pb para el vector pGWB5/*zds1* s/t. Se observa que el vector pGWB5 sin inserto digerido presenta una sola banda confirmando que *SacI* tiene un solo corte en dicho vector (Figura 14B). De este modo contamos con seis clones que posee el gen *zds1* clonado en sentido respecto al promotor 35SCaMV, los que fueron usados posteriormente para transformar *Agrobacterium tumefaciens*.

### 1.3 Obtención de *Agrobacterium tumefaciens* transformado con el vector pGWB5/*zds1*.

Se obtuvieron colonias de *A. tumefaciens* transformadas con los vectores pGWB5/*zds1* s/t a partir de las cuales se hizo un PCR de colonias con partidores específicos para el gen *zds1* de *D. carota* (Z1\_ATG s y Z1\_ST, Tabla I) y poder corroborar de manera temprana que la construcción con el gen de interés efectivamente se integró en el genoma de *A. tumefaciens*. Se obtuvieron 11 clones que amplificaron el gen *zds1* (Figura 15).



**Figura 15. PCR de colonia de *A. tumefaciens* transformado con el vector pGWB5/*zds1*.** En los clones positivos se observa el amplificado de 1719 pb correspondiente al gen *zds1* de *D. carota*. C-: control negativo, se utilizó agua en lugar de ADN como molde. C+: control positivo, se utilizó ADN plasmidial pGWB2/z1A generado por Carlos Flores (Flores, 2010). PM: estándar de peso molecular de 1kb. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Bret.

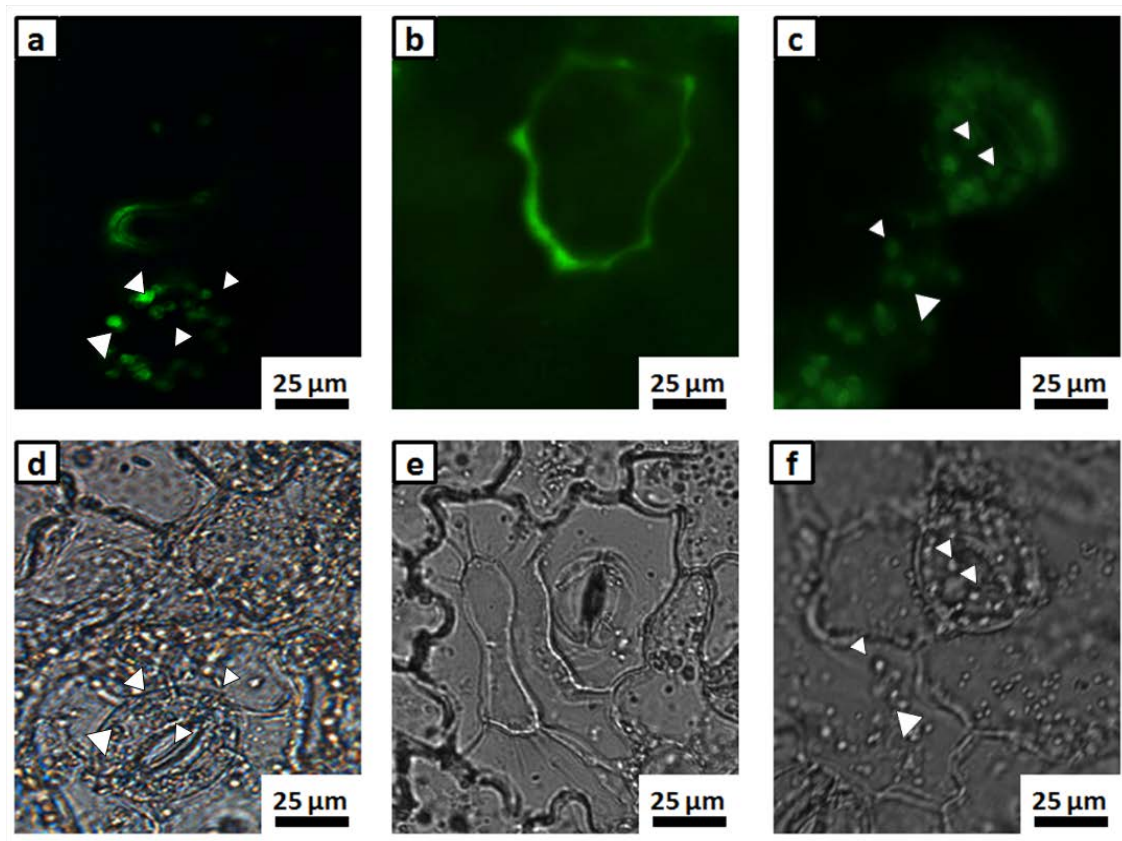
La confirmación de la correcta clonación e inserción del gen *zds1* en el vector de expresión y en *A. tumefaciens*, permitieron seguir con el proceso de transformación transitoria de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) de manera de evaluar la localización sub-celular de la proteína DcZDS1.

#### 1.4 Determinación de la localización sub-celular de la proteína DcZDS1

Para evaluar la localización sub-celular se empleó la construcción pGWB5/*zds1*, en la cual produce una proteína ZDS1 fusionada a la proteína reportera GFP. Además, como control positivo se usaron construcciones 35SCaMV:recA-GFP<sup>81</sup> que presenta el gen *recA*, que codifica para una proteína de localización plastidial, y que se encuentra fusionada a GFP (donado por la Dra. Lee Meisel), y la construcción 35SCaMV::GFP como control negativo. Estos vectores se emplearon para transformar de manera transitoria (agro-infiltración) hojas de tabaco y al cabo de 4 días se realizaron cortes delgados del tejido y se observaron bajo un microscopio de epifluorescencia con el fin de detectar la fluorescencia del GFP.

Al infiltrar con el vector pGWB5/*zds1* se observa un patrón de fluorescencia de GFP de puntos discretos de forma ovalada dentro de la célula, el cual es característico de los plastidios vegetales (Figura 16a) y que se puede observar también en nuestro control positivo, RECA (figura 16c). Esto se condice con lo observado en el campo claro para estos dos patrones de fluorescencia donde se observan estas estructuras al interior de la célula (Figura 16d y 16f). La proteína GFP debido a su pequeño tamaño (251 aa) es destinada principalmente al citoplasma y núcleo celular, lo cual fue observado en muestras del tejido transformado con 35SCaMV::GFP (Figura 16b). Este resultado concuerda con el campo claro donde se puede observar claramente el contorno celular, dado por la membrana y la pared celular (Figura 16e).

Para iniciar la caracterización funcional del gen *Dczds1* (y de su respectiva proteína DcZDS1) evaluamos su localización sub-celular. Las enzimas carotenogénicas portan un péptido señal en el extremo amino terminal lo que las destina a plastidios (cloroplastos ó cromoplastos) de las células vegetales, organelo donde son sintetizados los carotenoides<sup>5,50,71</sup>. Es por esto que para corroborar la localización sub-celular de la proteína DcZDS1 se realizó experimentos de expresión transitoria del gen *Dczds1* en hojas de tabaco para posteriormente mediante microscopía de fluorescencia conocer la localización de esta proteína.



**Figura 16. Localización subcelular de la proteína DcZDS1.** a) Fluorescencia de células epidermales de tabaco expresando DcZDS1-GFP. b) Control Negativo: Fluorescencia de células epidermales de tabaco expresando GFP soluble. c) Control Positivo: Fluorescencia de las células epidermales de tabaco expresando RECA-GFP. d) Campo claro donde se observan células epidermales de tabaco transformadas con la construcción DcZDS1-GFP. e) Control Negativo: Se observan en el campo claro células epidermales de tabaco transformadas con la construcción 35SCaMV::GFP. f) Control Positivo: Se observa en el campo claro células epidermales de tabaco transformadas con la construcción 35SCaMV::recA-YFP. Las flechas blancas indican fluorescencia plastidial. Y los plastidios en el campo claro de las células observadas.

La *Nicotiana tabacum* (tabaco) es una planta modelo por excelencia en el estudio de genes en el área vegetal. Construcciones de fusión de FP dirigidos a diversos orgánulos como aparato de Golgi, peroxisomas, plastidios, retículo endoplásmico, etc son inyectados en la hoja de plantas de tabaco, lo que resulta en la expresión transitoria de la proteína de fusión. El cultivo de tejido de la región transformada transitoriamente permite la generación de plantas que expresan de manera estable el constructo. La expresión transiente de FP en células epidérmicas de tabaco es

un proceso relativamente rápido que requiere de 2-4 días a partir de la infiltración. Para la generación de plantas transgénicas estables lleva de 2 a 4 meses utilizando un cultivo de tejidos<sup>77</sup>. Nosotros utilizamos esta estrategia para estudiar la naturaleza dinámica y la interacción entre los plastidios de la proteína ZDS1.

La expresión transitoria en células epidérmicas de tabaco ha dado resultados con una alta tasa de transformación frente a la infiltración en células epidérmicas de *Arabidopsis* o por biolística de células en cultivo. La expresión transitoria es una herramienta valiosa para prueba de nuevas construcciones pero una desventaja potencial es la sobreexpresión y saturación pueden alterar la distribución subcelular o el tráfico de cualquier vía dada. El tabaco permite una alta eficacia de la expresión transitoria de construcciones para el estudio de las interacciones proteína-proteína<sup>77</sup>.

Estos resultados son el primer indicio de que la proteína DcZDS1 efectivamente se encuentra localizada en los plastidios de las células de tabaco, compartimiento donde se lleva a cabo la biosíntesis de carotenoides y donde se ha reportado previamente que las enzimas carotenogénicas cumplen su función.

En la mayoría de las especies de plantas, ZDS está codificada por un único gen<sup>71</sup> y las proteínas se localizan tanto en la membrana de envoltura y estroma de los cloroplastos<sup>88,87,3</sup>. Anteriormente, se ha establecido que las plantas desaturadas, PDS y ZDS son enzimas asociadas a la membrana que forman parte de un complejo multienzimático<sup>5</sup>.

Con esta aproximación experimental logramos obtener una localización plastidial de DcZDS1, lo cual aporta evidencias de su funcionalidad en zanahoria. Se ha identificado que todas las proteínas dedicadas a la biosíntesis de licopeno se encuentran en los cromoplastos<sup>88</sup>, esto se correlacionó con lo encontrado, donde la fluorescencia observada en este experimento indica la localización sub-celular a cloroplastos presentada por parte de la proteína DcZDS1 (Figura 16). Debido a que ésta proteína se encuentra involucrada en la síntesis de licopeno, un carotenoide involucrado en procesos de fotosíntesis, entre otros<sup>5</sup> es de vital

importancia para la viabilidad de la planta que se encuentre en el compartimento celular correcto para cumplir su función.

## 2. Transformación y obtención de las plantas *Arabidopsis thaliana spc1-1* que portan el gen *zds1* de *Daucus carota*

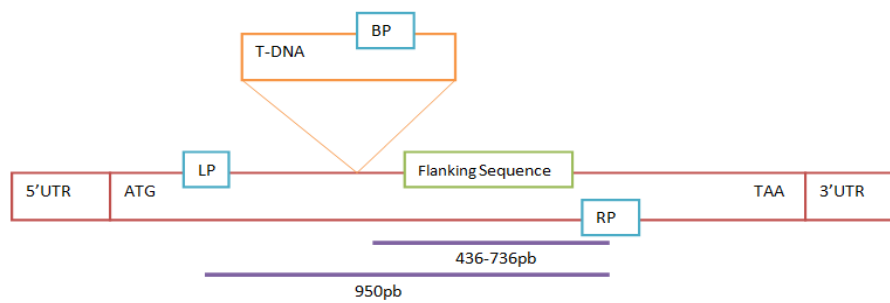
Se utilizó *Arabidopsis thaliana spc1-1*, una mutante heterocigota en el gen *Spc1* (*Spontaneous Cell Death1*) que codifica para *zds* de *A.thaliana*, para expresar el gen de interés. *Spc1-1* es una planta mutante viable que crece normalmente bajo condiciones controladas y produce semillas viable al contrario de la homocigota *spc1-2*, la cual es letal<sup>71</sup>.

### 2.1 Análisis molecular para determinar la mutación en *A. thaliana spc1-1*

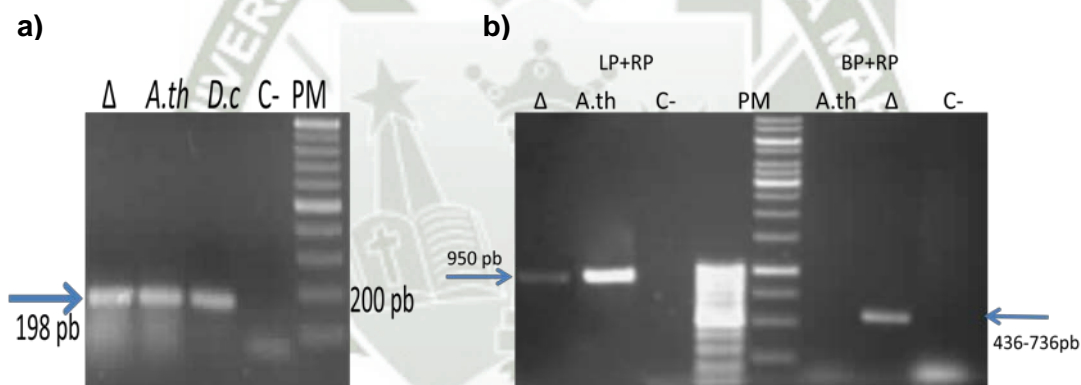
Las plantas de *A. thaliana spc1-1* contienen en su genoma una inserción T-DNA (Figura 17) en el alelo recesivo del gen *Spc1*<sup>71</sup>, una secuencia conocida (434pb) flanquea la inserción (flanking sequence).. Los partidores forward (LP y BP) y reverse (RP) pueden amplificar fragmentos para determinar si la planta contiene la mutación, si es homocigota o heterocigota, o si es silvestre de acuerdo al esquema de la figura 17. Los partidores LP y RP hibridan en el gen *spc1* o *zds* y el RP hibrida en el T-DNA.

Se realizó extracción de DNA genómico a partir de una hoja de *A. thaliana spc1-1* de 40 días de edad y se verificó la inserción que otorga la mutación heterocigota en el gen para *Spc1* de *A. thaliana*.

Se observó que la planta mutante ( $\Delta$ ) amplifica para ambas parejas de partidores confirmando que se trata de una mutación heterocigota en el gen *Spc1* porque con BP+RP presenta un fragmento de 436 a 736pb que abarca parte de la inserción T-DNA y una parte del gen; y con LP+RP presentó un fragmento de 950pb que forma parte solo del gen sin la inserción. Si la planta fuera mutante homocigota solo presentaría un fragmento con la primera pareja de partidores. La planta *A. thaliana* Wt (*A.th*) solo amplificó para la pareja LP-RP confirmando que son específicos para el gen *Spc1* sin mutación (Figura 18).



**Figura 17. Caracterización de la inserción del T-DNA en alelo recesivo *Spc1* proveniente de la colección Salk T-DNA.** El gen *Spc1* está representada por las cajas rojo oscuro desde ATG hasta TAA, la inserción T-DNA por la caja naranja, la caja verde es una secuencia conocida y los partidores utilizados para verificar la mutación, por las cajas celestes: LP, left primer; RP: right primer; BP: border primer (LB3.1). Las líneas moradas representa la cantidad de pares de bases según la pareja de partidores utilizados.



**Figura 18. Análisis molecular para la mutación en *Spc1* en la mutante de *A. thaliana spc1-1*.** a) Se amplificó un fragmento de 198 pb de la subunidad ribosomal 18S como control a partir de DNA genómico. b) Se amplificó un fragmento del gen *Spc1* usando partidores LP-RP y con partidores BP-RP a partir de DNA genómico de las plantas *A.thaliana spc1-1* ( $\Delta$ ), *A.thaliana* Wt Col 0 (*A.th*) y *Daucus carota* (*D.c*). Para el control negativo (C-) se utilizó agua como molde. Las flechas indican los tamaños de 950pb (LP+RP) y 436-736pb (BP+RP). Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con Bret. PM: Estándar de peso molecular de 100pb y 1 Kb respectivamente.

La inserción del T-DNA debe estar ubicado a una distancia de 0pb a 300pb (<http://signal.salk.edu>) de la secuencia flanqueante (434pb), por ello se señala

que el fragmento que confirma la mutación debe ser de 436pb a 736pb. En nuestra mutante; se observó que el fragmento amplificado es de 600pb aproximadamente, lo cual permite deducir que la distancia entre la inserción y el flanqueado puede ser de 200pb aproximadamente.

Los carotenoides son una clase de compuestos que se sintetizan en el plastidio, y tienen funciones en los procesos fisiológicos, como pigmentos accesorios en la fotosíntesis, intermediarios redox de PS II y antioxidantes también son precursores del ABA. Por lo tanto, se espera que la alteración de la biosíntesis de carotenoides tenga un amplio espectro de efectos sobre el crecimiento y desarrollo de la planta. En particular, la planta mutante *spc1-1* causa la acumulación de un mayor nivel de 15-*cis*-fitoeno y  $\zeta$ -caroteno, el sustrato directo de ZDS, ello indica que *spc1* es un *zds* funcional, y que las mutaciones en *spc1* pueden causar deterioro de la biosíntesis de carotenoides.

## 2.2 Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana spc1-1* con el vector pGWB2/z1A.

Verificada la mutación heterocigota en *SpC1* se continuó con la transformación de las plantas con el gen *zds1* de *D. carota*. Para ello las plantas de *Arabidopsis thaliana spc1-1* se cultivaron en medio hidropónico y se utilizó el método del Floral dip para la transformación. Con esta técnica se logró transformar las semillas al colocar las inflorescencias de *Arabidopsis* en contacto con *Agrobacterium* que portaba el vector pGWB2/Z1A (Generada por Carlos Flores, 2010; Figura 19). Esta construcción posee el promotor constitutivo y fuerte 35S CaMV, y contiene toda la región traducible del gen *zds1* desde el codón de término y la región 3'NTR. Las plantas fueron cultivadas hasta la recolección de semillas proceso que tardó 2 meses desde la transformación (Figura 19).

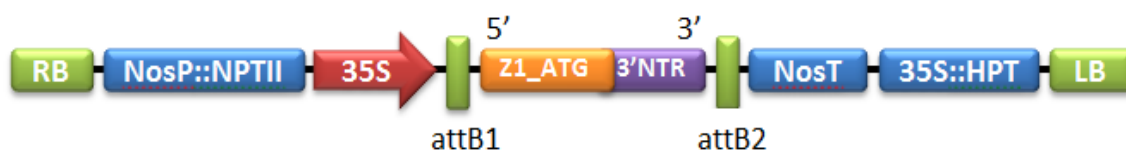


Figura 19. Esquema de la construcción pGWB2/z1A.

Para la transformación se utilizaron cinco plantas de las cuales sobrevivieron tres para la obtención de semillas (Figura 20).

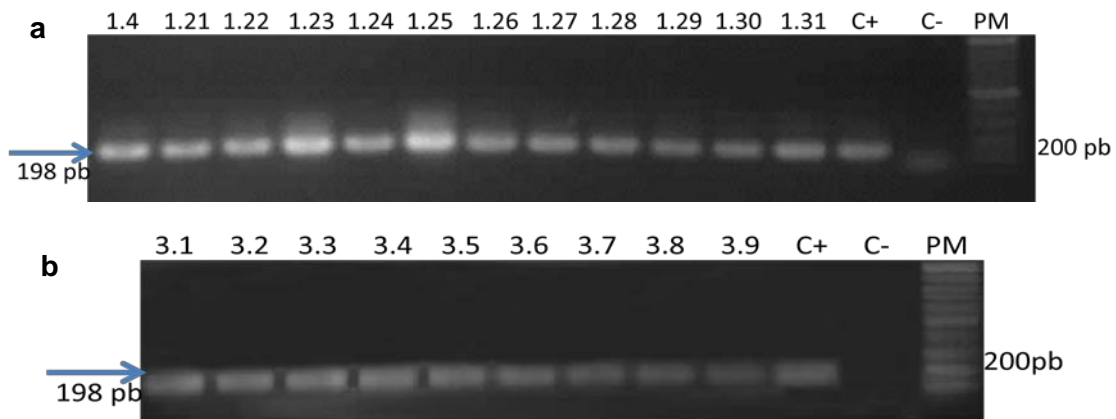
Las semillas recolectadas (T0) de las tres plantas (p1, p2 y p3) y mutantes *spc1-1* fueron esterilizadas y sembradas en medio MS con kanamicina para la selección de las transformantes. Semillas de p1 y p3 presentaron segregación 3:1 de la resistencia a kanamicina, mientras que semillas de las plantas de p2 no germinaron. A las 3 semanas, las plántulas fueron trasplantadas a pequeños maceteros con tierra estéril (vermiculita: turba, 3:2 (p/p)). Se obtuvieron 31 y 9 plantas T0 transformantes de p1 y p3 respectivamente;. De las líneas T0 también se cosecharon semillas (T1) que fueron utilizadas para el análisis de expresión de *zds1* de *D. carota*.



**Figura 20. Cultivo de *Arabidopsis thaliana spc1-1*.** a) *A. thaliana spc1-1* a 30 días. b) *A. thaliana spc1-1* a 42 días antes de la transformación. c) *A. thaliana spc1-1* posterior a la transformación para la cosecha de semillas.

### 2.3 Análisis molecular para determinar la transgénesis de las líneas de *Arabidopsis thaliana spc1-1* que portan el gen *zds1* de *Daucus carota*.

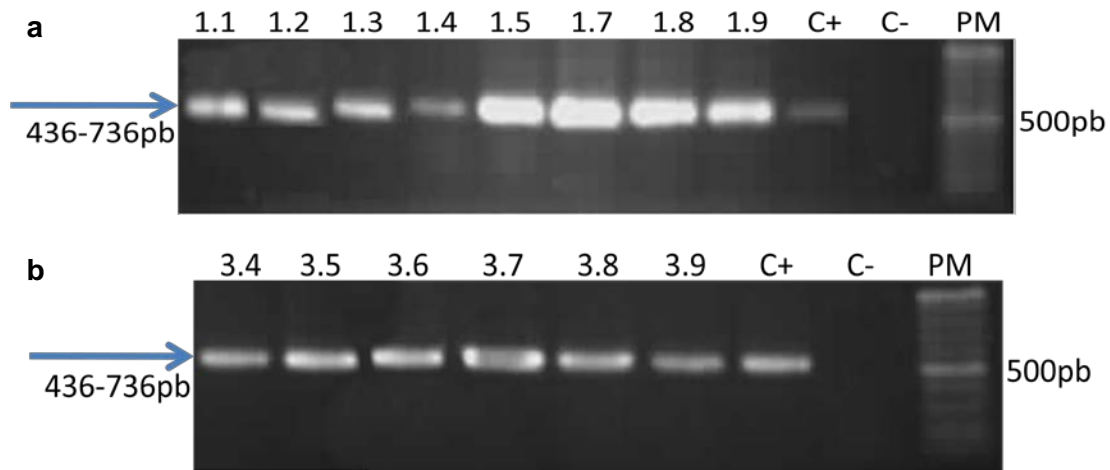
Se realizó extracción de DNA genómico a partir de una hoja de las líneas transformadas (40días) y se corroboró la calidad mediante la amplificación por PCR de un fragmento del gen de la subunidad ribosomal 18S utilizando partidores específicos a todas las líneas. Se verificó que se tenía DNA genómico de 28 líneas de p1 y nueve de p3 (Figura 21).



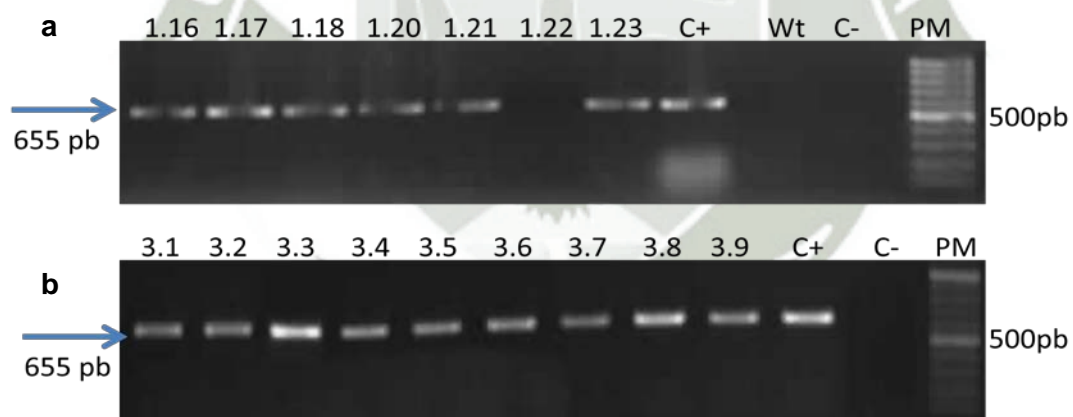
**Figura 21. Amplificación del gen 18S de las líneas de *A. thaliana* obtenidas.** Se amplificó un fragmento de 198 pb de la subunidad ribosomal 18S como control a partir de DNA genómico de las líneas transformadas con el vector pGWB2/Z1A. Como control positivo (C+) se usó como molde DNA de *A. thaliana* corroborado previamente y para control negativo (C-) se utilizó agua como molde (a y b). Las líneas denominadas como 1 o 3 provienen de p1 y p3 respectivamente. Se muestra un gel representativo de las 28 líneas T1 de p1 y p3. Las flechas indican el tamaño 198pb. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con Bret. PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb. PM: Marcador de peso molecular 1kb.

Luego con los partidores BP y RP (Sección II, 10) se verificó que todas las líneas T1 son mutantes heterocigotas (Figura 22).

Luego, se amplificó el gen *nptII*, gen de resistencia a kanamicina que forma parte del T-DNA y del vector pGWB2/Z1A como marcador de selección. En las líneas de *A.thaliana* transformadas se obtuvo la banda esperada de 655 pb en 23 líneas de p1 y nueve de p3 (Figura 23). Como es esperado, este gen no amplificó en el DNA de *A. thaliana* silvestre (Wt) (Figura 23b), lo que indica que los partidores son específicos para el gen *nptII*.



**Figura 22. Amplificación del fragmento para mutación en *Spc1* de las líneas de *A. thaliana* obtenidas.** Se amplificó un fragmento entre 436pb y 736pb que contiene parte de la inserción T-DNA y del gen *Spc1* a partir de DNA genómico de las líneas transformadas con el vector pGWB2/Z1A. Como control positivo (C+) se usó como molde DNA de *A. thaliana spc 1-1* corroborado previamente y como control negativo (C-) se utilizó agua como molde. Las líneas denominadas como 1 o 3 provienen de p1 y p3 respectivamente. Las flechas indican el tamaño de 436-736pb (BP+RP). Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con Bret. PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb.



**Figura 23. Amplificación del fragmento *nptII* en las líneas transgénicas de *A. thaliana* para *Dezds1*.** Se amplificó un fragmento de 655 pb del gen *nptII* en las líneas a partir de DNA genómico de las líneas transformadas con el vector pGWB2/Z1A. a) Líneas T1 que provienen de p1 b) Líneas T1 que provienen de p3. Para el control negativo (C-) se utilizó agua como molde y control positivo (C+) del gen *nptII* se utilizó DNA plasmidial (vector pGWB2) como molde. Wt: *A.thaliana* silvestre Col 0. Las flechas indican el tamaño 655pb. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con Bret. PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb. PM: Marcador de peso molecular 1kb.

Como el gen *nptII* no era un marcador de selección eficiente porque está presente en el T-DNA y en el vector pGWB2/z1A, se procedió a verificar si fueron exitosamente transformadas con el gen *zds1* de *D. carota*. A partir de DNA genómico se amplificó un fragmento de 295pb utilizando partidores que reconocen la región 3'NTR del gen (Figura 24).



**Figura 24. Esquema del gen *Dczds1* en la construcción pGWB2/Z1A.** La barra roja indica el fragmento que los partidores deben amplificar en la región 3'NTR.

Este ensayo permitió determinar que 15 líneas de p1 y 9 de p3 contienen el gen *zds1* de *Daucus carota* (Figura 25). Además, como se esperó, este gen no amplificó en el DNA de *A. thaliana* silvestre (Wt) ni en *A. thaliana spc1-1* ( $\Delta$ ) (Figura 25a), lo que indica que los partidores son específicos para el gen *zds1* de *D. carota*.

La *Arabidopsis thaliana* es más comúnmente transformada establemente con floral dip<sup>82</sup>, o utilizando transformación de raíz<sup>83</sup>. Líneas de *Arabidopsis* establemente transformadas ofrecen ventajas en expresión homóloga y la opción de una mayor manipulación genética debido a la gran base de recursos para esta especie. La integración de la construcción en el genoma de la planta es un proceso limitante de la transformación cuya eficiencia depende del protocolo de transformación utilizado y de la especie a transformar<sup>84</sup>, la presencia de las construcciones no implica necesariamente que se encuentren funcionalmente activas, debido a que la expresión de las construcciones en organismos transformados es dependiente del lugar de inserción en el genoma<sup>84,85</sup>.



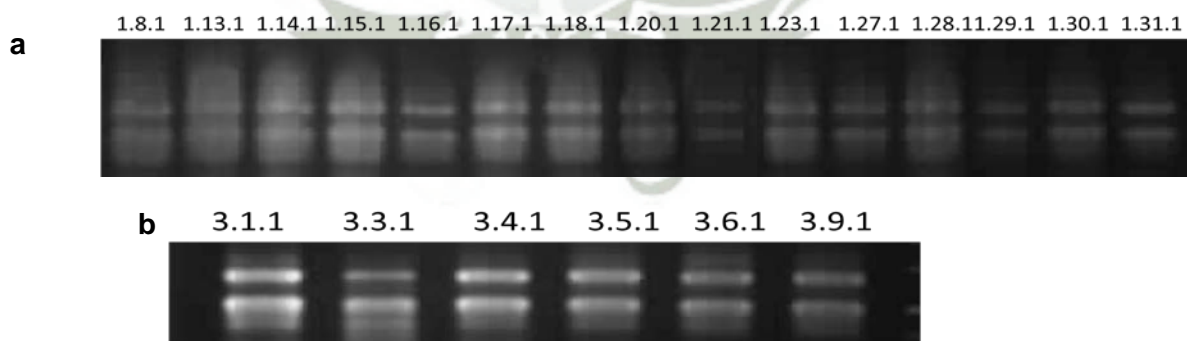
**Figura 25. Amplificación del fragmento de la región 3'UTR de *zds1* de *Daucus carota* de las líneas transgénicas de *A. thaliana*.** Se amplificó un fragmento de 295 pb a partir de DNA genómico de las líneas transformadas con el vector pGWB2/Z1A. Para el control negativo (C-) se utilizó agua como molde. a) Líneas T1 que provienen de p1 b) Líneas T1 que provienen de p3 Para el control positivo (C+) se utilizó DNA genómico de *D. carota* corroborado previamente como molde. Wt: *A. thaliana* silvestre Col 0.  $\Delta$ : *A. thaliana* *spe1-1* (a). Las flechas indican el tamaño 295pb. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con Bret. PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb.PM: Marcador de peso molecular 1kb.

Mediante la transformación con *A. tumefaciens* la inserción de las construcciones en el genoma vegetal ocurre al azar aunque preferentemente en regiones de eucromatina del genoma nuclear. Por esto, aunque la probabilidad sea menor, es posible que la inserción ocurra en una región no activa del genoma, lo que implica que la construcción no sea funcional ya que no se expresaría. Por lo tanto, es posible tener líneas transformadas, pero que no expresen la construcción. Para evitar esto es importante contar con un adecuado sistema de selección de las plantas transformadas, de forma tal que solo se seleccionen las líneas transformadas cuyas construcciones se expresen. La obtención de falsos positivos puede deberse a que la planta se desarrolle donde la concentración del agente de selección está diluida por efecto de otras líneas resistenteso debido a la sensibilidad de la técnica usada para dicho análisis, o quizás por ambos factores. En nuestro caso, el sistema de selección fue eficiente ya que en la mayoría de las líneas que fueron efectivamente transformadas y

analizadas en las cuales se detectó la presencia del gen *nptII* (resistencia a kanamicina) mediante PCR para la construcción empleada en *Arabidopsis thaliana* (Figura 23). Además de la inserción de la construcción al azar en el genoma de la planta, otro factor que influye en la transformación de las plantas es el número de copias en que se inserta el gen en el genoma de la planta. Estos factores podrían contribuir a la aparición de diferencias en las plantas transgénicas obtenidas, teniendo en cuenta que el gen a expresar codifica para una proteína que cataliza la síntesis de licopeno un importante carotenoide involucrado en procesos vitales para la planta, como la foto-protección y fotosíntesis<sup>5</sup>. Estas diferencias fueron observadas en los niveles de carotenoides de las plantas de *Arabidopsis* transformadas con el vector pGWB2/*zds1* en donde las líneas (1.17, 1.20, 1.28, 1.30, 3.1, 3.3 y 3.5) analizadas presentaron un crecimiento igual a una silvestre, 4 semanas, a diferencia de la mutante que se prolongaba hasta 5 semanas.

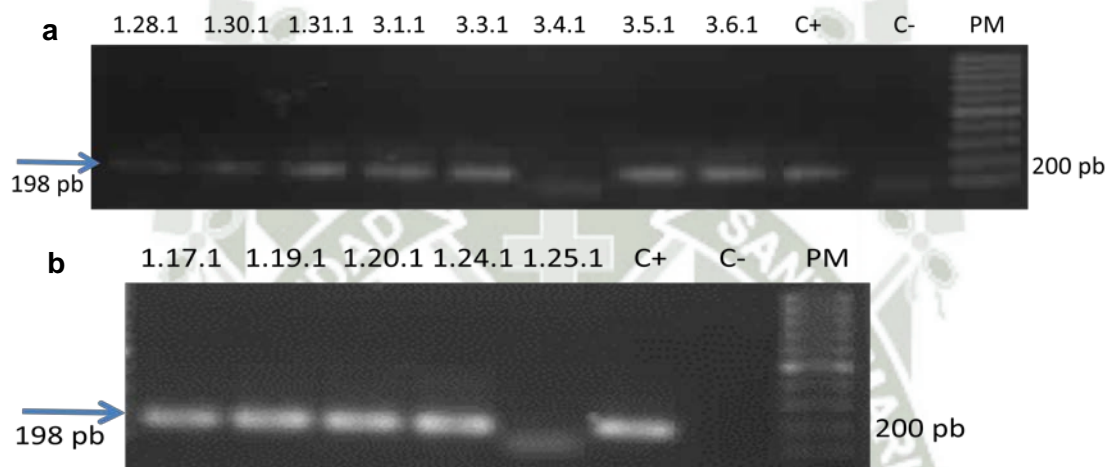
### 3- Análisis de la expresión del transgen en en líneas de *A. thaliana spc1-1* transgénicas para *Dczds1*.

Se determinó la expresión de *zds1* de *D. carota* mediante RT-PCR convencional a partir de líneas positivas para la presencia del transgen (Figura 14). Para ello, se extrajo el ARN total de plantas completas de 21 días de las 15 líneas T1 de p1 y se escogió 6 líneas de p3.. Se obtuvo ARN íntegro de 15 líneas de p1 y 6 de p3 (Figura 26).



**Figura 26. Determinación de la integridad del ARN extraído de las líneas *A. thaliana* transformadas con *Dczds1*.** Gel de agarosa en condiciones donde se observa la integridad del ARN extraído. El patrón de bandeo corresponde a los distintos ARN ribosomales 28S y 18S.

Se seleccionaron muestras de ARN de siete líneas de p1 y cuatro líneas de p3, las que fueron tratadas con DNAsaI con el fin de eliminar posibles remanentes de ADN que pudiesen intervenir con los resultados. El ARN tratado fue utilizado como molde en reacciones de RT usando el partidor antisentido Oligo-AP (Tabla I). Para evaluar la calidad del cDNA generado, se amplificó con éxito para cada muestra un fragmento de 198 pb del gen de expresión constitutiva de la subunidad ribosomal 18S (Figura 27).



De las líneas verificadas para 18S se seleccionaron 7 líneas entre p1 y p3 (1.17, 1.20, 1.28, 1.30, 3.1, 3.3, 3.5), y se realizó la reacción de PCR utilizando partidores específicos para amplificar *zds1* de *D. carota*. En las líneas escogidas, los resultados revelaron la expresión del ARN mensajero de *zds1* de *D. carota* y indicando que el gen insertado se expresa en las líneas obtenidas.



**Figura 28. Amplificación de gen *zds1* de *D. carota* de las líneas transgénicas de *A. thaliana* para *Dczds1*.** Se amplificó la región 3'NTR (295pb) del gen *zds1* de *D. carota* a partir de muestras de cDNA. Como control positivo (C+) se utilizó cDNA de *D. carota* previamente corroborado y como control negativo (C-) se utilizó agua como molde. Wt: *A. thaliana* silvestre Col 0. Δ: *A. thaliana* *spc1-1*. Las flechas indican el tamaño 295pb. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con Bret. PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb. PM: Marcador de peso molecular 1kb.

No se detectó expresión en muestras de *A. thaliana* silvestre (Wt) y mutante (Δ) confirmando la especificidad de los partidores utilizados (Figura 28).

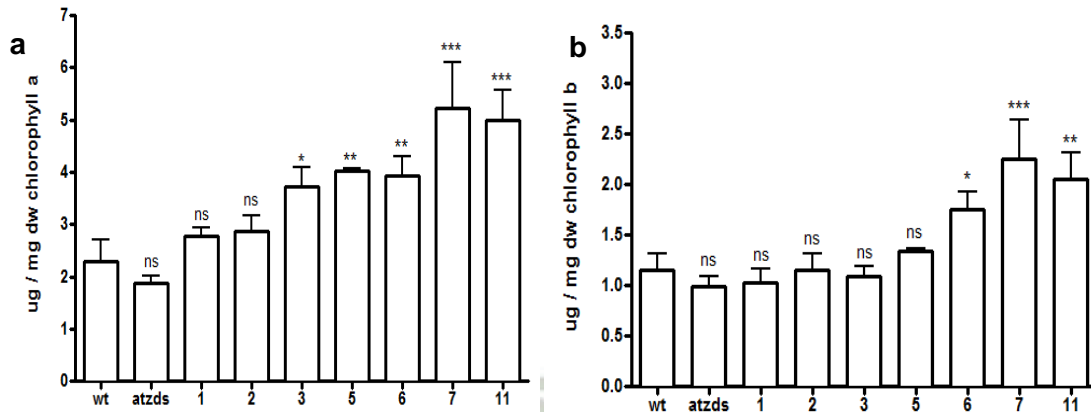
Con estos experimentos se logró comprobar la funcionalidad transcripcional del gen *Dczds1* a partir de la construcción generada en el vector de expresión utilizado pGWB2/z1A.

#### 4. Determinación de la Composición y Concentración de Pigmentos Carotenoides en *A. thaliana spc1-1* transformadas con pGWB2/Z1A

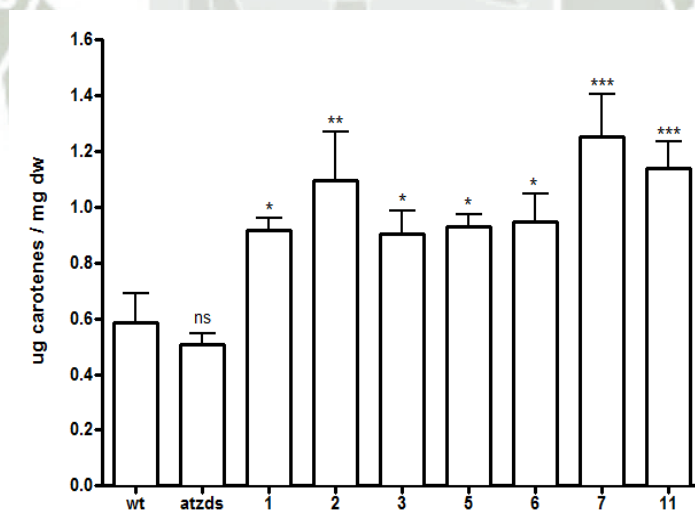
La cuantificación de carotenoides totales fue determinada mediante espectrofotometría y la determinación de la composición de clorofila y de los principales compuestos carotenoides (Luteína y β-caroteno) se llevó a cabo mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC. Se analizó las diferencias en cuanto a composición y cantidad de carotenoides, lo cual reflejaría el efecto de la expresión del gen *zds1* de *D. carota* en *A. thaliana spc1-1*.

De las siete líneas analizadas anteriormente que expresan el transgen de *zds1* de *D. carota* (3.1, 3.3, 3.5, 1,20, 1,30, 1,17, 1,28), se analizaron los pigmentos carotenoides y de clorofilasy se comparó con *A. thaliana* silvestre y *A. thaliana spc1-1*. Se observó que la mayoría de las líneas (3, 5,6, 7 y 11) tuvo un incremento significativo en clorofila *a* (1,6 a 2,3 veces) y algunas (6,7 y 11)

también en la clorofila b (de 1,2 a 2,0 veces) con respecto a las plantas silvestres (Figura 29). En las plantas mutantes se observa una leve disminución de las clorofilas a y b respecto a wt pero que no presentan una diferencia significativa.



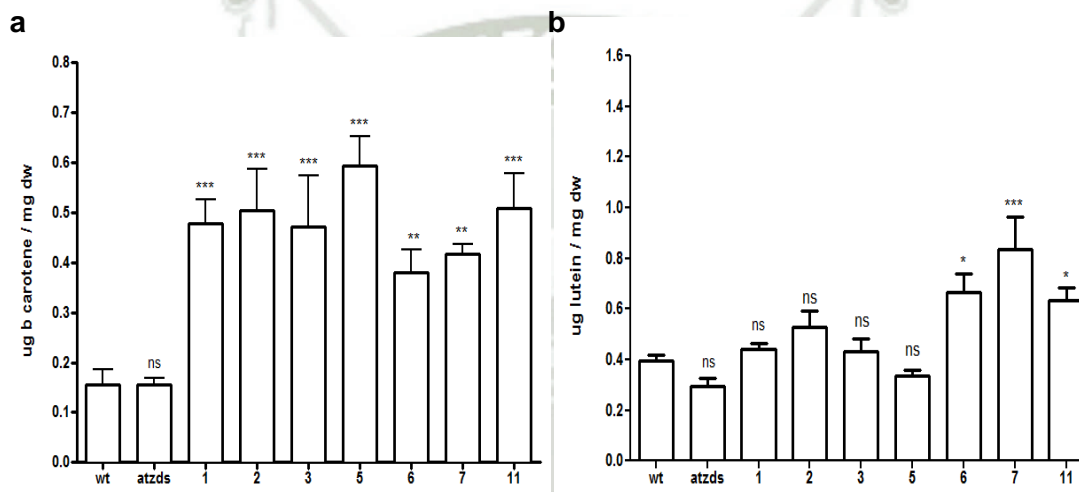
**Figura 29. Cuantificación de Clorofila de las líneas *A. thaliana* *spc1-1* que expresan *Dczds1*.** A) Niveles de Clorofila A. B) Niveles de Clorofila B. wt: planta silvestre, atzds: mutante heterocigota *spc1-1* de *Ath.* .Líneas transgénicas seleccionadas. Las líneas 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 11 respectivamente 3.1, 3.3, 3.5, 1.20, 1.30, 1.17 y 1.28. ns,  $p > 0,05$ , no significativo; \*,  $0,01 < p < 0,05$ ; \*\*,  $0,001 < p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .



**Figura 30. Cuantificación de Carotenoides totales de las líneas *A. thaliana* *spc1-1* que expresan *Dczds1*.** wt: planta silvestre, atzds: mutante heterocigota *spc1-1* de *Ath.* .Líneas transgénicas seleccionadas. Las líneas 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 11 respectivamente 3.1, 3.3, 3.5, 1.20, 1.30, 1.17 y 1.28. ns,  $p > 0,05$ , no significativo; \*,  $0,01 < p < 0,05$ ; \*\*,  $0,001 < p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

La cuantificación de la composición de carotenoides mostraron un incremento de 1,6 a 2,1 veces de los carotenoides totales y 2.1 a 3.3 veces en  $\beta$ -caroteno en todas las líneas transgénicas con respecto a la planta silvestre y un incremento de 1.7 a 2.2 veces en la luteína en las líneas 6, 7 y 11 (Figura 31).

Las plantas mutantes heterocigotas *spc1-1* no transformadas presentan una ligera reducción en los niveles de carotenoides en comparación a la plantas silvestre, aunque no es significativa (Figura 31). Estos resultados apoyan la conclusión de que *zds1* codifica para una enzima plastidial funcional que puede restaurar la deficiencia en la *Arabidopsis spc1-1* heterocigota mutante.



**Figura 31. Cuantificación de Carotenoides de las líneas *A. thaliana spc1-1* que expresan *Dczds1*.** a) Niveles de  $\beta$ -caroteno b) Niveles de luteína wt: planta silvestre, atzds: mutante heterocigota *spc1-1* de *Ath.* Líneas transgénicas seleccionadas. Las líneas 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 11 respectivamente 3.1, 3.3, 3.5, 1.20, 1.30, 1.17 y 1.28. ns,  $p > 0,05$ , no significativo; \*,  $0,01 < p < 0,05$ ; \*\*,  $0,001 < p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

Debido a la alta identidad dentro de las secuencias de aminoácidos de *zds1* y *zds2* de zanahoria (91%), tanto agrupados juntos en un árbol filogenético que incluye desaturasas caroteno de otras plantas. Esto sugiere que uno de los genes pueden haberse originado a partir de la otra en un evento de duplicación reciente.

Se ha reportado que la mayoría de los mutantes en *zds* son letales en homocigosis. *Gentiana lutea* y *Zea mays* mutantes en *zds*, llamadas *non*

*dormant-1* (*nd-1*) sólo son viables bajo luz débil, presentan una acumulación de  $\zeta$ -caroteno y un fenotipo vivíparo<sup>70,89</sup>. La mutante de *A. thaliana* *spc1* presenta un fenotipo de la muerte celular espontánea. La variante alélica *spc1-1* (SALK 033039, utilizado en este estudio) tiene un fenotipo más débil y posee un embrión pigmento defectuoso, blanqueamiento de hojas, un incremento en la muerte celular ROS y de mosaico, mientras que la variante alélica más fuerte, *spc1-2* presenta una completa detención del desarrollo después de la germinación que conduce a un fenotipo letal<sup>71</sup>. Por lo tanto, para determinar el papel de ZDS1

Además, una reciente búsqueda en la base de datos EST reciente realizado con 60 % de raíz y 40 % tejido de hoja para *Daucus carota* subsp. *sativus* de 10 semanas de edad. (B493\_0.5-1kb), con un total de 18 044 ESTs no se encontró EST para *zds2* de zanahoria y sólo uno para *zds1* (clon VCDC382) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample?term=LIBEST027211%5BA11%20Fields%5D&cmd=DetailsSearch>). La ausencia de ESTs para *zds2* está de acuerdo con la imposibilidad de obtener el cDNA completo de este gen bajo nuestros procedimientos experimentales, pero no es suficiente para establecer la ausencia de una transcripción completa para *zds2* y su falta de funcionalidad. Sin embargo, los resultados permiten sugerir que *zds2* principalmente no está involucrado en las etapas iniciales del desarrollo de la zanahoria y en la embriogénesis cuando se compara las plantas transgénicas con niveles reducidos de *zds2* con las plantas dobles silenciados y se propone que *zds1*, cuyo nivel expresión no cambia en plantas silenciadas en *zds2*, compensa la deficiencia.

Las líneas transgénicas generadas a través de la embriogénesis somática, con niveles reducidos de *zds1*, la mayoría de los embriones fueron detenidos en la etapa globular. Este resultado es consistente con la fuerte variante alélica *spc1-2* obtenida en *A. thaliana*, que es letal<sup>71</sup>. Teniendo en cuenta que los carotenoides son precursores de ABA, una hormona esencial para el desarrollo de embriones somáticos de zanahoria y la latencia que se acumula de manera significativa durante el proceso de maduración del embrión<sup>91</sup>, a pesar de la aplicación exógena de esta hormona y la intensidad de luz fue baja no restauró el desarrollo normal.

Las plántulas con niveles reducidos para *zds1* y *zds2* fueron solo cuatro y presentaban morfología anormal, que se correlaciona con el grado de silenciamiento *zds1*, lo que indica que *zds1* tiene un papel importante en la vía de carotenogénica y en el desarrollo de embriones de zanahoria.

Expresión de *zds1* bajo el control del promotor 35S en la variante alélica de *A. thaliana spc1-1* (SALK 033039) induce un aumento significativo en el contenido total de carotenoides,  $\beta$  - caroteno, luteína y en la clorofila a y b respecto al tipo salvaje y *spc1-1* plantas, lo que confirma su funcionalidad y su participación en la biosíntesis de carotenoides en la planta (Figura30).

Para continuar con la caracterización funcional de este gen, se determinó la expresión del gen *Dczds1* en las líneas de *A. thaliana spc1-1* transformadas con el vector pGWB2/*zds1* mediante RT-PCR convencional con partidores específicos de la región 3'NTR para *zds1* para zanahoria, los cuales no hibridan en ningún gen en arabis. De este modo se comprobó que las 7 plantas analizadas (1.17, 1.20, 1.28, 1.30, 3.1, 3.3 y 3.5) expresan el gen *zds1* de *D. carota* (Figura 28). Como se observa en la Figura 30, las líneas analizadas poseen un aumento significativo de los carotinoides totales respecto a las plantas silvestres y mutantes. Este aumento estaría indicando que el gen *zds1* efectivamente codifica para una proteína activa, que participaría en la biosíntesis de carotenoides. Es importante tener en cuenta para el análisis de las plantas transgénicas, que si bien todas las plantas se transformaron con la misma construcción, la inserción de esta es azarosa en el genoma para cada planta. Esto implica que el contexto genético donde se inserta la construcción, en algunos casos determina el nivel de expresión del transgen. Una alternativa para evaluar este tipo de diferencias, es realizar ensayos de qPCR de estas plantas para el transgen y analizar si las diferencias se correlacionan con las diferencias en los pigmentos de estas plantas.

Comenzando el análisis de los pigmentos propiamente tal, resulta interesante notar que existe un aumento en los carotenoides totales de 1,6 a 2,1 veces respecto a una planta silvestre, ello se puede explicar con los niveles de

pigmentos detectados mediante HPLC, como  $\beta$ -caroteno de 2.1 a 3.3 veces en todas las líneas transgénicas con respecto a la planta silvestre y luteína que presentó un incremento de 1.7 a 2.2 veces en la luteína en las líneas 6, 7 y 11 (Figura 31). El análisis estadístico indica que la mayoría de las líneas (3, 5, 6, 7 y 11) tuvo un incremento significativo en clorofila *a* (1,6 a 2,3 veces) y algunas (6, 7 y 11) también en la clorofila *b* (de 1,2 a 2,0 veces) con respecto a las plantas silvestres. Para todos los pigmentos se observa una leve disminución de las plantas mutantes comparada con una silvestre pero no presentan diferencias significativas, lo que se correlaciona con la descripción de *A. thaliana spc1-1* hecha por Dong y colaboradores en 2007.

Estos datos nos lleva a plantear que existe un nivel de expresión mínimo necesario, que genere una variación importante en toda la vía y se traduzca en un aumento y variación en los carotenoides, en todas las líneas analizadas se aprecian diferencias significativas en los carotenoides totales y otros pigmentos.

Estos resultados como la localización plastidial subcelular de ZDS1-GFP y el incremento en la clorofila y el contenido de carotenoides en plantas *spc1-1* de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan ZDS1, confirman la funcionalidad de este gen. Estos resultados, junto con la ausencia de *zds2* y la incapacidad para amplificar el cADN completo de este gen, nos llevan a proponer que la principal actividad desaturasa  $\zeta$ -caroteno en la zanahoria es proporcionada por el gen *zds1*.

## CONCLUSIONES

- Se evaluó la localización sub-celular del gen *Dczds1* que codifica para una enzima DcZDS1 y se encontró que se localiza en los cloroplastos de las células vegetales y se comprobó que el vector y pGWB5/*zds1* es capaz de insertar un gen foráneo en el genoma de *Nicotiana tabacum*.
- Se transformó las plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes con el gen *zds1* de *Daucus carota*.
- Se identificó mediante PCR las plantas mutantes que portan en el *zds1* de *Daucus carota* comprobando que el vector pGWB2/*z1A* es funcional y logra una inserción estable en el genomas de *Arabidopsis thaliana*.
- Se evaluó la expresión del gen *zds1* de *Daucus carota* por RT-PCR convencional y se verificó que es funcional en otras plantas porque las líneas transgénicas de *A. thaliana* mutantes que expresaron el gen presentaron cambios en los niveles de carotenoides totales.
- Se determinó la composición y cuantificación de los carotenoides presentes en plantas mutantes transformadas con *zds1* de *Daucus carota* mediante HPLC y se halló que las plantas complementadas comparadas con una planta silvestre contenían mayores niveles de carotenoides.

## RECOMENDACIONES

- En las plantas mutantes transformadas con el gen *zds1* de *Daucus carota* se pueden medir los niveles relativos de mensajero mediante PCR en tiempo real y compararlos con los niveles de carotenoides.
- Se conoce que los carotenoides son precursores del Ácido Abscísico, entonces se puede evaluar los niveles de esta hormona en las plantas mutantes transformadas con el gen *zds1* de *Daucus carota*.



## BIBLIOGRAFÍA

1. **Walter MH, Strack D (2011)** Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Nat Prod Rep* 28: 663-692.
2. **Rodriguez-Concepcion M, Stange C (2013)** Biosynthesis of carotenoids in carrot: An underground story comes to light. *Arch Biochem Biophys.* 539(2):110-116.
3. **Ruiz-Sola M, Rodríguez-Concepción M (2012)** Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* 10.
4. **Giorio, G., Stigliani, A., 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 Research* 16: 15-28.
5. **Cunningham, F., y Gantt, E. (1998).** Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual rev. Plant Physiology Plant Molecular Biology* 49: 557-583.
6. **Kirk, J., y Tilney-Bassett, R. (1978).** *The Plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*, 2nd edn, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
7. **Howitt CA, Pogson BJ (2006)** Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ* 29: 435-445.
8. **Maass D, Arango J, Wust F, Beyer P, Welsch R (2009)** Carotenoid crystal formation in Arabidopsis and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS One* 4: e6373.
9. **Ampomah-Dwamena, C., McGhie, T., Wibisono, R., Montefiori, M., Hellens, R. P. y Allan, A. C. (2009).** The kiwifruit lycopene beta-cyclase plays a significant role in carotenoid accumulation in fruit. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No. 13, pp. 3765–3779.
10. **Ritz T, Damjanovic A, Schulten K, Zhang JP, Koyama Y (2000)** Efficient light harvesting through carotenoids. *Photosynth Res* 66: 125-144.
11. **Koyama Y, Rondonuwu FS, Fujii R, Watanabe Y (2004)** Light-harvesting function of carotenoids in photo-synthesis: the roles of the newly found 1(1)Bu-state. *Biopolymers* 74: 2-18.

12. **Dall'Osto L, Cazzaniga S, North H, Marion-Poll A, Bassi R (2007)** The Arabidopsis aba4-1 mutant reveals a specific function for neoxanthin in protection against photooxidative stress. *Plant Cell* 19: 1048-1064.
13. **Stange C, Flores C (2012)** Carotenoids and Photosynthesis - Regulation of Carotenoid Biosynthesis by Photoreceptors. Ed. Mohammad Mahadi N. INTECH.
14. **Cazzonelli CI, Pogson BJ (2010)** Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* 15: 266-274  
Cunningham FX, Gantt E (1998) Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 557-583.
15. **North HM, De Almeida A, Boutin JP, Frey A, To A, Botran L, Sotta B, Marion-Poll A (2007)** The Arabidopsis ABA-deficient mutant aba4 demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J* 50: 810-824.
16. **Barrero JM, Rodriguez PL, Quesada V, Alabadi D, Blazquez MA, Boutin JP, Marion-Poll A, Ponce MR, Micol JL (2008)** The ABA1 gene and carotenoid biosynthesis are required for late skotomorphogenic growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ* 31: 227-234.
17. **Galpaz N, Wang Q, Menda N, Zamir D, Hirschberg J (2008)** Abscisic acid deficiency in the tomato mutant high-pigment 3 leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content. *Plant J* 53: 717-730.
18. **Akiyama K, Ogasawara S, Ito S, Hayashi H (2010)** Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol* 51: 1104-1117.
19. **Xie X, Yoneyama K (2010)** The strigolactone story. *Annu Rev Phytopathol* 48: 93-117.
20. **Grotewold E (2006)** The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol* 57: 761-780.
21. **Al-Babili, S. y Beyer, P. 2005.** Golden Rice – five years on the road – five years to go?. *TRENDS in Plant Science* Vol.10 No.12.
22. **Collins AR (1999)** Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 21: 238-246.
23. **Hadley CW, Miller EC, Schwartz SJ, Clinton SK (2002)** Tomatoes, lycopene, and prostate cancer: progress and promise. *Exp Biol Med (Maywood)* 227: 869-880.

24. **Bone RA, Landrum JT (2010).** Dose-dependent response of serum lutein and macular pigment optical density to supplementation with lutein esters. *Arch Biochem Biophys* 504: 50–55.
25. **Misawa N (2011)** Pathway engineering for functional isoprenoids. *Curr Opin Biotechnol* 22: 627-633.
26. **Umeno D, Tobias AV, Arnold FH (2005)** Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 51-78.
27. **Rodriguez-Concepcion M (2010)** Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Arch Biochem Biophys* 504: 118-122.
28. ----
29. **Carretero-Paulet L, Cairo A, Botella-Pavia P, Besumbes O, Campos N, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M (2006)** Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in Arabidopsis plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Mol Biol* 62: 683-695.
30. **Lichtenthaler HK (1999)** The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 47-65.
31. **Bouvier, F., Rahier, A., y Camara, B. (2005).** Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. Institut de Biologie Moleculaire des Plantes du CNRS (UPR2357) et Université Louis Pasteur.
32. **Hirschberg, J. (2001).** Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 210-218.
33. **Fraser PD, Bramley PM (2004)** The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 43: 228-265.
34. **Britton G. (1995).** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 9: 1551-58.
35. **Giuliano G, Al-Babili S, von Lintig J (2003)** Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. *Trends Plant Sci* 8: 145–149.
36. **Auldrige ME, McCarty DR, Klee HJ (2006)** Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol* 9: 315-321.
37. **Nambara, E., y Marion-Poll, A. (2005).** Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Revision in Plant Biology* 56: 165-185.
38. **Van Norman JM, Sieburth LE (2007)** Dissecting the biosynthetic pathway for the bypass1 root-derived signal. *Plant Journal* 49: 619–628.

39. 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.
40. Schofield, A., y Paliyath, G. (2005). Modulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening through phytochrome regulation of phytoene synthase activity. *Plant Physiol Biochem* 43:1052-1060.
41. Pizarro, L., y Stange C. (2009). Light dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia e Invest Agr* 36: 143-162.
42. Rodríguez-Villalón, A., Gas, E., y Rodríguez-Concepción, M. (2009). Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* 60: 424-435.
43. Woitsch, S. and Römer, S. (2003) Expression of xanthophyll biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation. *Plant Physiol.* 132, 1508–1517.
44. Fuentes P (2011) **Identificación y análisis estructural y funcional de los promotores de los genes carotenogénicos *psy2* y *lcyb1* de *Daucus carota*.** . Tesis de Magister para optar al título de Magister en ciencias biológicas Facultad de Ciencias Universidad de Chile.
45. Deruere, J., Romer, S., d'Harlingue, A., Backhaus, R. A., Kuntz, M. y Camara, B. (1994). Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *Plant Cell.* 6: 119–133.
46. Vishnevetsky, M., Ovadis, M., y Vainstein, A. (1999). Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid associated proteins. *Trends in Perspectives.* 4: 232-235.
47. Steinmuller, D., y Tevini, M. (1985). Composition and function of plastoglobuli. *Planta* 163: 201–207.
48. Merzlyak M, Solovchenko A (2002) Photostability of pigments in ripening apple fruit: a possible photoprotective role of carotenoids during plant senescence. *Plant Science* 163.
49. Beisel, K.G., Jahnke, S., Hofmann, D., Köppchen, S., Schurr U. y Matsubara, S. (2010). Continuous turnover of carotenes and chlorophyll a in mature leaves of *Arabidopsis thaliana* revealed by <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> pulse-chase labeling. *Plant Physiol.* 152 (4): 2188–2199.

50. **Cunningham, F. (2002).** Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 74, No. 8, pp. 1409–1417.
51. **Ronen, G., Carmel, G., Zamir, D., y Hirschberg J. (2000).** An alternative pathway in the  $\beta$ -carotene formation in plants chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Prot. Natl. Acad. Sci.*, 97 (20): 11102-11107.
52. **Alquézar, B., Zacarías, L. y Rodrigo, M. J. (2009).** Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene  $\beta$ -cyclase from *Citrus* and its relation to lycopene accumulation. *J Exp Bot* 60: 1783-1797.
53. **Devitt, L., Fanning, K., Dietzgen, R., y Holton T. (2010).** Isolation and functional characterization of a lycopene beta-cyclase gene that controls fruit colour of papaya (*Carica papaya L.*). *Journal Exp Bot* 61:33-39.
54. **Park, H., Kreunen, S.S., Cuttriss, A.J., DellaPenna, D., and Pogson, B.J. (2002).** Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photo-morphogenesis. *Plant Cell* 14,321–332.
55. **Pogson, B., McDonald, K.A., Truong, M., Britton, G., and DellaPenna, D. (1996).** Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. *Plant Cell* 8,1627–1639.
56. **Pogson B.J., Niyogi K.K., Björkman O., and DellaPenna D. (1998)** Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in Arabidopsis mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13324-29.
57. **Niyogi KK (1999)** Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:333–359.
58. **Pogson, B. J. and Rissler, H. M. (2000).** Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis and photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B: Biological Sciences* 355, 1395-1403.
59. **Tian, L., Musetti, V., Kim, J., Magallanes-Lundback, M., and Della-Penna, D. (2004).** The Arabidopsis LUT1 locus encodes a member of the cytochrome p450 family that is required for carotenoid epsilon-ring hydroxylation activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 402-407.

60. **Kim J, DellaPenna D (2006)** Defining the primary route for lutein synthesis in plants: the role of Arabidopsis carotenoid beta-ring hydroxylase CYP97A3. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 3474-3479.
61. **Lange, B.M., and Ghassemian, M. (2003).** Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. Plant Mol. Biol. 51, 925-948.
62. **Lange, B.M., and Ghassemian, M. (2005).** Comprehensive post-genomic data analysis approaches integrating biochemical pathway maps. Phytochem. 66, 413-451.
63. **Vranova, E., Hirsch-Hoffmann, M., and Gruissem, W. (2011).** AtIPD: a curated database of Arabidopsis isoprenoid pathway models and genes for isoprenoid network analysis. Plant Physiol. 156, 1655-1660.
64. **Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008).** Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. The Plant Journal, 54(4), 733-749.
65. **Beyer, P., Weiss, G., and Kleinig, H. (1985).** Solubilization and reconstitution of the membrane-bound carotenogenic enzymes from daffodil chromoplasts. Eur. J. Biochem. 153, 341-346.
66. **Bramley, P.M. (1985).** The *in vitro* biosynthesis of carotenoids. Adv. Lipid Res. 21, 243-279.
67. **Al-Babili, S., V. Lintig, J., Haubruck, H. y Beyer, P. (1996).** A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is HSP70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation. Plant J. 9, 601 -612.
68. **Bonk, M., Hoffmann, B., Von Lintig, J., Schledz, M., Al-Babili, S., Hobeika, E., Kleinig, H., y Beyer, P. (1997).** Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes *in vitro* reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. Eur. J. Biochem. 247: 942-950.
69. **Rodrigo MJ, Marcos JF, Zacarias L (2004)** Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. J Agric Food Chem 52: 6724-6731.
70. **Conti, A., Pancaldi, S., Fambrini, M., Michelotti, V., Bonora, A., Salvini, M., y Pugliesi, C. (2004).** A deficiency at the gene coding for zeta-carotene desaturase characterizes the sunflower *non dormant-1* mutant. *Plant Cell Physiol* 45:445-55.

- 71. Dong H, Deng Y, Mu J, Lu Q, Wang Y, Xu Y, Chu C, Chong K, Lu C, Zuo J. (2007)** The *Arabidopsis Spontaneous Cell Death1* gene, encoding a  $\zeta$ -carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. *Cell Research*. 17:458–470.
- 72. Just, B. J., Santos, C. A., Fonseca, M. E., 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.
- 73. Ampomah-Dwamena C, Dejnopratt S, Lewis D, Sutherland P, Volz RK, Allan AC (2012)** Metabolic and gene expression analysis of apple (*Malus x domestica*) carotenogenesis. *J Exp Bot* 63: 4497-4511.
- 74. Flores, C. (2010)**. Estudio de la función de los genes z-caroteno desaturasa (*zds1 y 2*) de *Daucus carota* (zanahoria). Tesis de Magister para optar al título de Magister en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 75. Fuentes P (2009)** Efecto del desarrollo y la luz en los niveles de RNA mensajero de seis genes de la ruta carotenogénica en *Daucus carota*. Seminario de título para optar al título de Ing. En Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 76. Murashige, T, y Skoog F. (1962)**. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- 77. Sparkes, I.A., Runions, J., Kearns, A., y Hawes, C. (2006)**. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols*. 1 (4): 2019-2025.
- 78. Dere, S., Gunes, T. and R. Sivaci, (1998)**. Spectrophotometric determination of chlorophyll a, b and total carotenoid contents of some algal species using different solvents. *Trends journal of Botany*. 22:13.
- 79. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. P. (2004)**. Carotenoids: handbook. Springer.
- 80. Wegener, G (2010)**. Seminario de título para optar al título de Ing. En Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 81. Salinas, P., Fuentes, D., Vidal, E., Jordana, X., Echeverría, M., & Holuigue, L. (2006)**. An extensive survey of CK2  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in *Arabidopsis*: multiple isoforms exhibit differential subcellular localization. *Plant and Cell Physiology*, 47(9), 1295-1308.

- 82. Clough, S.J., and Bent, A.F.(1998).** Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*16,735–743.
- 83. Valvekens, D., van Montagu, M. & van Lijsebettens, M. (1988)** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5536–5540.
- 84. Gelvin, S. (2000).** *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review in Plant Physiology and Molecular Biology.* 52: 233-256.
- 85. Gelvin S., Kim S. (2007).**Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1769: 410-421.
- 86. Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, Rolland N (2009)** Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Mol Plant* 2: 1154-1180.
- 87. Friso, G., Majeran, W., Huang, M., Sun, Q., & van Wijk, K. J. (2010).** Reconstruction of metabolic pathways, protein expression, and homeostasis machineries across maize bundle sheath and mesophyll chloroplasts: large-scale quantitative proteomics using the first maize genome assembly. *Plant Physiology,* 152(3), 1219-1250.
- 88. Fraser PD, Kiano JW, Truesdale MR, Schuch W, Bramley PM (1999)** Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Mol Biol* 40: 687-698.
- 89. Matthews, P.D., Luo, R., and Wurtzel, E.T. (2003).** Maize phytoene desaturase and zeta-carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *J. Exp. Bot.* 54, 2215-2230.
- 90. Shiota, H., Kamada, H. (2008).** Optical isomers of abscisic acid in carrot somatic embryos have the same effect on induction of dormancy and desiccation tolerance. *Plant biotechnology,* 25(5), 457-463.
- 91. Mas E, Poza J, Ciriza J, Zaragoza P, Osta R, Rodellar C. (2001)** Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista AquaTIC,* n° 15
- 92. Shoog A, Holler FJ, Nieman TA (2001).** *Principios de Análisis Instrumental.* McGraw Hill. 5ta Edición. España

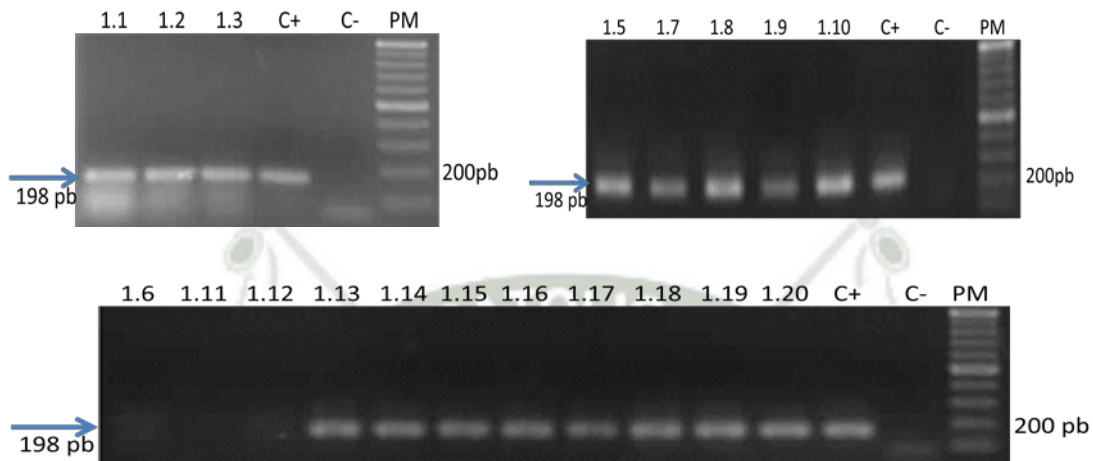
**93. Ma L.(2012).** The role of *Fusarium oxysporum* effector protein Avr2 in resistance and pathogenicity. Faculty of Science. University of Amsterdam.



## ANEXOS

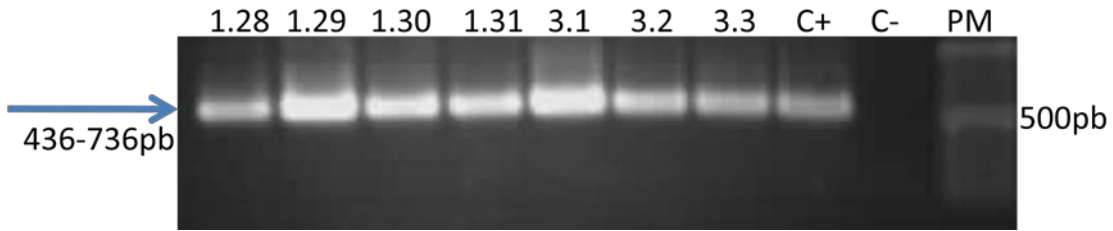
### Anexo 1. Geles de electroforesis

#### Amplificación del gen 18S de las líneas de *A. thaliana* obtenidas

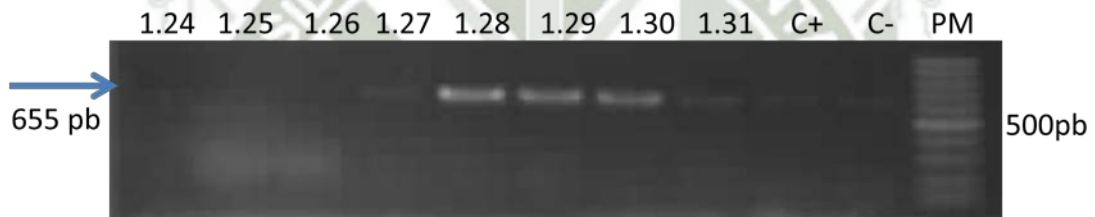
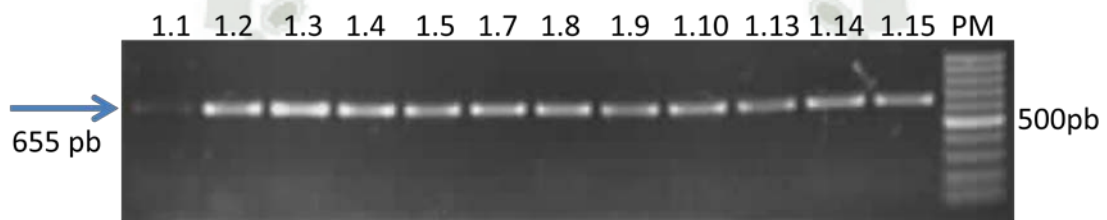


#### Amplificación del fragmento para mutación en *Spc1* de las líneas de *A. thaliana* obtenidas





**Amplificación del fragmento *nptII* en las líneas transgénicas de *A. thaliana* para *Dczds1*.**

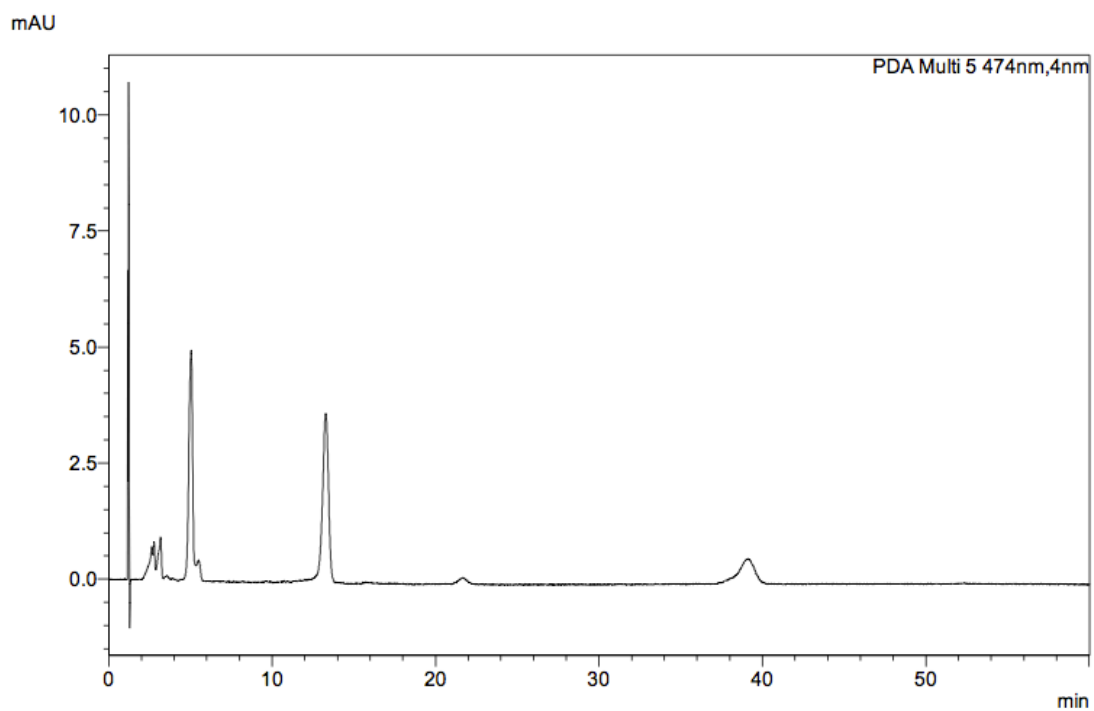


**Amplificación del fragmento de la región 3'UTR de *zds1* de *Daucus carota* de las líneas transgénicas de *A. thaliana***

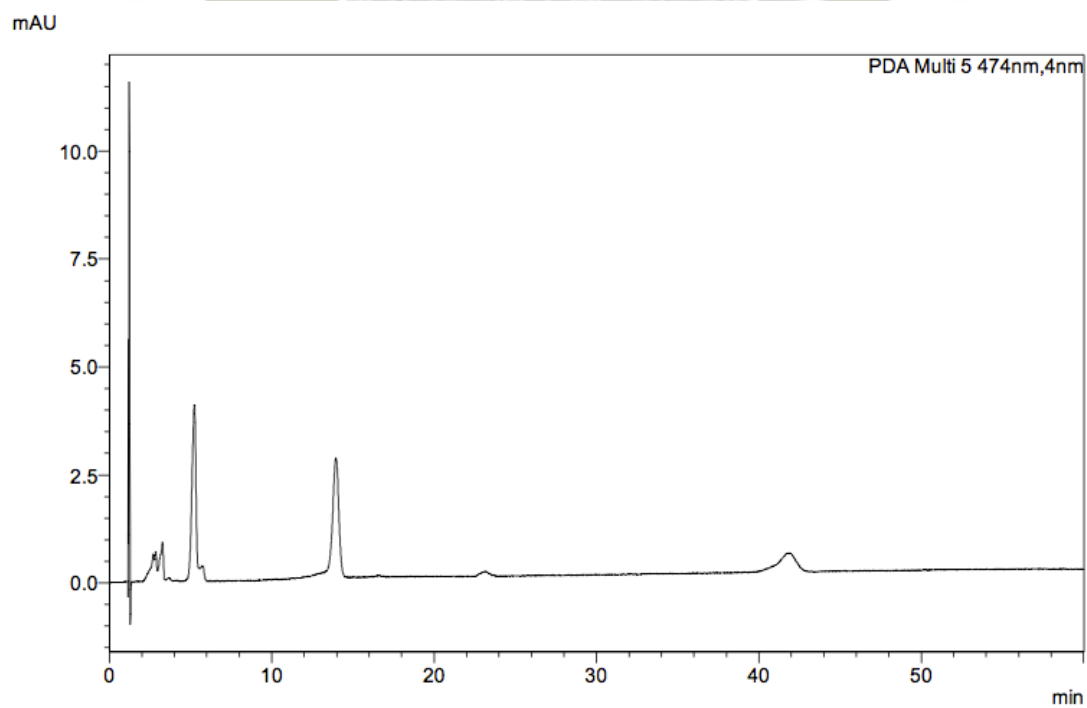


## Anexo 2. Cromatogramas obtenidos mediante HPLC.

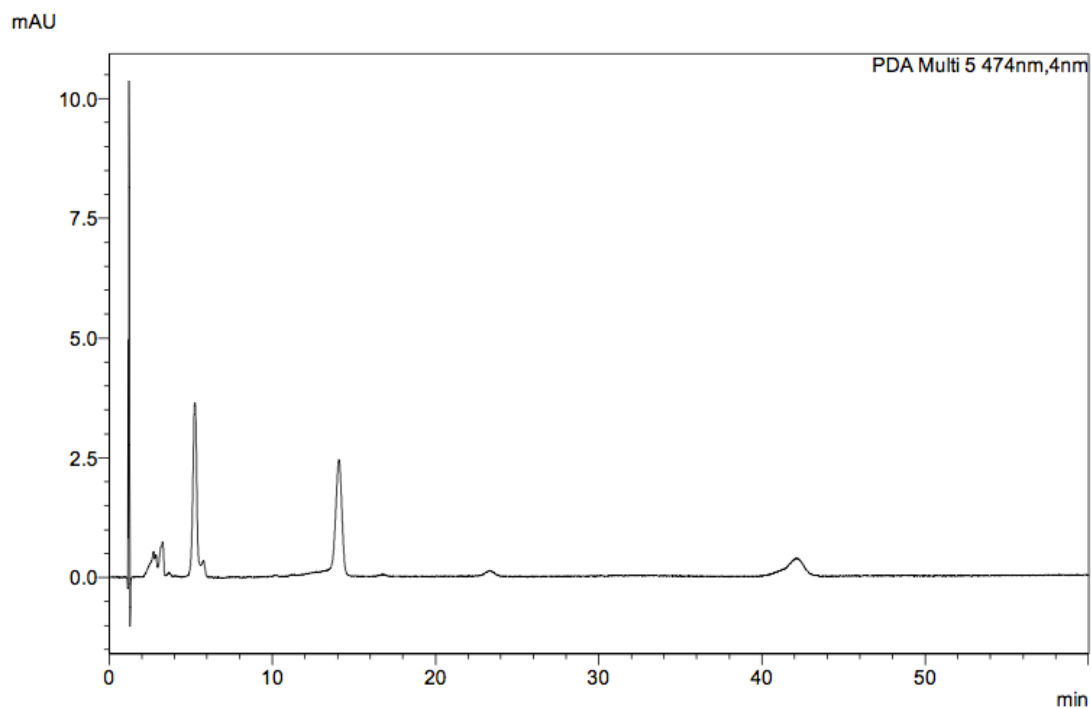
### WtA



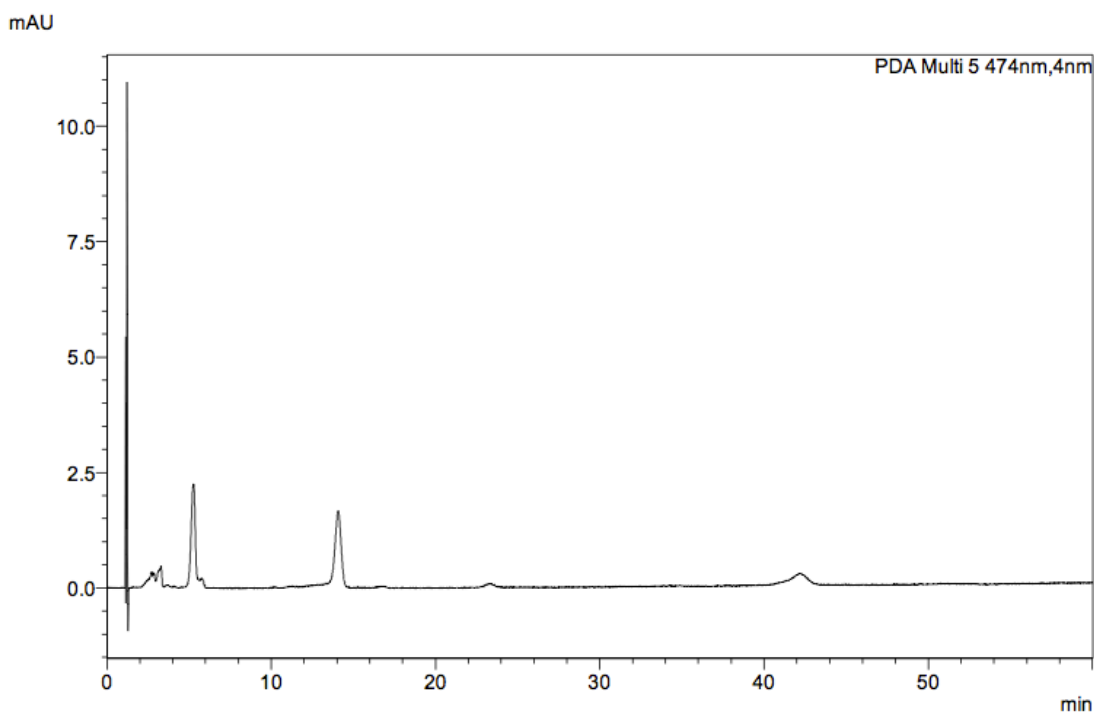
### WtB



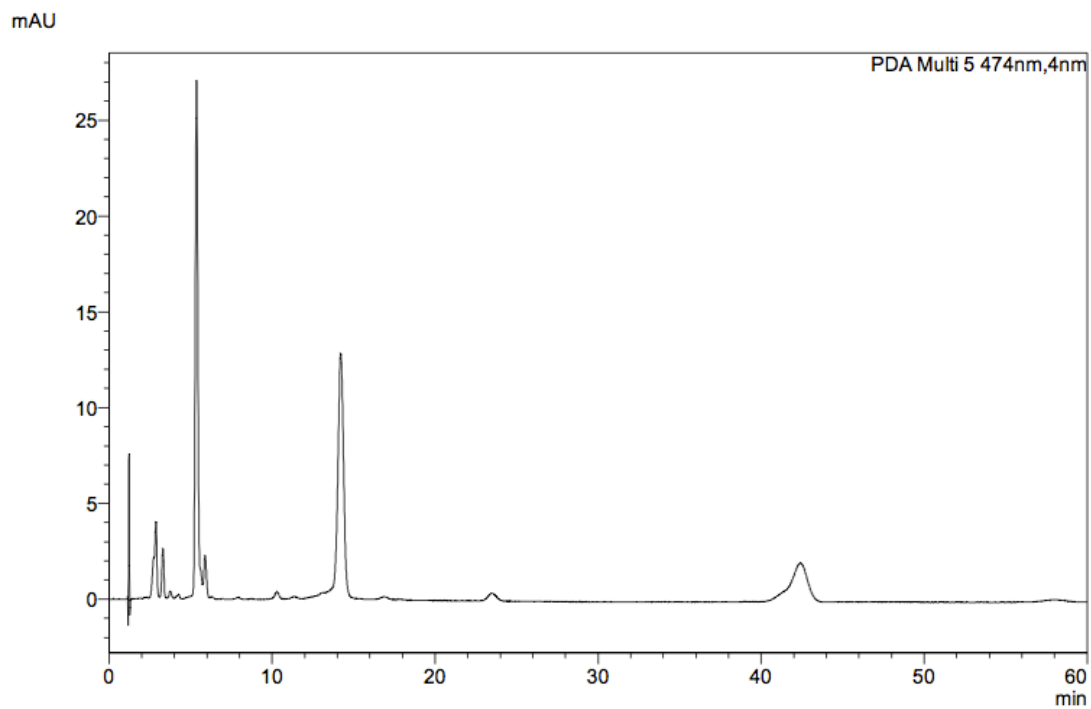
**atzdsA**



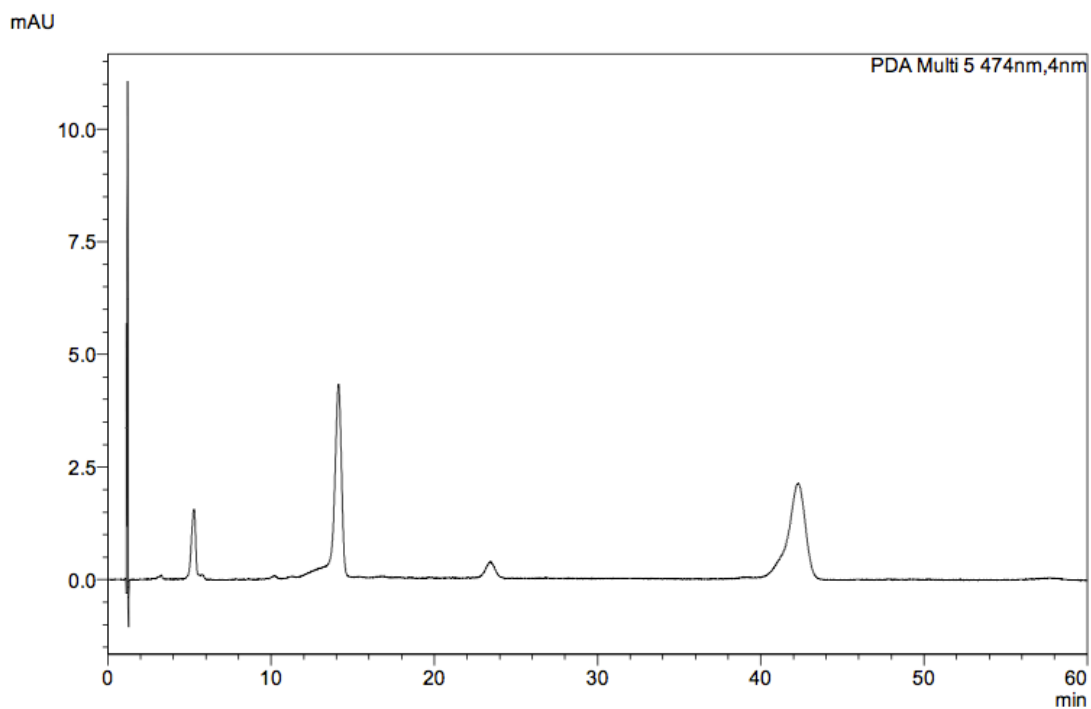
**atzdsB**



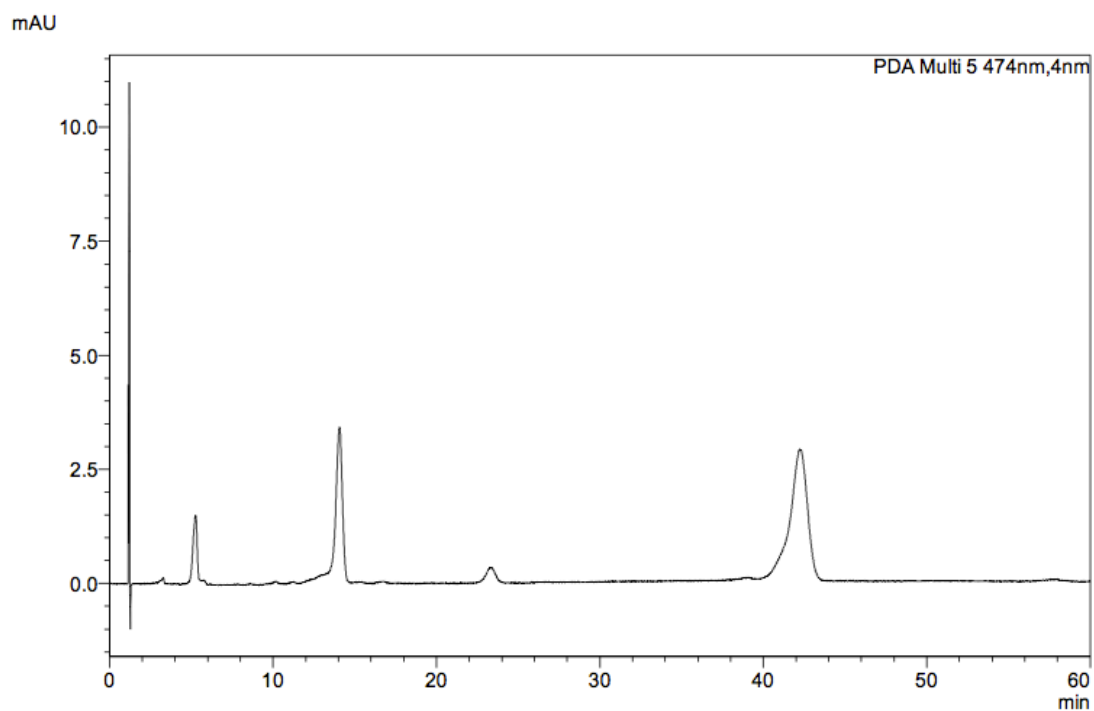
### Planta 1



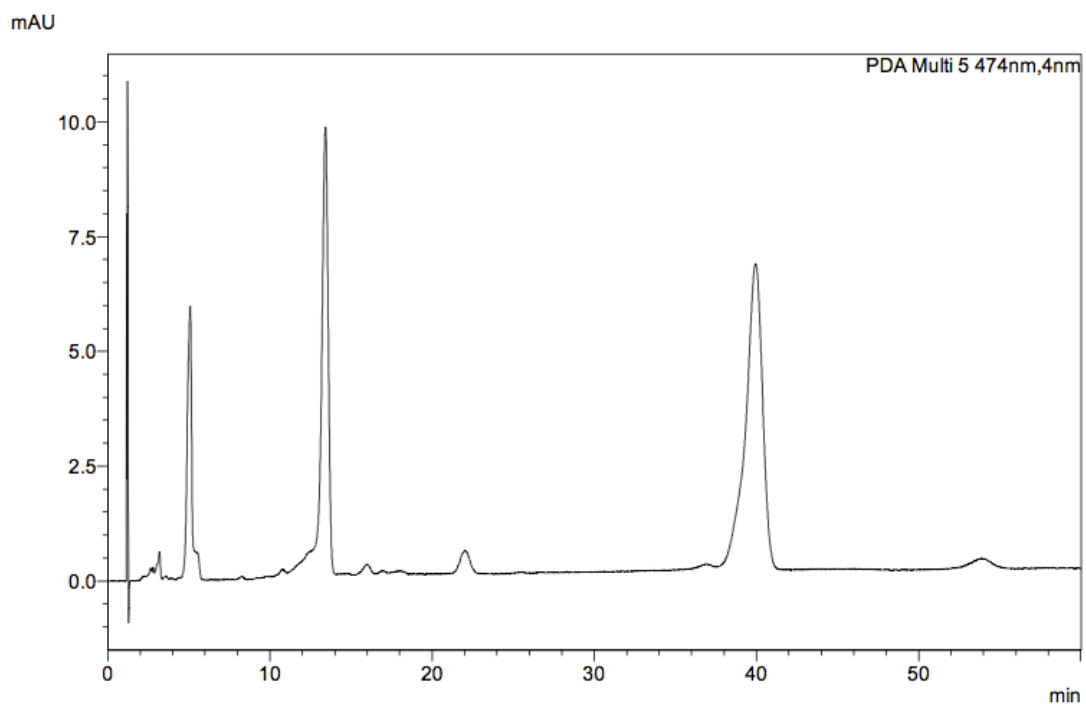
### Planta 2



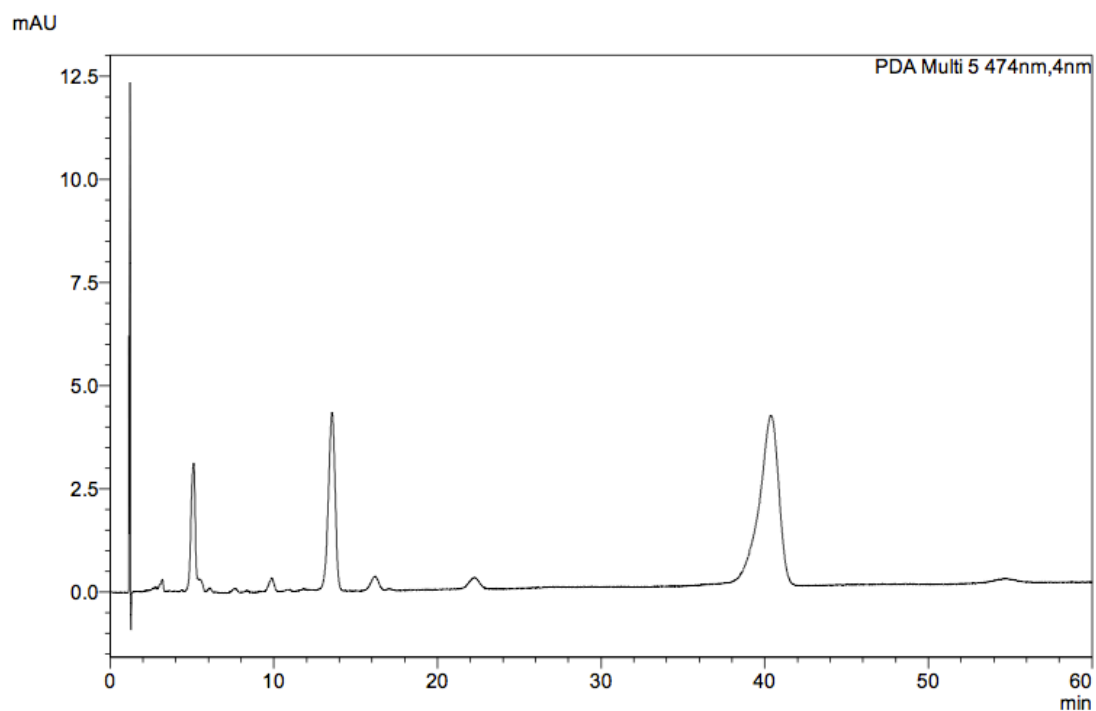
### Planta 3



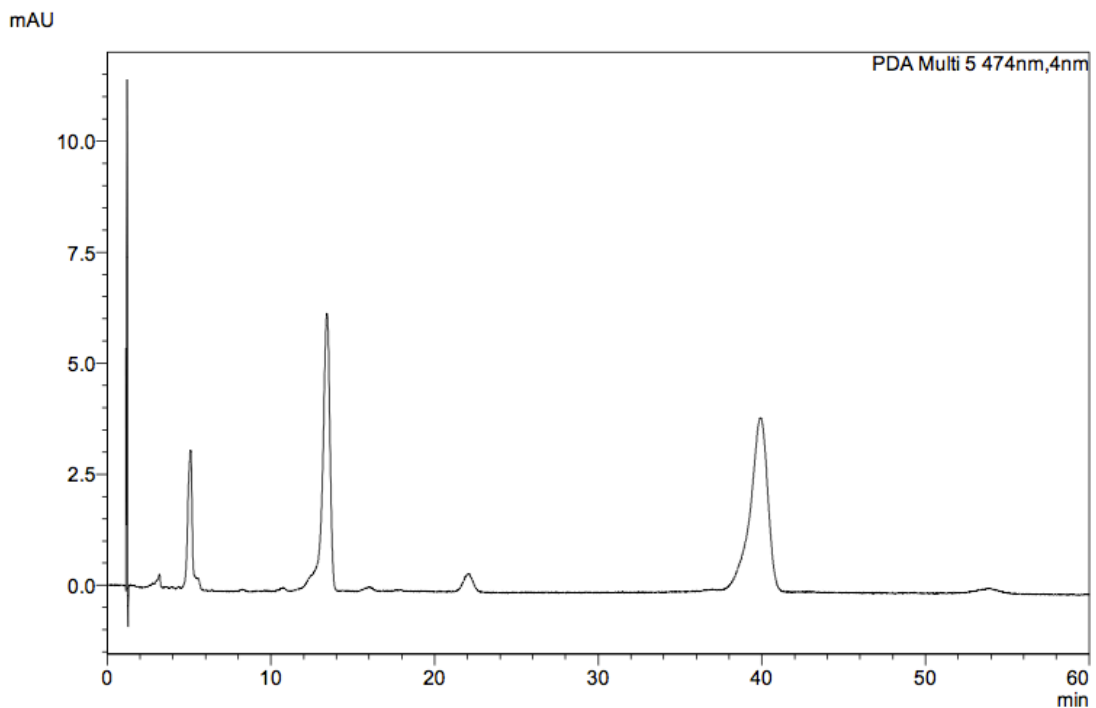
### Planta 5



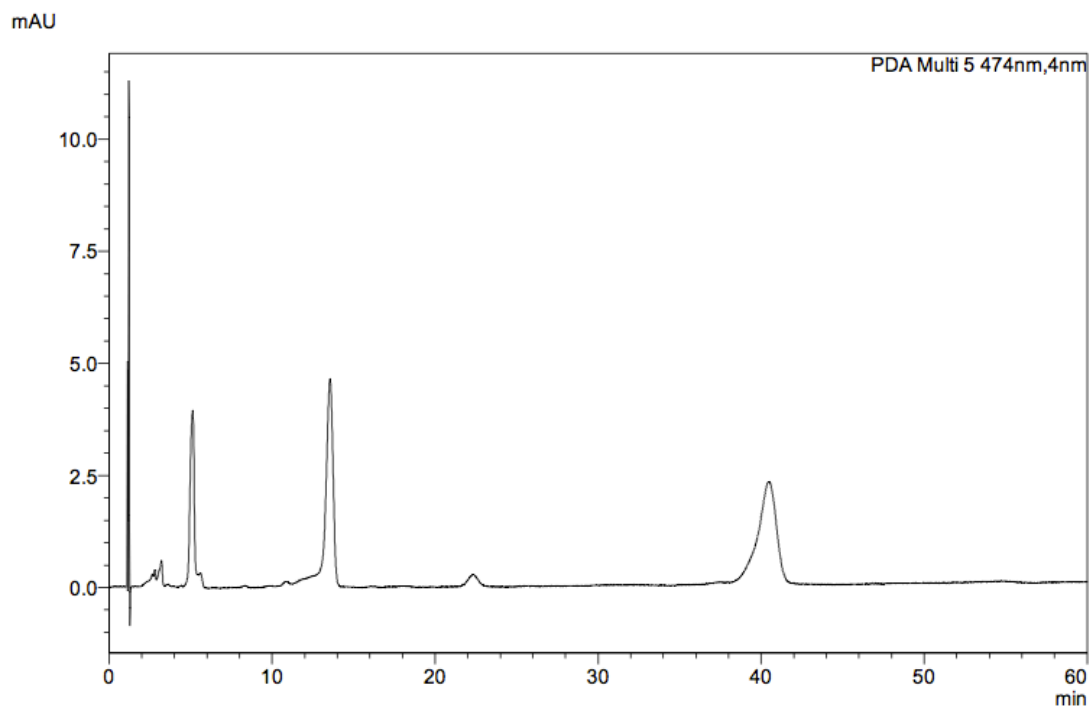
### Planta 6



### Planta 7



## Planta 11



### Anexo 3. Datos obtenidos en la cuantificación de Clorofila.

#### Clorofila A

wt	atzds	1	2	3	5	6	7	11
2,4981	2,5630	2,1543	1,8654	5,2442	4,0110	2,4340	6,1790	3,7270
1,5846	1,5460	3,2024	2,4561	2,2021	3,8940	5,3890	6,0200	4,3920
3,3427	1,5210	2,7680	4,2737	3,7230	3,9350	3,9910	3,4970	6,4560
4,6982	2,0720	2,4910	3,7686	4,2079	4,4000	4,8921	5,9680	5,5130
2,9446	2,0370	3,0657	2,3705	3,9684	3,7690	3,9209	5,9020	4,7120
1,2320	1,5190	2,9462	2,4590	2,9911	3,9810	2,9950	3,9460	5,1310
1,1051								
1,8834								
1,3995								

### Clorofila B

wt	atzds	1	2	3	5	6	7	11
1,7938	0,6895	0,6086	0,5453	1,4919	1,4440	1,1210	2,9220	1,1740
1,0742	0,8183	0,8844	1,0701	0,6835	1,2800	2,4810	2,8070	1,6060
2,1145	1,2357	1,6147	1,8586	1,0880	1,3060	1,6680	1,0260	3,0240
2,0420	1,1038	1,4277	1,3398	1,3226	1,3455	2,1935	1,4641	2,4040
1,3016	0,8780	1,0714	1,4888	1,0229	1,3845	1,7455	2,6934	1,8530
0,3321	1,2126	0,6122	0,6484	0,9193	1,2964	1,3333	2,5983	2,2510
0,3705								
0,8305								
0,5143								

### Anexo 4. Análisis de los datos obtenidos en la cuantificación de Clorofila usando el programa estadístico Prism.

#### Clorofila A

Table Analyzed

datos

One-way analysis of variance

P value

< 0.0001

P value summary

\*\*\*

Are means signif. different? (P < 0.05)

Yes

Number of groups

9

F

10,12

R square

0,6277

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected)

19,45

P value

0,0126

P value summary

\*

Do the variances differ signif. (P < 0.05)

Yes

ANOVA Table

SS

df

MS

Treatment (between columns)

68,96

8

8,620

Residual (within columns)

40,90

48

0,8520

Total

109,9

56

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
wt vs atzds	0,4223	0,8681	No	ns
wt vs 1	-0,4726	0,9714	No	ns
wt vs 2	-0,5669	1,165	No	ns
wt vs 3	-1,424	2,927	Yes	*
wt vs 5	-1,700	3,494	Yes	**
wt vs 6	-1,638	3,368	Yes	**
wt vs 7	-2,953	6,071	Yes	***
wt vs 11	-2,690	5,529	Yes	***

### Clorofila B

Table Analyzed datos

One-way analysis of variance

P value < 0.0001

P value summary \*\*\*

Are means signif. different? (P < 0.05) Yes

Number of groups 9

F 6,279

R square 0,3507

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected) 47,41

P value < 0.0001

P value summary \*\*\*

Do the variances differ signif. (P < 0.05) Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	15,25	8	1,906
Residual (within columns)	28,24	93	0,3036
Total	43,49	101	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
wt vs atzds	0,1626	0,7484	No	ns
wt vs 1	0,1167	0,5684	No	ns
wt vs 2	-0,005367	0,02614	No	ns
wt vs 3	0,06480	0,3156	No	ns
wt vs 5	-0,1907	0,9288	No	ns
wt vs 6	-0,6040	2,942	Yes	*
wt vs 7	-1,099	4,231	Yes	***
wt vs 11	-0,8994	3,841	Yes	**

**Anexo 5. Datos obtenidos en la cuantificación de Carotenoides totales.**

wt	atzds	1	2	3	5	6	7	11
0,6135	0,4253	0,7841	0,6922	1,2446	1,0886	0,5867	1,5286	0,7595
0,2881	0,4428	1,0978	0,9812	0,5648	0,9519	1,2966	1,4592	1,1022
0,8491	0,5931	0,8757	1,6187	0,9047	0,8554	0,9564	0,7678	1,4270
1,2176	0,5415	0,9784	1,3938	0,7345	0,7993	0,8260	1,4349	1,3750
0,7995	0,6405	0,9951	1,1048	1,1749	1,0147	1,1373	1,3515	1,1843
0,3612	0,5883	0,7856	0,7948	0,8025	0,8806	0,8776	0,9885	0,9986
0,3063								
0,4904								
0,3591								

**Anexo 6. Análisis de los datos obtenidos en la cuantificación de Carotenoides totales usando el programa estadístico Prism.**

Table Analyzed datos

One-way analysis of variance

P value < 0.0001

P value summary \*\*\*

Are means signif. different? (P < 0.05) Yes

Number of groups 9

F 6,005

R square 0,5002

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected) 15,59

P value 0,0486

P value summary \*

Do the variances differ signif. (P < 0.05) Yes

ANOVA Table

	SS	df	MS
Treatment (between columns)	3,023	8	0,3778
Residual (within columns)	3,020	48	0,06292
Total	6,043	56	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
wt vs atzds	0,04859	0,3676	No	ns
wt vs 1	-0,3323	2,913	No	*
wt vs 2	-0,5104	3,861	Yes	**
wt vs 3	-0,3172	2,999	No	*
wt vs 5	-0,3446	2,906	No	*
wt vs 6	-0,3596	2,920	No	*
wt vs 7	-0,6679	5,052	Yes	***
wt vs 11	-0,5539	4,190	Yes	***

### Anexo 7. Datos obtenidos en la cuantificación de Carotenoides.

#### $\beta$ Caroteno

wt	atzds	1	2	3	5	6	7	11
0,1664	0,1320	0,4084	0,3606	0,6483	0,6789	0,4596	0,3961	0,3562
0,1101	0,1362	0,5718	0,5111	0,2942	0,6215	0,3777	0,4006	0,5716
0,2303	0,1825	0,4561	0,6431	0,4712	0,4822	0,3011	0,4559	0,6691
0,3303	0,1666	0,4498	0,4260	0,3609	0,5942	0,3854	0,4239	0,4381
0,2169	0,1971	0,5405	0,5777	0,5816	0,5670	0,3353	0,4381	0,5939
0,1188	0,0726	0,4300	0,4944	0,5143	0,6149	0,4276	0,3890	0,4214
0,1151								
0,0925								
0,2153								

#### Luteína

wt	atzds	1	2	3	5	6	7	11
0,4698	0,2055	0,3757	0,3317	0,5963	0,4096	0,5071	1,1325	0,5034
0,3128	0,4299	0,5260	0,4701	0,3206	0,3303	0,7509	1,0586	0,5305
0,4030	0,2438	0,4196	0,7756	0,4335	0,2732	0,6553	0,7118	0,7578
0,3537	0,2991	0,4530	0,4940	0,4631	0,3098	0,5534	0,9350	0,7370
0,4390	0,3163	0,4486	0,6132	0,5139	0,3730	0,8326	0,7093	0,6133
0,3806	0,2740	0,4600	0,4858	0,3339	0,3264	0,7009	0,6035	0,5335



## Luteina

Table Analyzed

Data 5

One-way analysis of variance

P value	< 0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	9
F	8,079
R square	0,4629

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected)	48,43
P value	< 0.0001
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table

	SS	df	MS
Treatment (between columns)	2,256	8	0,2820
Residual (within columns)	2,618	75	0,03490
Total	4,873	83	

Dunnnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
wt vs atzds	0,1022	1,160	No	ns
wt vs 1	-0,04519	0,5131	No	ns
wt vs 2	-0,1306	1,482	No	ns
wt vs 3	-0,03826	0,4344	No	ns
wt vs 5	0,05750	0,6529	No	ns
wt vs 6	-0,2719	3,087	Yes	*
wt vs 7	-0,4391	4,986	Yes	***
wt vs 11	-0,2370	2,876	Yes	*