



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis transcripcional de los genes de la vía
metileritritol fosfato (MEP) usando el reportero luciferasa
en la planta *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CONSTANZA ENRIQUEZ TOLEDO



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. HELENA PORTA DUCOING

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Abreviaturas

AACT: acetil coenzima A C-acetiltransferasa.
ABA: Ácido abscísico.
Acetil CoA: Acetil coenzima A.
ADP: difosfato de adenosina.
ATP: trifosfato de adenosina.
CDP-ME: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol.
CDP-MEP: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato.
CMK: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol cinasa.
CMP: citidina trifosfato
CoA: coenzima A.
Col-0: ecotipo Heynh Columbia
CTAB: del inglés Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide. Bromuro de cetrimonio.
CTP: citidina trifosfato
DMAPP: dimetilalil difosfato.
DNAg: DNA genómico.
DXP: 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato.
DXR: 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa.
DXS: 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa.
GM: Medio de crecimiento MS adicionado con vitaminas Gamborg.
GUS: beta glucuronidasa.
HDS: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato sintasa.
HDR: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato reductasa.
HMBPP: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato.
HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA.
HMGR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa.
HMGS: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa.
IDI: isopentenil difosfato isomerasa.
IPP: isopentenil difosfato.
kDa: kilo daltones
LUC: luciferasa
M: molar.
MCT: 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa.
MDP: difosfato de mevalonato.
MDS: 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa.
MEcPP: metileritritol 2,4-ciclodifosfato.
MEP: 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato.
Mg²⁺: ion magnesio
MK: mevalonato cinasa.
MSO: metionina sulfoximina.
MS: Medio de crecimiento Murashinge-Skoog.
MVA: Ácido mevalónico o mevalonato.
MVAPD: fosfomevalonato descarboxilasa.
MVA 5-P: 5-fosfomevalonato
MVA 5-PP: 5-difosfomevalonato
MVD: 5-difosfomevalonato descarboxilasa.
NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidado)
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido).
pb: pares de bases.
PF: proteínas fluorescentes.
PM: fosfomevalonato.
PMK: fosfomevalonato cinasa.
T-DNA: del inglés *transfer DNA*.
TPP: tiamina difosfato.
X-Gluc: ácido glucurónico 5-bromo-4-cloro-3 indol.
WT: del inglés *wild-type*. Silvestre.
μM: micromolar.

Para Rita con amor

Índice general

Abreviaturas	1
Introducción	3
Antecedentes	4
Los isoprenoides.....	4
La biosíntesis de isoprenoides en la naturaleza.....	5
La vía mevalónica (MVA).....	6
La vía del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP).....	7
Potencial biotecnológico de los isoprenoides.....	9
<i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.....	10
El descubrimiento de la vía MEP y las mutantes afectadas en el desarrollo de los cloroplastos	11
La vía MEP se regula a diferentes niveles	19
Estrategias experimentales para el estudio de la regulación transcripcional usando proteínas reporteras	21
Beta glucuronidasa (GUS).....	21
Fusiones con la proteína verde fluorescente (GFP).....	23
Reportero luciferasa (LUC).....	23
Objetivos	25
Hipótesis	25
Materiales y métodos	26
Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	26
Análisis <i>in silico</i> de las regiones reguladoras.....	26
Clonación con el sistema Gateway®.....	27
Transformación bacteriana en <i>E. coli</i>	28
Extracción de DNA plasmídico a gran escala.....	28
Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	29
Secuenciación.....	29
Reacción de recombinación LR.....	29
Corroboración de clonas por PCR de colonia bacteriana.....	31
Transformación de <i>Agrobacterium</i> C58.....	32
Transformación vegetal con <i>A. tumefaciens</i> C58.....	32
Selección de plantas transgénicas homocigotas.....	33
Reacción de luciferasa y tratamientos.....	35
Resultados	36
Obtención de DNA de plásmido de las construcciones pENTR/D-TOPO-región reguladora de los genes DXR.....	36
Resultados de secuenciación.....	39
Obtención de las construcciones <i>pDXR::LUC</i> , <i>pMCT::LUC</i> , <i>pCMK::LUC</i> , <i>pMDS::LUC</i> , <i>pHDS::LUC</i> y <i>pHDR::LUC</i>	47
Obtención de las líneas de <i>Arabidopsis</i> portadoras de las construcciones generadas.....	49
Selección de líneas transgénicas homocigotas.....	53
Análisis bioluminiscente.....	57
Discusión	62
Conclusión	63
Perspectivas	64
Bibliografía	64

Anexos	72
Anexo 1. Protocolo MIRAPREP. Aislar DNA plasmídico.....	72
Anexo 2. Protocolo extracción CTAB.....	73
Anexo 3. Blast.....	74
Anexo 4. Análisis <i>in silico</i> de los elementos en cis reportados en la región reguladora de los genes de la vía MEP.....	80
Anexo 5. PCR sobre DNA genómico de plantas transgénicas.....	85
Anexo 6. Análisis de la segregación de la resistencia a MSO en semillas de la generación T2 de líneas transgénicas.....	93
Anexo 7. Determinación de líneas transgénicas homocigotas y heterocigotas en semillas de la generación T3 por la resistencia a MSO.....	97

Índice de figuras

Figura 1. Estructura del Isopentenil bifosfato (IPP) y del dimetilalil bifosfato (DMAPP) precursores universales de la biosíntesis de isoprenoides.....	5
Figura 2. Distribución de la síntesis de isoprenoides en distintos organismos.....	6
Figura 3. Vía mevalónica	7
Figura 4. Pasos enzimáticos de la vía MEP.....	9
Figura 5. Formación del metabolito DXP.....	12
Figura 6. El segundo paso de la vía es catalizado por la enzima DXR también llamada IspC.....	13
Figura 7. El tercer paso de la vía es catalizado por la enzima MCT o también llamada IspD.....	15
Figura 8. El cuarto paso de la vía es catalizado por la enzima CMK o también llamada IspE.....	16
Figura 9. El quinto paso de la vía es catalizado por la enzima MDS también llamada IspF.....	17
Figura 10. El sexto paso de la vía es catalizado por la enzima HDS también llamada IspG.....	18
Figura 11. El séptimo paso de la vía es catalizado por la enzima HDR también llamada IspH.....	19
Figura 12. Esquema de la función del gen reportero de la luciferasa. La emisión de luz o bioluminiscencia representa la expresión de la proteína que representa la actividad del promotor.....	24
Figura 13. Mapa del vector de entrada pENTR/D-TOPO utilizado en este trabajo.....	28
Figura 14. Esquema del vector destino pBGWL7 utilizado en este trabajo.....	30
Figura 15. Esquema de los principales componentes presentes en la recombinación LR del sistema Gateway.....	31
Figura 16. Esquema del proceso de transformación y generación de líneas transgénicas.....	34
Figura 17. Confirmación de la presencia de pENTR <i>pDXR</i> y pENTR <i>pMDS</i> en las colonias de <i>E. coli</i> DH5 α	37
Figura 18. Confirmación de la presencia de pENTR <i>pMCT</i> y pENTR <i>pCMK</i> , en las colonias de <i>E. coli</i> DH5 α	38
Figura 19. Confirmación de la presencia de pENTR <i>pHDS</i> y pENT <i>pHDR</i> , en las colonias de <i>E. coli</i> DH5 α	39
Figura 20. Inserciones en la región reguladora de <i>DXR</i>	41
Figura 21. Alineamiento del resultado de la secuenciación de la construcción pENTR <i>pMCT</i> contra la secuencia reguladora anotada en la base de datos de TAIR.....	42

Figura 22. Alineamiento del resultado de la secuenciación de la construcción pENTR <i>pCMK</i> contra la secuencia reguladora anotada en la base de datos de TAIR.....	43
Figura 23. Alineamiento del resultado de la secuenciación de la construcción pENTR <i>pMDS</i> contra la secuencia reguladora anotada en la base de datos de TAIR.....	44
Figura 24. Alineamiento del resultado de la secuenciación de la construcción pENTR <i>pHDS</i> contra la secuencia reguladora anotada en la base de datos de TAIR.....	45
Figura 25. Alineamiento del resultado de la secuenciación de la construcción pENTR <i>pHDR</i> contra la secuencia reguladora anotada en la base de datos de TAIR.....	46
Figura 26. Confirmación de la presencia <i>pDXR::LUC</i> en las colonias de <i>E. coli</i> DH5 α	47
Figura 27. Confirmación de la presencia de <i>pMCT::LUC</i> y <i>pCMK::LUC</i> en las colonias de <i>E. coli</i> DH5 α	48
Figura 28. Confirmación de la presencia de <i>pMDS::LUC</i> en las colonias de <i>E. coli</i> DH5 α	48
Figura 29. Confirmación de la presencia de <i>pHDS::LUC</i> en las colonias de <i>E. coli</i> DH5 α	49
Figura 30. Confirmación de la presencia de <i>pHDR::LUC</i> en las colonias de <i>E. coli</i> DH5 α	49
Figura 31. Confirmación de la presencia de <i>pDXR::LUC</i> en las colonias de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58.....	50
Figura 32. Confirmación de la presencia de <i>pMCT::LUC</i> en las colonias de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58.....	50
Figura 33. Confirmación de la presencia de <i>pCMK::LUC</i> en las colonias de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58.....	51
Figura 34. Confirmación de la presencia de <i>pMDS::LUC</i> en las colonias de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58.....	51
Figura 35. Confirmación de la presencia de <i>pHDS::LUC</i> en las colonias de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58.....	52
Figura 36. Confirmación de la presencia de <i>pHDR::LUC</i> en las colonias de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58.....	52
Figura 37. Ensayo preliminar para establecer el sistema de bioluminiscencia.....	58
Figura 38. Imágenes de bioluminiscencia de líneas transgénicas expresoras de las construcciones <i>pDXR::LUC</i> , <i>pHDR::LUC</i> y <i>pHDS::LUC</i> respectivamente.....	59
Figura 39. Ensayo de bioluminiscencia in vivo de las líneas transgénicas generadas.....	60
Figura 40. Análisis bioluminiscente de líneas transgénicas homocigotas y heterocigotas expresoras de las construcciones <i>pDXR::LUC</i> , <i>pMCT::LUC</i> , <i>pCMK::LUC</i> , <i>pMDS::LUC</i> , <i>pHDS::LUC</i> y <i>pHDR::LUC</i>	61

Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos delanteros usados para el análisis de los vectores de expresión generados.....	31
Tabla 2. Tamaño de las regiones reguladoras clonadas para generar los vectores de entrada.....	36
Tabla 3. Estructura de las regiones reguladoras clonadas.....	40
Tabla 4. Segregación de líneas reporteras <i>pDXR::LUC</i>	54
Tabla 5. Segregación de líneas reporteras <i>pMCT::LUC</i>	54
Tabla 6. Segregación de líneas reporteras <i>pCMK::LUC</i>	54
Tabla 7. Segregación de líneas reporteras <i>pMDS::LUC</i>	55
Tabla 8. Segregación de líneas reporteras <i>pHDS::LUC</i>	55
Tabla 9. Líneas transgénicas generadas en este trabajo.....	56
Tabla 10. Líneas transgénicas generadas en este trabajo.....	57
Tabla 11. Líneas transgénicas homocigotas generadas en este trabajo.....	57

Hoja de datos del jurado

1	1. Datos del alumno	46	1. Datos del alumno
2	Apellido paterno	47	Enriquez
3	Apellido materno	48	Toledo
4	Nombre(s)	49	Constanza
5	Teléfono	50	5523484023
6	Facultad de Ciencias	51	Facultad de Ciencias
7	Carrera	52	Biología
8	Número de cuenta	53	313199002
9		54	
10	2. Datos del tutor	55	2. Datos del tutor
11	Grado	56	Dra.
12	Nombre(s)	57	Helena
13	Apellido paterno	58	Porta
14	Apellido materno	59	Ducoing
15		60	
16	3. Datos del sinodal 1	61	3. Datos del sinodal 1
17	Grado	62	Dra.
18	Nombre(s)	63	Patricia
19	Apellido paterno	64	León
20	Apellido materno	65	Mejía
21		66	
22	4. Datos del sinodal 2	67	4. Datos del sinodal 2
23	Grado	68	Dra.
24	Nombre(s)	69	Claudia Andrea
25	Apellido paterno	70	Segal
26	Apellido materno	71	Kischinevzky
27		72	
28	5. Datos del sinodal 3	73	5. Datos del sinodal 3
29	Grado	74	Dra.
30	Nombre(s)	75	Ángela Victoria
31	Apellido paterno	76	Forero
32	Apellido materno	77	Forero
33		78	
34	6. Datos del sinodal 4	79	6. Datos del sinodal 4
35	Grado	80	Dr.
36	Nombre(s)	81	Luis Felipe
37	Apellido paterno	82	Jiménez
38	Apellido materno	83	García
39		84	
40	7. Datos de trabajo escrito	85	Análisis transcripcional de los genes de la vía
41		86	metileritritol fosfato (MEP) usando el reportero
42		87	luciferasa en la planta Arabidopsis thaliana
43		88	(Brassicaceae).
44	Número de páginas	89	pp106
45	Año	90	2020

Agradecimientos académicos

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Patricia León Mejía y la Dra. Helena Porta Ducoing y financiado por PAPIIT-DGAPA-UNAM IN204617, CONACYT Fronteras (FC#96) y al UC-Mexus.

- A la Dra. Patricia León Mejía, por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis de licenciatura en su grupo de investigación. Por su entusiasmo y goce que le caracteriza en el quehacer de la ciencia.
- A la Dra. Helena Porta, por haberme abierto las puertas y aceptado como su estudiante. Gracias por la excelente tutela en la realización de este proyecto, por su apoyo incondicional dentro y fuera del laboratorio, por la ayuda, la comprensión y la paciencia que tuvo en enseñarme. Así como sus invaluable consejos que me permiten crecer como una profesionista de calidad.
- A la Dra. Nidia Luz Sánchez León por el apoyo en los aspectos técnicos del proyecto.
- A la Dra. Elizabeth Córdoba por los consejos y su asesoramiento.
- A la Dra. Verónica Rojo León, por su asesoría y disposición para la utilización del equipo en los experimentos de bioluminiscencia.
- A todos los miembros del grupo de la Dra. Patricia León por su ayuda, por sus consejos, apoyo, retroalimentación y por enseñarme que la ciencia es un trabajo colaborativo.
- A mi comité tutorial; la Dra. Patricia León Mejía, la Dra. Claudia Andrea Segal Kischnevsky, la Dra. Ángela Victoria Forero Forero y al Dr. Luis Felipe Jiménez, les agradezco el tiempo dedicado a la revisión y contribuciones de esta tesis.

Agradecimientos personales

A mi mamá por apoyarme en todo momento y por todos los medios inimaginables para concluir mis estudios de licenciatura, sin tu apoyo jamás hubiera llegado a la meta. Te doy gracias por brindarme todas las herramientas para ser feliz y enseñarme a compartir esa felicidad con el mundo que me rodea, por enseñarme con tu ejemplo a ser justa y trabajar por mis sueños. Te agradezco el respeto y tu entereza que fueron claves para que ambas pudiéramos crecer. Gracias por guiarme por un buen camino para que hoy pueda emprender el mío.

Infinitas gracias a mi familia que pese a que me alejé de ellos, nunca dejaron de preocuparse por mí, sentí su apoyo y la calidez de su amor aún en la distancia. A mis mejores amigos y amigos de la facultad que me motivan a ser mejor cada día y que me recuerdan el preciado regalo que es la amistad.

A la Dra. Gladys Nopala y la M. en C. Tania Cruz por enseñarme tanto de la vida, por sus consejos y experiencia, por las comidas y el chisme, por escucharme, por su comprensión, quisiera poder transmitirles lo agradecida que estoy, porque sin su increíble compañía mi paso por el laboratorio no hubiera sido igual.

A todos los Tallerines, gracias por los días de postre, por las risas y porque vivimos juntos la experiencia IBT. Le agradezco al Guajolocombo por los partidos, por las pizzas y las salidas, por no guardar rencor por dejarlos afuera del departamento, gracias porque cada uno es tan especial y maravilloso, les deseo pura cosa buena y los quiero mucho. Agradezco especialmente a Kenya por ser mi rommie, por tu amabilidad, paciencia y armonía en verdad gracias. A Mau y Yami por su amistad, por enseñarme mundos distintos, por su alegría y diversión, agradezco haberlos conocido porque gracias a ustedes pude conocerme, vencer el miedo y ser muy feliz.

A mis perritos que esperaron pacientemente mi regreso y que me acompañaron durante el proceso de redacción, siempre con su energía y ternura.

Introducción

Las células vegetales contienen organelos semiautónomos denominados plástidos. Los plástidos en general y los cloroplastos en particular, albergan una variedad de vías metabólicas, entre las que destacan la fotosíntesis y la biosíntesis de hormonas, lípidos e isoprenoides. Estos últimos compuestos, también llamados terpenos, son el grupo más grande de productos naturales, con más de 70000 compuestos descritos (Liu *et al.*, 2020) y se sintetizan en todos los seres vivos, siendo las plantas las que producen la mayor diversidad. Los isoprenoides son esenciales para el desarrollo y crecimiento de todos los organismos y también para la salud humana.

La biosíntesis de isoprenoides en la célula vegetal ocurre por la acción de dos vías metabólicas independientes; la vía del mevalonato o vía mevalónica (MVA), que opera en el citoplasma y la vía del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), que opera en los plástidos. Ambas vías producen a los dos precursores universales de los isoprenos; el isopentenilbifosfato (IPP) y su isómero, el dimetilalilbifosfato (DMAPP). Las células utilizan el IPP y el DMAPP provenientes de vía MEP para la síntesis de isopreno, hormonas como las estrigolactonas, el ácido abscísico (ABA) y las giberelinas, plastoquinonas, pigmentos fotosintéticos como las clorofilas y los carotenos (Eisenreich *et al.*, 2004). En contraste, la vía mevalónica provee los precursores para la síntesis de esteroides y la ubiquinona, principalmente. En este proyecto nos enfocaremos en el estudio de la vía MEP, siendo el principal objetivo generar plantas de *Arabidopsis thaliana* que porten establemente fusiones transcripcionales de los 6 genes de la vía MEP con el gen reportero de Luciferasa. Este sistema permitirá analizar el patrón espacial y temporal de la expresión de estos genes de manera simultánea, bajo diversos estímulos ambientales y de desarrollo de las plantas.

Este trabajo forma parte de un proyecto integrativo que permitirá comprender los mecanismos que modulan la vía MEP, en respuesta a señales internas y externas. El entendimiento de la regulación de la vía MEP será esencial para el desarrollo de herramientas biotecnológicas, útiles para la medicina y la agricultura.

Antecedentes

Los isoprenoides

Los isoprenoides también llamados terpenoides son el grupo más grande de productos naturales que se sintetizan en todos los seres vivos; particularmente en las plantas que son las mayores productoras de estos compuestos. En total se conocen más de 70 000 isoprenoides (Liu et al., 2020). Las funciones biológicas de los isoprenoides y sus derivados son tan diversas como ellos mismos ya que incluyen desde pigmentos fotosintéticos indispensables para la fotosíntesis, en la respiración como acarreadores de electrones, en la construcción de la membrana celular y de los organelos, en la glucosilación, en la transducción de señales, en el transporte vesicular dentro de la célula y en general en el crecimiento y el desarrollo de los seres vivos. Todos los isoprenoides, sin importar su complejidad estructural, comparten un esqueleto base de cinco carbonos llamada unidad isoprénica o isopreno (Figura 1) que mediante una reacción de condensación produce compuestos que van desde una sola unidad hasta isoprenoides diferentes con miles de ellas (León et al., 2008).

Los isoprenoides se clasifican de acuerdo con el número de unidades isoprénicas que los conforman en :

- 1) Hemiterpenos conteniendo una sola unidad isoprénica de 5 carbonos (C_5).
- 2) Monoterpenos formado por dos unidades isoprénicas ($C_{10}H_{16}$) que incluyen la mayoría de las esencias volátiles de las flores y aceites esenciales.
- 3) Sesquiterpenos compuestos por tres unidades isoprénicas ($C_{15}H_{24}$).
- 4) Diterpenos constituidos por cuatro unidades isoprénicas ($C_{20}H_{32}$) como el taxadieno precursor del taxol, el retinol y el fitol.
- 5) Triterpenos formados por 6 unidades isoprénicas ($C_{30}H_{48}$), incluye a los brasinoesteroides y el fitoesterol.
- 6) Tetraterpenos con 8 unidades isoprénicas que forman compuestos de 40 carbonos (C_{40}) como los carotenoides.
- 7) Y finalmente los politerpenos que consisten en largas cadenas formadas por múltiples unidades isoprénicas como el látex.

Adicionalmente, los isoprenoides sufren diversas modificaciones como ciclizaciones, oxidaciones e hidroxilaciones (León et al., 2008).

La biosíntesis de isoprenoides en la naturaleza

En la naturaleza existen dos vías independientes para la biosíntesis de isoprenoides: la vía del mevalonato o vía mevalónica (MVA) y la vía del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP). Los productos de estas dos vías son el isopentenilbifosfato (IPP) y su isómero alílico el dimetilalilbifosfato (DMAPP) (Fig. 1).

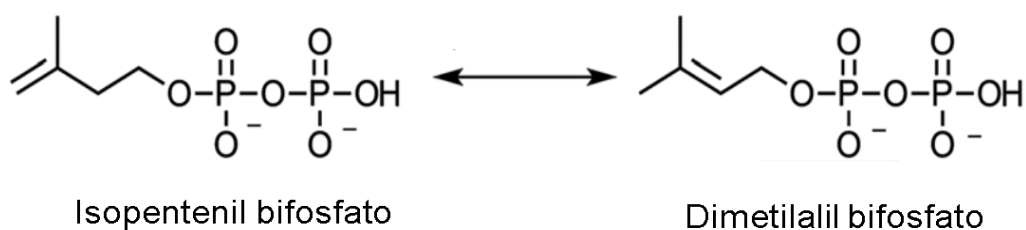


Figura 1. Estructura del Isopentenil bifosfato (IPP) y del dimetilalil bifosfato (DMAPP) precursores universales de la biosíntesis de isoprenoides.

Con excepción de las plantas, la mayoría de los organismos utilizan únicamente una de las dos vías (Vranová et al., 2013; Fig. 2). Las arqueas, los hongos y los animales poseen únicamente la vía mevalónica. En contraste las cianobacterias, la mayoría de las bacterias gramnegativas y los protozoarios del género apicomplexa poseen únicamente la vía MEP. Interesantemente, las plantas cuentan con ambas vías localizadas en diferentes compartimentos de la célula vegetal: mientras que la vía MVA opera en el citoplasma y la vía MEP opera en los plástidos (Lange et al., 2000; Hemmerlin et al., 2012).

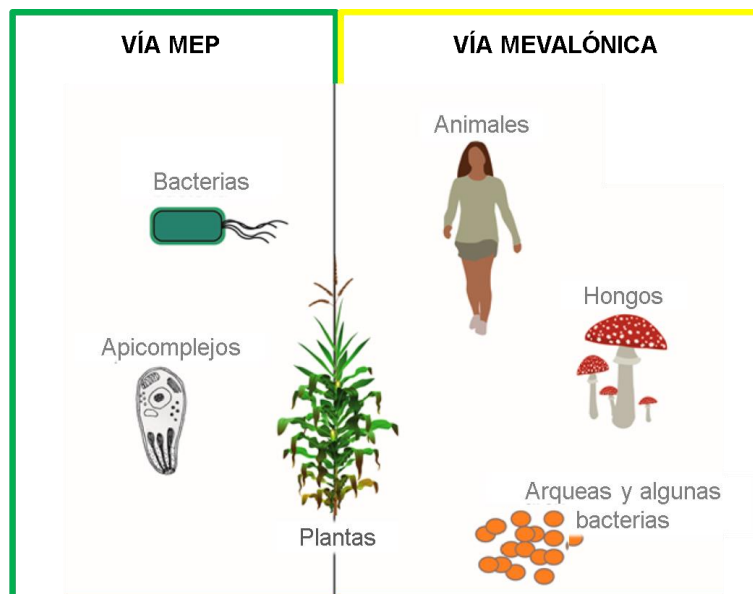


Figura 2. Distribución de la síntesis de isoprenoides en distintos organismos.

La vía mevalónica (MVA)

En la vía mevalónica, el precursor inicial es el acetil coenzima A (acetil CoA). El primer paso depende de la enzima acetil CoA C-acetiltransferasa (**AACT**) que cataliza la condensación de dos moléculas de acetil CoA para formar acetoacetil-CoA, que se convierte a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), por acción de la HMG-CoA sintasa (**HMGS**). Este derivado se reduce a mevalonato (MVA) por la HMG-CoA reductasa (**HMGR**), este es un paso limitante en la vía y por ello esta ruta biosintética lleva su nombre. En el siguiente paso, el MVA se fosforila a 5-fosfomevalonato (MVA 5-P) por la MVA cinasa (**MK**). Posteriormente ocurre una segunda fosforilación para formar 5-difosfomevalonato (MVA 5-PP) catalizada por la enzima 5-fosfomevalonato cinasa (**PMK**). Finalmente el 5-difosfomevalonato se descarboxila para formar IPP esta reacción la cataliza la 5-difosfomevalonato descarboxilasa (**MVD**). Posteriormente, el IPP se convierte en su isómero DMAPP en una reacción catalizada por la IPP isomerasa (**IDI**) (Fig. 3).

Inicialmente se asumió que la síntesis de IPP y DMAPP se llevaba a cabo exclusivamente a través de la vía mevalónica. Sin embargo resultados experimentales sobre la biosíntesis de isoprenoides en bacterias y en plantas no pudieron explicarse a partir de su síntesis a través de la vía del mevalonato. Posteriormente, casi 50 años después se identificó una vía

alternativa independiente de la MVA para la síntesis de IPP y DMAPP. Esta vía se denominó originalmente vía no mevalónica o vía Rohmer y posteriormente, con la dilucidación de los pasos enzimáticos se denominó vía MEP.

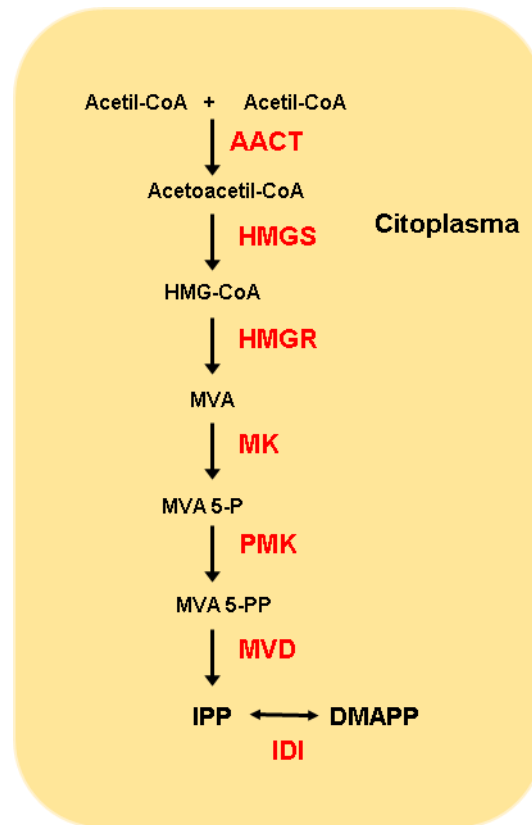


Figura 3. Vía mevalónica

La vía del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP)

En las plantas los genes que codifican para las enzimas de la vía MEP se encuentran en el núcleo, y las enzimas derivadas de estos genes cuentan con péptidos de tránsito hacia su extremo amino terminal que las dirigen hacia los plástidos, donde ejecutan su función (Jarvis et al., 2013; Tholl y Lee 2011).

La vía MEP utiliza piruvato y gliceraldehído 3-fosfato como sustratos para producir dimetilalil bifosfato (DMAPP) y isopentenil bifosfato (IPP), a través de la participación de siete pasos enzimáticos consecutivos (Phillips et al., 2008) (Fig. 4). La primera reacción es catalizada por la 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (**DXS**) e involucra la condensación de una molécula de piruvato con una de gliceraldehído 3-fosfato (G3P), produciendo 1-deoxi-

D-xilulosa 5-fosfato (DXP). El DXP se reduce a 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) por acción de la 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (**DXR**), que es la segunda enzima de la vía. En el tercer paso, la enzima 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa (**MCT**) transforma el MEP en 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME). El cuarto paso depende de la enzima 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol cinasa (**CMK**), la cual fosforila a CDP-ME para formar 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato (CDP-MEP). En el quinto paso participa la enzima 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa (**MDS**), la cual convierte a el CDP-MEP a su intermediario cíclico el metileritritol 2,4-ciclodifosfato (MEcPP). En el sexto paso el MEcPP produce 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMBPP) por la HMBPP sintasa (**HDS**). En el último paso de la vía, el HMBPP se reduce a IPP y DMAPP por la HMBPP reductasa (**HDR**). El IPP y DMAPP se isomerizan por la acción de la enzima isopentenil difosfato isomerasa (**IDI**), sin embargo la síntesis de ambos productos ocurre aún en la ausencia de esta isomerasa (Page 2004; Banerjee, 2014).

El destino del IPP y DMAPP en la síntesis de sus derivados isoprenoides depende de la vía de la cual provengan. Las células utilizan el IPP y el DMAPP provenientes de vía MEP para la síntesis de diversos compuestos dentro de los plástidos por ejemplo, el isopreno, las estrigolactonas, el ácido abscísico (ABA), las giberelinas, las plastoquinonas y los pigmentos fotosintéticos como las clorofilas y los carotenos (Gutiérrez-Nava et al., 2004). En contraste la vía MVA provee los precursores para la síntesis de los esteroides y la ubiquinona principalmente (Eisenreich et al., 2004).

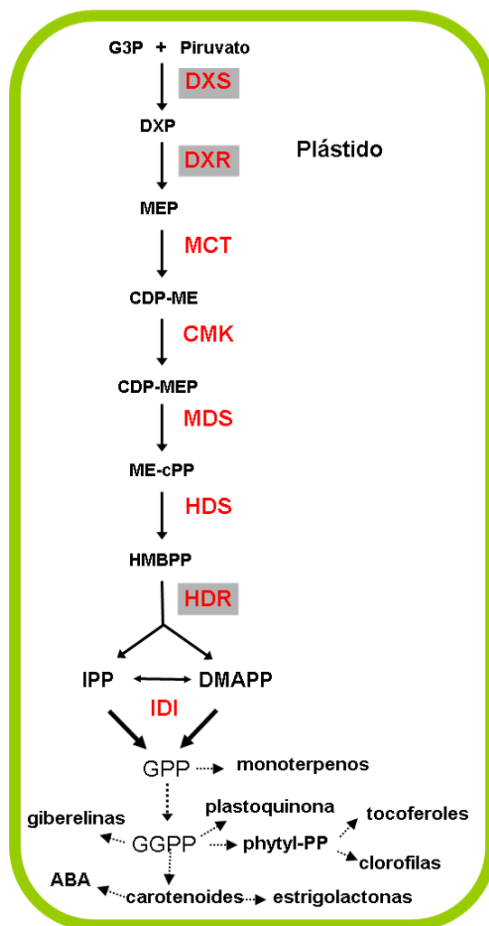


Figura 4. Pasos enzimáticos de la vía MEP (Córdoba et al., 2009).

Potencial biotecnológico de los isoprenoides

Sumado a su papel biológico, los isoprenoides poseen un valor biotecnológico, que radica en su función como fuente de vitaminas (α -tocoferol y β -caroteno), de medicamentos onco-preventivos (luteína y licopeno) (Khachik et al., 1995), anticancerígenos (vinblastina, y taxol) (Eisenreich, et al., 2004), saborizantes (limoneno y mentol), fragancias, colorantes (carotenos) y biocombustibles (Tippmann, et al., 2013; Vickers, et al., 2014). Además la ausencia de proteínas homólogas de la vía MEP en el humano y la presencia de esta vía en bacterias gramnegativas y apicomplejos, que incluyen importantes patógenos del ser humano, como *Helicobacter*, *Salmonella*, *Chlamydia* así como *Plasmodium* y *Toxoplasma*, hacen de la vía un blanco potencial de fármacos antiinfecciosos (Rodríguez-Concepción et al., 2004).

***Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio**

Arabidopsis thaliana (*Arabidopsis*) es miembro de la familia Brassicaceae. Esta planta tiene una distribución natural a través de Europa, Asia, y Norte América. Es una planta diploide con un ciclo de vida corto (6 a 8 semanas) (Al-Shehbaz y O'Kane, 2002), con una capacidad de crecer en condiciones controladas y dadas su pequeña dimensión permite su fácil cultivo. Las plantas adultas llegan a medir entre 15 a 20 cm, de alta fecundidad (hasta 10,000 semillas por planta), las semillas son longevas y altamente viables. El tamaño del genoma de *A. thaliana* es de 157 Mb y se organiza en 5 cromosomas, contiene el menor número de secuencias repetidas, comparado con otras plantas superiores conocidas (Pruitt et al., 1986; Bennett et al., 2003), características que facilitaron su secuenciación, ensamblaje y la anotación de su genoma. Este organismo es ideal para la mutagénesis y para la identificación, selección y propagación de líneas mutantes o transgénicas, así como la preservación de las líneas mutantes, por su autofecundación. Además *Arabidopsis* se puede transformar fácilmente mediante la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium*). Actualmente existen líneas mutantes de todos los genes de la vía MEP, lo que facilita el análisis de esta vía metabólica (<https://www.arabidopsis.org/>).

La transformación vegetal mediada por *Agrobacterium* es un método indirecto de transformación, pertenece a los métodos basados en la utilización de vectores biológicos, que utiliza las características naturales de patogenicidad en plantas, para la introducción de los genes de interés al genoma vegetal. El segmento de DNA transferido de la bacteria a la planta es conocido como DNA de transferencia o T-DNA y se encuentra en el plásmido residente de la bacteria llamado plásmido Ti (inductor de tumores). El plásmido Ti también cuenta con los “genes Vir” contenidos en la región Vir (región de virulencia), que son los encargados de mediar la transferencia efectiva del cassette de expresión hacia las células vegetales (Gelvin, 2000; Gelvin, 2010). En la transferencia de genes por *Agrobacterium*, se emplean vectores binarios, esta estrategia consiste en el uso de dos plásmidos en la bacteria, uno de ellos, el vector binario, contiene los bordes del T-DNA en el que se incluye el casete de expresión o genes de interés y, el otro, el plásmido residente es el que contiene los genes de virulencia, necesarios para la transferencia efectiva (Díaz Granados y Chaparro Giraldo, 2012).

El descubrimiento de la vía MEP y las mutantes afectadas en el desarrollo de los cloroplastos

El descubrimiento de DXS

La identificación del gen que codifica para DXS se obtuvo a partir del análisis de la mutante albina *cla1-1*, aislada a partir de una colección de mutantes generadas por la inserción de T-DNA en *Arabidopsis thaliana*. Los pigmentos fotosintéticos como clorofilas y carotenoides, la producción de vitaminas como α -tocoferol y la producción de ácido abscísico (ABA) son básicamente nulas en *cla1* con respecto a la planta silvestre (Estévez et al 2001). Además *cla1* presenta alteración en la morfología de sus cloroplastos, careciendo de membrana tilacoidal y presentando estructuras en forma de vesículas (Mandel et al., 1996).

Cuando se identificó el producto del gene *CLA1* se encontró que codificaban para una proteína con secuencias características de la familia de las transcetolasas, cuya función es transferir grupos cetoles. Esta familia de enzimas presenta un motivo transcetolasa y el sitio de unión al cofactor tiamina difosfato (TPP) (Vogel y Pleiss, 2014). Con estos datos se sugirió que la proteína CLA1 era un miembro de la familia de las transcetolasas (Mandel et al., 1996). Estudios posteriores mostraron que la proteína CLA1 de *A. thaliana* tenía similitud con una proteína de *E. coli* que se le denominó DXS (Sprenger et al., 1997), y la cual cataliza la condensación entre el piruvato y el G3P derivados de la glucosa para producir 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP) implicando la descarboxilación del piruvato (Fig. 5). Se describió la participación de DXP para la síntesis de tiamina y piridoxal en bacterias y posteriormente en plantas (Julliard y Douce, 1991; Hill et al., 1996; Frank y Groll 2017). La comprobación de que el producto de *CLA1* era la DXS de *Arabidopsis* se realizó a través de ensayos *in vivo* con las mutantes *cla1-1* crecida en medio suplementado con el compuesto 1-deoxi-D-xilulosa, producto de la reacción catalítica de DXS, en donde se observó que se revertía el fenotipo de la mutante *cla1-1*. Además mediante ensayos *in vitro* se demostró que la proteína recombinante CLA1 catalizaba la formación del compuesto DXP (Estévez et al., 2000).

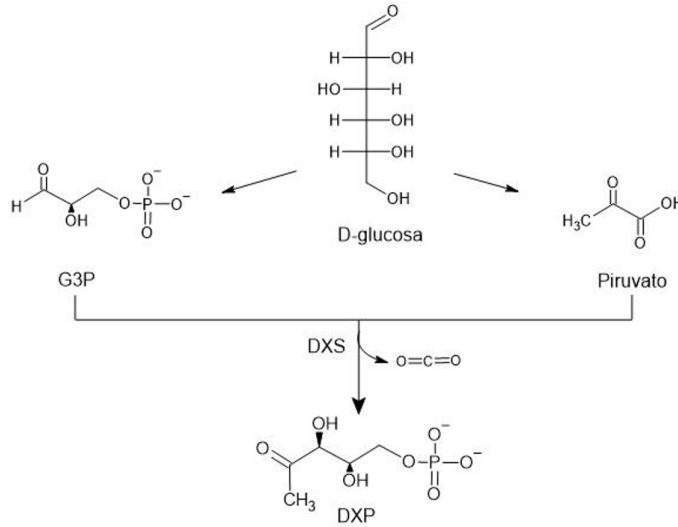


Figura 5. Formación del metabolito DXP.

Patrón de expresión de *DXS* en *Arabidopsis thaliana*

Los patrones de expresión del gen *CLA1*, se estudiaron a través de la acumulación de su mensajero y de su proteína, así como su expresión *in planta* se analizó a través de una fusión transcripcional de la región regulatoria del gen *CLA1/DXS* con el reportero de beta glucoronidasa (*GUS*) *CLA1::GUS*. Se encontró que *DXS* se expresa desde semillas en germinación, hasta la planta adulta, pero principalmente en plántulas y tejidos jóvenes (Estévez et al., 2000).

Posteriormente con la secuenciación del genoma de *Arabidopsis* se descubrió que *A. thaliana* posee tres genes homólogos a *DXS*. *AtDXS1* (At4g15560), también llamado *CLA1*, codifica una enzima *DXS* funcional y cuya mutación es letal en plántula. De los otros dos genes, codifican para proteínas que al parecer no tienen actividad de *DXS* (Estévez et al 2000; Phillips et al., 2008; Vranová et al., 2013).

En estudios posteriores con plantas transgénicas sobreexpresoras de *DXS*, se determinó que los cambios en la cantidad de esta proteína poseen un impacto en la acumulación de diversos productos isoprenoides como clorofilas, carotenos, fitol, ABA y α -tocoferol con lo cual se demostró su papel como enzima limitante del flujo de la vía MEP (Estévez et al., 2001). Aunado a esto, mediante el uso de clomazona, un inhibidor específico de *DXS*, se estimó el

incremento de la actividad enzimática en las líneas sobreexpresoras comparado con la silvestre (Estévez et al., 2001; Enfissi 2005; Carretero-Paulet et al., 2006).

El descubrimiento de *DXR*

El descubrimiento del segundo paso enzimático de la vía MEP surgió de trabajos con el intermediario 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). Seto y colaboradores (1998) iniciaron una búsqueda de la enzima responsable de la producción de este intermediario en *E. coli*, generando mutantes letales auxotróficas para la vía MEP. La transformación de estas mutantes letales con una biblioteca de fragmentos genómicos de la misma cepa, reveló que un marco de lectura abierto del gen *yaeM*, fue capaz de rescatar la deficiencia metabólica. La caracterización del producto proteico del gen *yaeM*, reveló que la enzima podía catalizar la reducción dependiente de NADPH de DXP para dar lugar a MEP (**Fig. 6**). Se demostró que la reacción dependía de la presencia de cationes divalentes Mn^{2+} . Y más tarde *YaeM* se clasificó como DXP reductoisomerasa (DXR). Posteriormente se descubrieron homólogos en plantas, se encontró que *Arabidopsis* tiene solo un gen de copia única para DXR. Se observó que la proteína posee una secuencia de direccionamiento a los plástidos que se escinde posteriormente para proporcionar la forma activa de la enzima (Takahashi et al., 1998; Schwender et al., 1999; Carretero-Paulet et al., 2002).

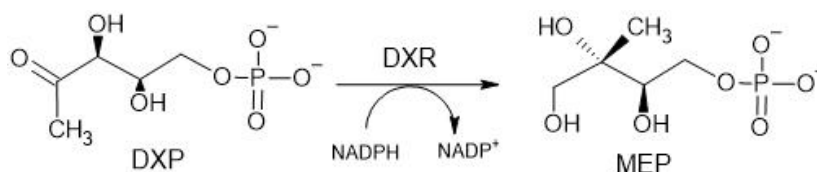


Figura 6. El segundo paso de la vía es catalizado por la enzima DXR también llamada IspC.

Patrón de expresión de *DXR* en *Arabidopsis thaliana*

Los patrones de expresión del gen *DXR*, se estudiaron a través de la acumulación de su mensajero y de su proteína, y también se analizó a través de una fusión traduccional de la región 5' de *DXR* con el reportero GUS (*DXR::GUS*), con esta fusión se observó que *DXR* se expresa en todos los tejidos que se analizaron (raíz, hojas caulinares, tallo, inflorescencia y

silicuas), pero con una mayor expresión en la inflorescencia y en las plántulas durante estadios tempranos del desarrollo de la planta (Carretero- Paulet et al., 2002).

La proteína DXR funciona como un homodímero. La catálisis de DXR se describe como el primer paso comprometido en la biosíntesis de isoprenoides debido a que el metabolito que le antecede, DXP, también es un precursor de la síntesis de la vitamina B1 y B6 (Julliard y Douce, 1991; Julliard, 1992; Carretero-Paulet et al., 2002).

Estudios posteriores en plantas transgénicas sobreexpresoras de *DXR* y con tratamientos con fosmidomicina, que es un inhibidor específico de esta enzima que compite por el sitio de unión del sustrato (Murkin et al., 2014) y que genera plantas con un fenotipo albino, se observó que la producción de DXP fue limitante con el incremento en la actividad de DXR lo que impactó en la disminución de los isoprenoides plastídicos, esto significó que la enzima DXR ejercía control en el flujo de la vía MEP (Proteau 2004; Carretero-Paulet et al., 2006).

El descubrimiento de *MCT*

El descubrimiento de las dos primeras enzimas de la vía MEP, permitió la identificación y caracterización en la bacteria *E. coli* de la tercera enzima de la vía denominada como 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa (MCT o CMS) y cuyo gen es *IspD*. En el año 2000 Rohdich y colaboradores describieron por primera vez el ortólogo de plantas de MCT. Usando ensayos de actividad, se observó que la enzima MCT requería de Mg^{+2} para la conversión del intermediario MEP en 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) (Rohdich et al., 2000. **Fig. 7**). La proteína MCT de *Arabidopsis* tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa. Se ha observado que la MCT de *E. coli* puede adoptar distintos estados cuaternarios, la flexibilidad en la disposición de las subunidades enzimáticas sugiere la formación de complejos específicos de proteína-proteína con otras proteínas de la vía como CMK y MDS (Gabrielsen et al., 2004; Gabrielsen et al., 2006).

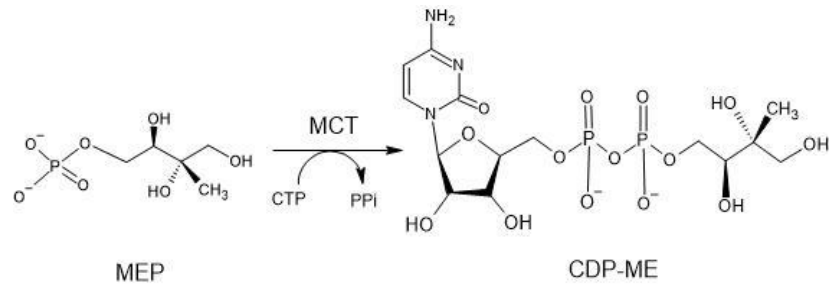


Figura 7. El tercer paso de la vía es catalizado por la enzima MCT o también llamada IspD.

Los patrones de expresión del gen *MCT* en Arabidosis, se determinaron a través del análisis de la acumulación de su mensajero. Los resultados mostraron una mayor acumulación en hojas y flores, una acumulación media en tallo y una menor acumulación en raíces y silicuas. La mutante *ispD* en *A. thaliana* fue generada por la inserción de un T-DNA y genera una disminución en los niveles de clorofila y carotenoides totales con respecto a la planta silvestre, así como una represión de los genes fotosintéticos. Los análisis ultraestructurales de la mutante albina *ispD* mostraron que el desarrollo de los cloroplastos se detuvo en etapas tempranas del desarrollo, mostrando una morfología carente de tilacoides y la presencia de grandes vesículas (Hsieh et al., 2008).

El descubrimiento de *CMK*

El cuarto paso de la vía involucra a la enzima 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato *CMK*, que cataliza la conversión de 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) en CDP-MEP (**Fig. 8**). La proteína *CMK* es un homodímero cuya estructura cristalográfica se obtuvo en *E. Coli*, donde el gen fue llamado *IspE*. Estudios posteriores identificaron al ortólogo de *IspE* en tomate al cual llamaron *CMK* y también se aislaron mutantes en *A. Thaliana*; el fenotipo de la mutante *cmk-1* es similar al de otros genes de la vía con un fenotipo albino, acumulando niveles indetectables de pigmentos fotosintéticos y con defectos en el desarrollo del cloroplasto que carecen de membrana tilacoidal (Rohdich et al., 2000; Hsieh et al., 2008).

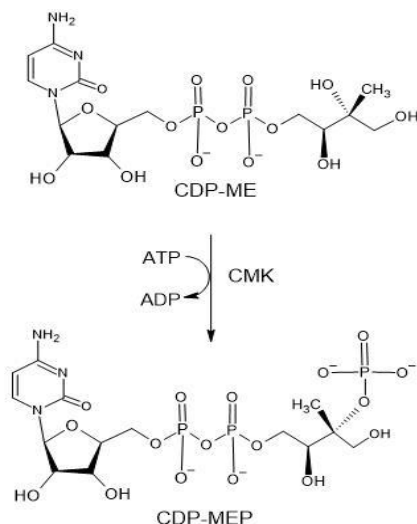


Figura 8. El cuarto paso de la vía es catalizado por la enzima CMK o también llamada IspE.

Patrón de expresión de *CMK*

CMK se expresa en las hojas y las flores, en los tallos y en menor grado en las raíces y las silicuas de *Arabidopsis* (Hsieh et al., 2008). También durante la maduración del fruto de tomate, la cual involucra cambios dramáticos en la estructura de sus plástidos durante la transformación del cloroplasto en cromoplasto, se demostró la acumulación del transcrito de *CMK*. Debido a la demanda de carotenoides como el licopeno que se producen y almacenan masivamente en los tomates (Lawrence et al., 1997; Rodríguez-Concepción et al., 2003). En *Nicotiana benthamiana* el gen *CMK* se expresa preferentemente en tejidos jóvenes (Ahn y Pai, 2008).

El descubrimiento de *MDS*

La proteína 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa o *MDS*, cataliza la conversión de CDP-MEP en metileritritol 2,4-ciclodifosfato (MEcPP) (**Fig. 9**). El gen *MDS* en *A. thaliana* se identificó como el homólogo del gen *IspF* de *E. coli*. A través de ensayos de expresión heteróloga de la proteína *MDS* de *Arabidopsis* se mostró que podía rescatar el fenotipo letal

de la mutante *ispF* de *E. coli*. La mutante de T-DNA de *Arabidopsis ispF-1* renombrada y unificada como *mds-1* (Phillips et al., 2008), presenta un fenotipo albino, carente de clorofilas, carotenoides y apoproteínas y defectos en el desarrollo de cloroplastos que carecen de tilacoides y de los complejos de captación de luz. Dentro de los cloroplastos mutantes de *mds-1* en lugar de las membranas tilacoides, se acumulan grandes vesículas (Hsieh y Goodman 2006).

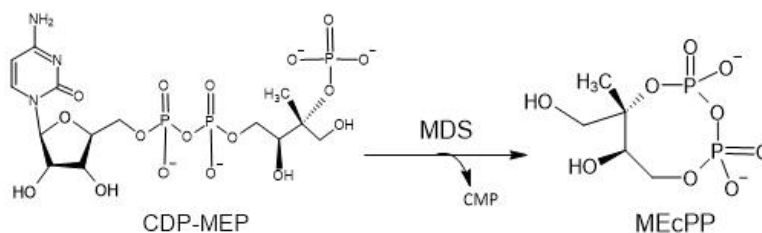


Figura 9. El quinto paso de la vía es catalizado por la enzima MDS también llamada IspF.

Patrón de expresión de *MDS*

A través del análisis de la acumulación de transcrito en plantas de *Arabidopsis*, se detectó el mensajero de *MDS* en raíz, hojas, tallos, inflorescencia y silicuas, con los niveles más altos en hojas y tallos (Hsieh y Goodman 2006). También se observó que la luz y la sacarosa inducen la expresión de *MDS* en plántulas de *Arabidopsis* (Hsieh y Goodman 2005).

El descubrimiento de *HDS*

La identificación del gen que codifica para HDS, que es el sexto paso de la vía, se obtuvo a través del análisis de la mutante albina de *Arabidopsis clb4* aislada a partir de una colección de mutantes generadas con etilmetanosulfonato (EMS) y por inserción de T-DNA. *HDS* codifica para la enzima que realiza la conversión de MEcPP a 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMBPP) (**Fig. 10**). Esta reacción requiere una doble transferencia de electrones que involucra un grupo [4Fe-4S]. En presencia de luz, la HDS de *A. thaliana* obtiene los electrones necesarios para dicha reacción de la cadena fotosintética de transporte de

electrones a través de la ferredoxina. Para llevar a cabo la reacción y en la oscuridad la catálisis de HDS requiere adicionalmente de NADPH (Seemann et al., 2006).

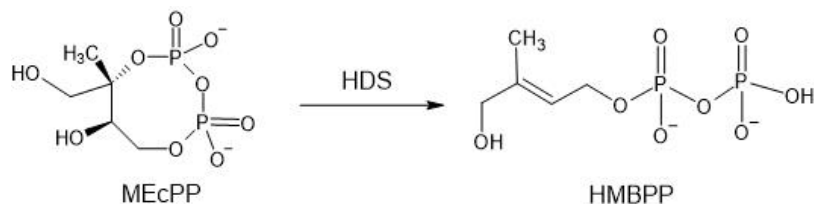


Figura 10. El sexto paso de la vía es catalizado por la enzima HDS también llamado IspG.

La mutante *clb4* carece del transcrito de *HDS*, lo que se refleja en niveles indetectables de la proteína HDS y presenta cloroplastos con membranas internas incipientes (Gutiérrez-Nava 2004).

Patrón de expresión de *HDS*

Se ha estudiado el patrón de expresión de *HDS* durante la maduración del fruto de tomate (Rodríguez-Concepción et al., 2003). Estudios posteriores en *Arabidopsis* detectaron acumulación de la proteína HDS en todos los tejidos analizados (raíz, tallo, hojas caulinares, hojas, flores y silicuas), sin embargo los niveles en las hojas jóvenes son más mayores en comparación con otros tejidos (Gutierrez-Nava 2004).

El descubrimiento de *HDR*

En el último paso enzimático de la vía MEP, el HMDBP se reduce a IDP y DMADP es catalizado por la 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (*HDR*) (**Fig. 11**). Esta reacción así como la de HDS requiere una doble transferencia de electrones que involucra un grupo [4Fe-4S]. En la mutante de *HDR* *clb6*, generada a partir de la inserción de T-DNA, igual que en las mutantes de los pasos anteriores disminuye la biosíntesis de pigmentos fotosintéticos clorofilas y carotenos, que son productos directos de la vía. Mediante análisis ultraestructurales por microscopía electrónica, se observan los cloroplastos de la mutante los cuales presentan incipientes membranas internas y vesículas grandes lo que demuestra que

estos plástidos están en un estado temprano de diferenciación (Gutiérrez-Nava et al., 2004; Guevara-García et al., 2005; Hsieh y Goodman 2005).

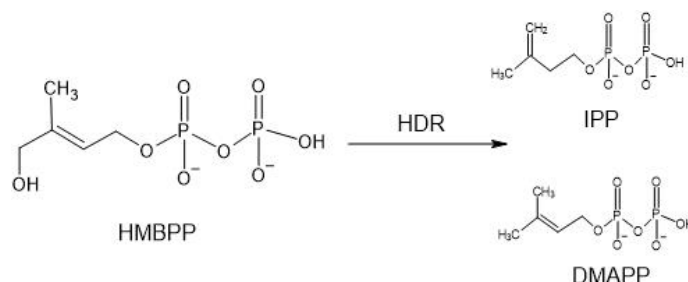


Figura 11. El séptimo paso de la vía es catalizado por la enzima HDR también llamada IspH.

Patrón de expresión de *HDR*

Los patrones de expresión del gen *HDR*, se han estudiado a través de la acumulación de su mensajero y de su proteína. La presencia de transcritos en todas las etapas del desarrollo de *Arabidopsis* indican el papel esencial de la proteína a lo largo de la vida de la planta. Estudios posteriores demostraron que la expresión del gen *HDR* de *Arabidopsis* es regulada positivamente por la luz durante diferentes etapas de desarrollo (Guevara-García et al., 2005). Estudios realizados en tomate y con plantas sobreexpresoras del *HDR* de tomate en *Arabidopsis*, demostraron la participación de *HDR* durante el tránsito de cloroplasto a cromoplasto durante la maduración de fruto de tomate y en el cambio de etioplasto a cloroplasto durante la desetiación de *A. thaliana*. Los resultados mostraron que la acumulación de HDR correlaciona con el incremento en la biosíntesis de carotenoides. A esta proteína se le reconoció por primera vez como una enzima “determinante” del flujo de la vía (Botella-Pavía et al., 2004).

La vía MEP se regula a diferentes niveles

Como se mencionó anteriormente en *Arabidopsis*, la transcripción de todos los genes de la vía MEP se regula de manera coordinada en respuesta a la luz (Carretero-Paulet et al., 2002; Botella-Pavía et al., 2004; Hsieh y Goodman 2005 ; Hsieh et al., 2008), sin embargo se sabe que las plantas también responden a estímulos externos periódicos como el día y la noche desarrollando relojes biológicos endógenos que les permiten anticipar y ajustar la expresión

genética aún en ausencia del estímulo, a los que se conoce como ciclos circadianos (Hsu & Harmer, 2014; McClung, 2006). La transcripción de todos los genes de la vía MEP se regula por ciclo circadiano, la expresión génica fluctúa a lo largo del día, alcanzando sus niveles de transcripción más altos justo antes del amanecer (Córdoba et al., 2009). Además del efecto de la luz y del ciclo circadiano, se sabe que la presencia de sacarosa aumenta los niveles de transcripción de *DXS*, *DXR*, *MCT* y *CMK* en plantas cultivadas en la oscuridad (Hsieh y Goodman, 2005). Evidencia experimental demostró que los niveles de transcrito de los genes de la vía MEP se inducen a los 6 y 18 días de edad de *Arabidopsis* (Guevara-García et al., 2005) y durante la maduración del fruto de tomate (Lois et al., 2000; Rodríguez-Concepción et al., 2001). También se ha observado la inducción de los genes *DXS* y *DXR* en respuesta a la colonización por el hongo *Glomus intraradices* en las raíces de trigo, maíz, arroz y cebada (Walter et al., 2000) y en respuesta a estrés osmótico se observó el aumento en la expresión de *DXR*, *MDS*, *HDS* y *HDR* en la raíz de plantas de *Arabidopsis* de 18 días de edad (Meier et al. 2011).

Algunas enzimas de la vía MEP están sujetos a regulación postranscripcional, esta regulación se observó por primera vez en la mutante *clb6* donde los niveles del transcrito *HDR* se reducen y la abundancia de proteína se incrementa con respecto a la silvestre (Guevara-García et al., 2005). En *Arabidopsis* las proteínas *DXS* y *DXR* son blanco de una proteasa estromal plastídica llamada Clp (Flores-Pérez et al., 2008; Llamas et al., 2017). El control metabólico de la vía a este nivel se ha dilucidado a través del análisis de la actividad enzimática demostrando que las enzimas de la vía MEP exhiben diferentes grados de control. No obstante la inhibición de la actividad de *DXS* limita en mayor grado el flujo de la vía, comparada con la inhibición de la actividad de *DXR* y de *HDR* observado en los análisis de la acumulación de los productos finales. Por ello *DXS* es considerada la principal enzima limitante de la vía (Estévez et al 2001; Botella-Pavía et al., 2004 ; Enfissi et al., 2005; Carretero-Paulet et al., 2006). La enzima *DXS* además tienen una retroregulación por acción de los productos IPP y DMAPP, ya que estos compuestos compiten por el sitio de unión del cofactor TPP. Este mecanismo inhibitor permite que los últimos metabolitos de la vía MEP, controlen la actividad de la primera enzima (Banerjee et al., 2013), lo que constituye un mecanismo regulador adicional sobre la vía.

Sin embargo, no sólo los productos de la vía son los actores principales en procesos biológicos esenciales para las plantas. También se ha demostrado que el metabolito metileritritol 2,4-ciclodifosfato (MEcPP) posee una función dual como intermediario de la vía MEP para la producción de isoprenoides y como un metabolito que actúa como una señal media la inducción de la *general stress response* (GSR) la cual es una reprogramación transcripcional rápida y transitoria de genes para la transducción de señales ambientales en respuestas celulares que llevan a reajustes metabólicos y fisiológicos para hacer frente a las condiciones adversas (Xiao et al., 2012; Benn et al., 2016; Lemos et al., 2016; Wang et al., 2020).

La integración del metabolito MEcPP en la respuesta GSR le permite actuar sobre las redes transcripcionales y la modulación de las respuestas posteriores más allá de las funciones clásicas de este compuesto como un intermediario en la vía biosintética, lo que remite a la importancia del estudio transcripcional de la vía MEP.

Estrategias experimentales para el estudio de la regulación transcripcional usando proteínas reporteras.

Los genes reporteros son marcadores que nos permite analizar los patrones de expresión de uno o varios genes de interés. Las características de las proteínas reporteras incluyen que sean detectadas por una metodología fácil, que tengan una toxicidad baja para el organismo y que generen una señal robusta (Chinnusamy et al., 2002). Existen diversos sistemas reporteros pero los más utilizados en el caso de plantas para el análisis transcripcional son: el sistema de la beta glucuronidasa (GUS), el de la proteína verde fluorescente (GFP) y el de la luciferasa (LUC).

Beta glucuronidasa (GUS)

El gen *uidA* de *Escherichia coli* codifica para el reportero beta glucuronidasa (GUS). La proteína GUS es un homotetramero de 68 kDa. Este sistema es un indicador sensible de la actividad de GUS que se puede identificar en los tejidos y células que expresan la

construcción reportera (Velten et al., 2008). Además permite la detección cualitativa de la actividad génica mediante un ensayo histoquímico y de forma cuantitativa mediante un ensayo fluorométrico . Una gran desventaja de los ensayos con GUS es que implican la destrucción del material vegetal. A pesar de que es posible detectar la actividad glucuronidasa sin hacer extractos el sistema requiere de la fijación del organismo impidiendo ensayos *in vivo*.

La detección de la actividad enzimática de la proteína GUS en el tejido de las plantas se lleva a cabo a través de la tinción histoquímica, la cual implica la reacción donde GUS usa como sustrato al ácido glucorónico 5-bromo-4-cloro-3 indol (X-Gluc) hidrolizándolo el cual se convierte en 5-bromo-4-cloroindol, el cual posteriormente se oxida y dimeriza para generar un precipitado de color azul oscuro insoluble en el sitio de actividad enzimática que es fácilmente detectable (Huttly, 2009).

A diferencia de la detección histoquímica, el análisis fluorométrico permite la cuantificación de la actividad de GUS. En presencia de la proteína GUS, el sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido (MUG) se hidroliza a un producto fluorescente, 4-metilumbeliferona (MU). Después de la reacción, se mide la fluorescencia total con un fluorómetro y se calcula la concentración de producto basándose en una curva de estandarización MU previa usando la diferencia de la fluorescencia del producto y del sustrato se obtiene el nivel de expresión (Cervera, 2005). Sin embargo el ensayo fluorimétrico es fiable y fácil de usar sin embargo la principal desventaja de este reportero es la alta estabilidad de la proteína, lo cual provoca una acumulación del producto de la GUS que con el tiempo incrementa y no refleja en muchos casos los niveles de expresión del gen en estudio (Mantis et al., 2000). Ésto dificulta diferenciar entre una mayor actividad en tiempos cortos de una actividad débil pero prolongada (Kim et al., 2006), además de que es un sistema invasivo para el organismo de estudio, el consumo de tiempo para la detección de su actividad requiere más de 24 h (Chinnusamy et al., 2002).

Fusiones con la proteína verde fluorescente (GFP)

La proteína GFP y sus variantes como la *yellow fluorescent protein* (YFP), *blue* (BFPs) y *cyan* (CFPs) emiten fluorescencia. La fluorescencia es un fenómeno óptico en el que una molécula absorbe un fotón de luz para pasar a un estado electrónico excitado, y al regresar a su estado basal emite un segundo fotón; dado que entre estos dos eventos se pierde algo de energía como vibraciones moleculares o calor, el fotón emitido tiene una energía más baja con una longitud de onda más larga. Los espectros de absorción y emisión y la diferencia entre ellos, depende directamente de la estructura del fluoróforo.

Las ventajas de este reportero es que la emisión de fluorescencia de GFP no requiere de sustratos externos o cofactores que no sea oxígeno. La ventaja más importante de este reportero incluye observación *in vivo* de su actividad y la existencia de una gran disponibilidad de colores diferentes de las proteínas fluorescentes (PF) hacen a este reportero uno de los más usados actualmente. Adicionalmente, con las PF se puede localizar la expresión a nivel celular y subcelular. La mayor desventaja es que existen límites prácticos en como la disponibilidad de equipo empleado, en este caso de un microscopio confocal y en el número de proteínas fluorescentes que pueden usarse. Los límites teóricos radican en el ancho del pico de emisión y de su intensidad, ya que si los picos se superponen los espectros vecinos no pueden ser diferenciados. Cada PF puede emitir a una diferente intensidad a una excitación dada o reaccionar de manera diferente a un entorno celular dado. Otras desventajas por considerar son la fluorescencia del entorno extracelular, la autofluorescencia y el fotoblanqueo, que se refiere a la destrucción de las moléculas fluorescentes por la luz de excitación usada, que limitan la resolución y el tiempo durante el cual se pueden realizar las mediciones de fluorescencia (Miyashiro et al., 2007).

Reportero luciferasa (LUC)

Otro de los genes reporteros usados es la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) que es una proteína monomérica de 62 kD que genera luz de color amarillo verdoso a través de la adenilación del sustrato luciferina, para producir adenilato de luciferilo que reacciona con el oxígeno molecular liberando una molécula de oxiluciferina y fotones que son emitidos a una

longitud de onda de alrededor de 560 nm, este fenómeno se define como bioluminiscencia. Después de reaccionar con el sustrato la enzima luciferasa se regenera lentamente (Ford et al., 1992). La vida media corta de la proteína es lo que permite un monitoreo de la expresión génica *in vivo* y en tiempo real (Thompson et al., 1991; van Leeuwen et al., 2000; Chinnusamy et al., 2002). Estas características hacen que la luciferasa sea un reportero más dinámico de los niveles de expresión *in vivo* (Velten et al., 2008) (**Fig. 12**).

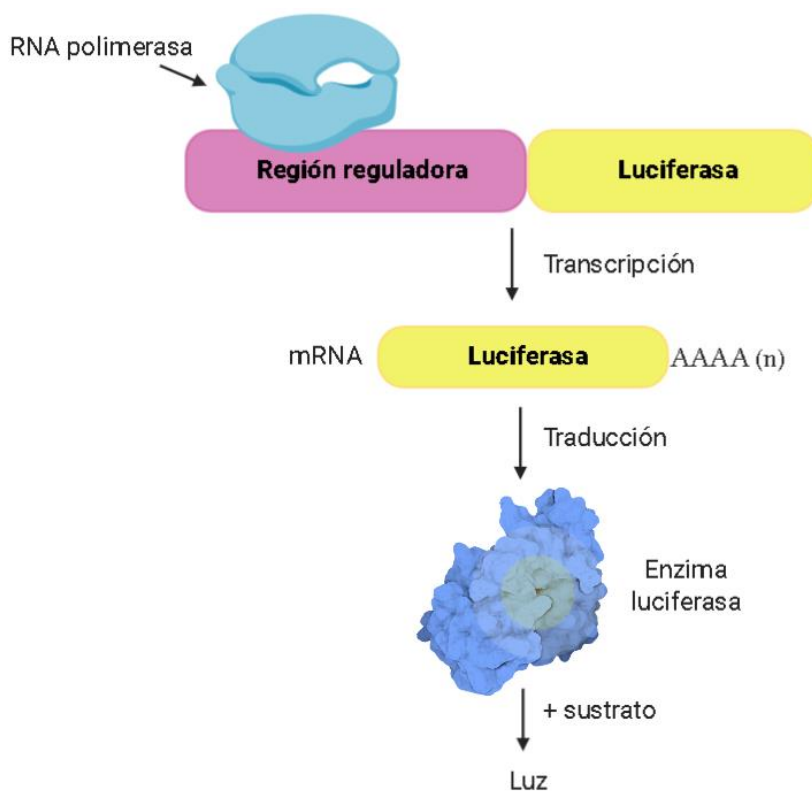


Figura 12. Esquema de la función del gen reportero de la luciferasa. La emisión de luz o bioluminiscencia representa la expresión de la proteína que representa la actividad del promotor.

Como se mencionó anteriormente todos los reporteros presentan ciertas ventajas y limitaciones dependiendo del tipo de análisis que se quiera realizar. En este estudio se utilizó el reportero de la luciferasa como un sistema dinámico que permitirá analizar la expresión de todos los genes de la vía MEP *in vivo*, con alta resolución temporal estudiando la vía en conjunto bajo diversos estímulos.

La meta de este trabajo es poder analizar la actividad de los transcritos de la vía MEP simultaneamente a través de líneas transgénicas de Arabidopsis que portan independientemente construcciones entre las regiones reguladoras de éstos genes fusionadas al gen de la luciferasa en respuesta a diversos estímulos que ya se han descrito como moduladores de la vía, como la luz, el desarrollo y las respuestas a estrés.

Objetivos

Objetivo general

Obtener las líneas transgénicas que expresan construcciones de la región reguladora 5' de los genes de la vía MEP fusionadas al gene reportero de luciferasa para analizar la regulación transcripcional global de la vía bajo diferentes estímulos.

Objetivos particulares

1. Confirmar las secuencias reguladoras en los vectores de entrada tipo Gateway.
2. Obtener las construcciones fusionadas a *LUC* de los genes de la vía MEP.
3. Seleccionar las líneas transgénicas homocigotas de Arabidopsis para cinco genes de la vía.
4. Establecer las condiciones de registro de bioluminiscencia *in planta* en las líneas transgénicas generadas.
5. Analizar la expresión de luciferasa *in vivo* bajo la región reguladora de los genes de la vía MEP.

Hipótesis

Las líneas transgénicas que expresen el reportero luciferasa dirigidos por las regiones reguladoras de los genes de la vía MEP permitirá identificar respuestas coordinadas en la regulación transcripcional de la vía bajo diferentes estímulos.

Materiales y métodos

Material vegetal y condiciones de crecimiento

En este estudio se utilizó el ecotipo Heynh Columbia (Col-0) de *A. thaliana* procedente del Centro de Recursos Biológicos de Arabidopsis (Ohio State University). El cultivo de las semillas se realizó en condiciones estériles, empleando dos métodos diferentes de desinfección de semillas: 1) se utilizó el biocida Plant Preservative Mixture (PPM) con el cual inicialmente se colocaron el equivalente en peso a 600 semillas (100 semillas pesan 2.1 mg) en microtubos de 1.5 mL y se adicionaron 950 uL de agua MiliQ estéril más 40 uL de PPM más 10 uL de Tritón 20%, dejando en oscuridad con agitación constante por 12 h, antes de sembrar ó 2) las semillas se lavan con 1 mL de etanol absoluto por dos minutos seguido de un lavado de 1 mL de una solución de hipoclorito al 20% por cinco minutos y consecutivamente cinco lavados de 1 mL con agua destilada estéril para eliminar residuos de hipoclorito de sodio. Las semillas estériles se sembraron en medio GM 1X [Murashige y Skoog suplementado con sacarosa 0.5 % (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO., USA), Bacto-agar 0.9% (Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.)] en cajas Petri. Para romper la latencia, las semillas se incubaron durante 3 días a 4 °C en la oscuridad.

Las semillas germinaron bajo fotoperiodo de día largo (16/8 h luz/oscuridad) a 22°C y 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica. Las plántulas de 10 días post-germinación (dpg) se transfirieron a maceta y se cultivaron en sustrato Metro-Mix 300 (Sun Gro Horticulture, Canada) suplementado con fertilizante de liberación controlada (Osmocote Smart-release, The Scotts Miracle-Gro Company, USA), en cuarto de crecimiento bajo las condiciones descritas arriba. El mantenimiento de las plantas se realizó de acuerdo con las prácticas de crecimiento de la guía de Rivero et al., 2014; ABRC 2013.

Análisis *in silico* de las regiones reguladoras

Se realizó una búsqueda y descarga de las regiones anteriores al sitio de inicio de la transcripción ATG en el extremo 5' de cada gen de la vía MEP: *DXR* (At5g62790), *MCT* (At2g02500), *CMK* (At2g26930), *MDS* (At1g63970), *HDS* (At5g60600) y *HDR*

(At4g34350) en la base de datos de TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*). Posteriormente se analizaron *in silico* las regiones reguladoras con el programa Plant CARE para la anotación de posibles motivos regulatorios con la finalidad de predecir la extensión de las regiones reguladoras que pudieran contener motivos involucrados en la respuesta a estímulos de diversa naturaleza.

Clonación con el sistema Gateway®

La tecnología Gateway es un sistema de recombinación sitio-específica que se basa en dos reacciones de recombinación conservativas que no requieren de la síntesis de DNA y que pueden ocurrir no importando la topología de los DNAs (Invitrogen Gateway® Technology Manual). La reacción BP se refiere a la recombinación homóloga entre los sitios *attB* con un vector donador con los sitios *attP* para generar una clona de entrada con los sitios *attL*. La reacción LR se refiere a la recombinación homóloga entre los sitios *attL* de una clona de entrada con los sitios *attR* de un vector destino para generar la clona de expresión.

Tras determinar la extensión de las regiones reguladoras de cada uno de los genes, el grupo de la Dra. Katayoon Dehesh empleó el vector pENTR/D-TOPO® (**Fig. 13**), con el cual generaron los vectores de entrada de seis de las regiones reguladoras de los genes de la vía MEP. Este vector permite clonar de forma direccional un producto de PCR de extremo romo para generar un vector de entrada al sistema Gateway®. El vector pENTR/D-TOPO® cuenta con los sitios *attL1* y *attL2* para la recombinación LR, posee secuencias para los oligonucleótidos M13 y un cassette de resistencia a kanamicina (pENTR™ Directional TOPO®Cloning Kits 2012). Posteriormente los vectores de entrada pENTR *pDXR*, pENTR *pMCT*, pENTR *pCMK*, pENTR *pMDS*, pENTR *pHDS* y pENTR *pHDR* fueron entregadas al grupo de la Dra. Patricia León.

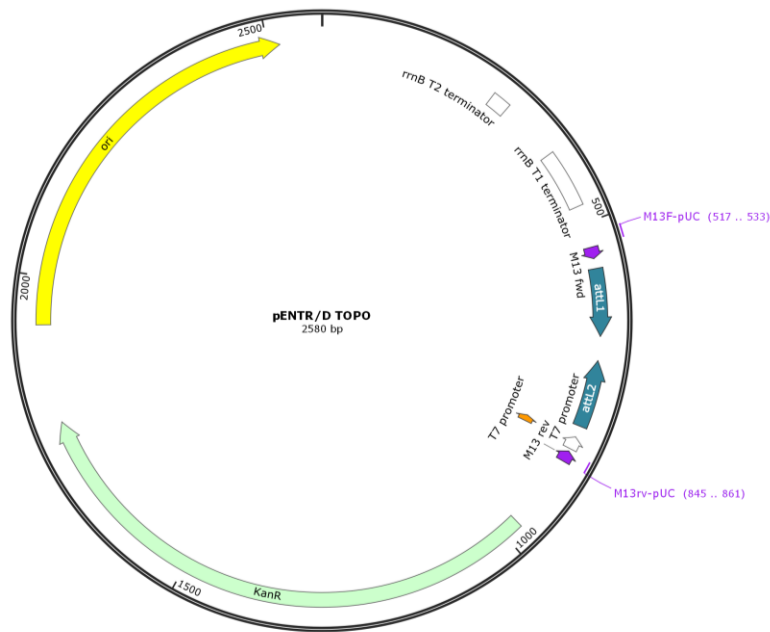


Figura 13. Mapa del vector de entrada pENTR/D-TOPO utilizado en este trabajo.

Transformación bacteriana en *E. coli*

Se utilizaron 50 μL de células electrocompetentes de *Escherichia coli* cepa DH5 α mantenidas a -70°C , las cuales se transformaron con DNA del vector de entrada 25 $\text{ng}/\mu\text{L}$ por electroporación. En condiciones de esterilidad se colocaron las células en hielo y se les añade 5 μL de DNA plasmídico, la mezcla de células-plásmido se coloca en una celda de electroporación mantenida en hielo y se le aplicó un pulso de 1.8 kV en un electroporador MicroPulser de BIO-RAD®. Las células se recuperaron en 1 mL de medio de cultivo Luria Bertani (LB) líquido sin antibiótico en agitación constante a 37°C durante una hora. Concluido este tiempo se sembraron en placa 20 μL y 80 μL de células transformadas en medio de selección LB sólido adicionado con Kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las cajas se incubaron a 37°C durante 12 h.

Extracción de DNA plasmídico a gran escala

La extracción de DNA plasmídico de los vectores usados en el trabajo tanto en el vector de entrada como destino se realizó a partir de las colonias transformadas con cada construcción

crecidas en 50 mL medio LB con antibiótico kanamicina y siguiendo el protocolo de Miraprep (Anexo 1). Posteriormente la cantidad del DNA obtenido se determinó con el equipo NanoDrop™ One de Thermo Scientific™.

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen final de 50 µL utilizando Taq polimerasa obtenida en el laboratorio y una concentración de 1 µM tanto del oligonucleótido derecho como del reverso en 20 mM de Tris-HCL pH 8.4, 50 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂ y 10 µM de dNTPs. Las condiciones de amplificación incluyeron: un ciclo inicial de desnaturalización de 1 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 segundos a 55 °C (para todos los genes analizados) y entre 1 a 2 min dependiendo del largo del producto esperado (1 min por cada 1000 pb) a 68 °C, y finalmente un ciclo de 5 min a 72 °C.

Se analizaron 5 µl de los productos de la reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en buffer TAE 1X concentración final en gel Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM.

Secuenciación

Las regiones reguladoras de las clonas de entrada pENTR *pDXR*, pENTR *pMCT*, pENTR *pCMK*, pENTR *pMDS*, pENTR *pHDS* y pENT *pHDR* se secuenciaron por el método de Sanger en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM y en la compañía Macrogen (Korea 10F, 254 Beotkkot-ro. Geumcheon-gu, Seoul 08511, Rep. of Korea), empleando los oligonucleótidos M13F y M13R.

Reacción de recombinación LR

La reacción de recombinación LR se realizó en un volumen de 10 µL conteniendo los siguientes elementos: 1 µL de DNA plasmídico de pBGWL7 (150 ng/µL), 1 µL de DNA plasmídico de la construcción de entrada deseada (150 ng/µL), 2 µL de enzima LR clonasa (Invitrogen) más 6 µL de TE buffer pH 8. La reacción se incubó por 12 horas a 22°C y se

detuvo añadiendo 2 μ L de proteinasa K (Invitrogen) e incubando por diez minutos a 37°C. De esta forma las clonas de entrada pENTR *pDXR*, pENTR *pMCT*, pENTR *pCMK*, pENTR *pMDS*, pENTR *pHDS* y pENTR *pHDR*, se recombinaron en el vector destino pBGWL7 (Fig. 14), el cual contiene; el gen reportero (*LUC*) que codifica para la proteína luciferasa de luciérnaga, los sitios *attR1* y *attR2* para la recombinación LR, un cassette de resistencia a espectinomicina (SpR), otro cassette con el gen *bar* el cual codifica para una fosfotricina acetil transferasa (PAT) la cual detoxifica a la célula de la acción del herbicida metionina sulfoximina (MSO) al catalizar la adición de un grupo acetilo al grupo amino libre del MSO, confiriendo resistencia a este agente que se emplea en la selección de plantas transgénicas (Maughan y Cobbett 2003; Dragicevic et al., 2013). Además cuenta con las secuencias del borde derecho (RB) y el borde izquierdo (LB) para la transformación vegetal mediada por *Agrobacterium*.

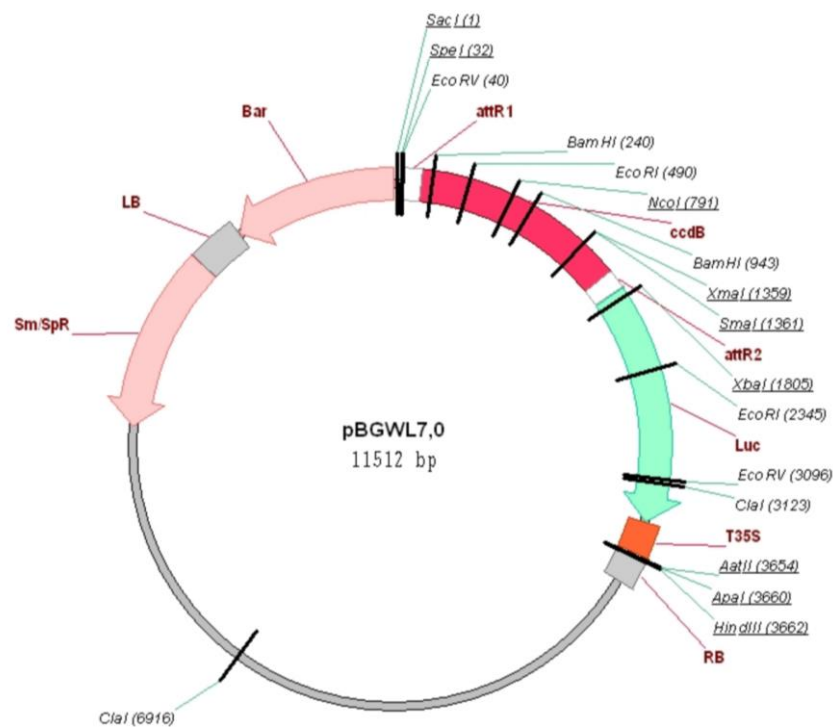


Figura 14. Esquema del vector destino pBGWL7 utilizado en este trabajo.

Concluida las reacciones de recombinación LR se generaron las clonas de expresión: *pDXR::LUC*, *pMCT::LUC*, *pCMK::LUC*, *pMDS::LUC*, *pHDS::LUC*, *pHDR*. En la **figura 15**, se ilustra el sistema de obtención del vector de expresión. Posteriormente 1 μ L de volumen del producto de recombinación LR se transformó en células de *E. coli* cepa DH5 α . Se seleccionaron colonias en medio LB sólido suplementado con espectinomicina 50 μ g/mL.

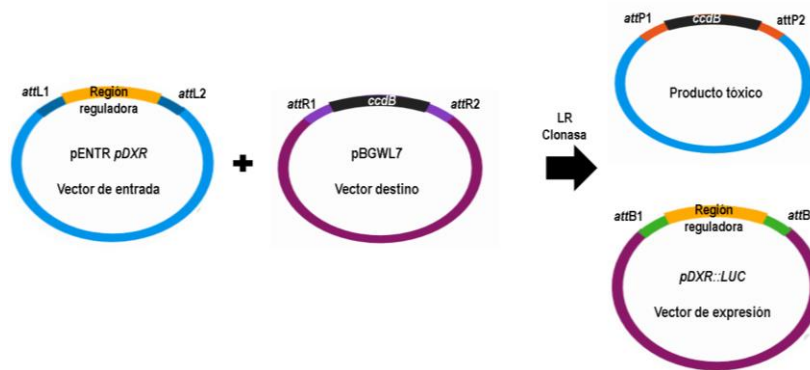


Figura 15. Esquema de los principales componentes presentes en la recombinación LR del sistema Gateway.

Corroboración de clonas por PCR de colonia bacteriana

La corroboración de cada una de las clonas de expresión se realizó por PCR y para ello se escogieron varias colonias como templado, se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada una de las regiones reguladoras clonadas al gen luciferasa. Para ello se diseñó el oligonucleótido reverso LUC-RV 5'-CATAGCTTCTGCCAACCGAACGG-3' sobre la secuencia del gen de la luciferasa con el programa SnapGene® Viewer 4.2.3 y oligonucleótidos delanteros específicos de cada región reguladora. Los oligonucleótidos específicos utilizados en este trabajo se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos delanteros usados para el análisis de los vectores de expresión generados.

Nombre	Secuencia 5'-3'
DXRPROF	GAATTGGAGAGATGGCTACACC
MCTPRO-F	GAAAGCCGTAACCATAAACATGTGACC
CMKPRO-F	AGAAATAAGCTTATACGCAGCGTTGC
ISPFPROF2	CTTCTCTTCTAATTTTCCGGCGATTG
HDSPROF	CTCTGAATCATCTGATCTGACTTGC
HDRPRO-FW	TTGGTAACAGTTGACTTGATCTTGG
LUC-RV	CATAGCTTCTGCCAACCGAACGG

Transformación de *Agrobacterium* C58

Se utilizaron células electrocompetentes de *A. tumefaciens* cepa C58 almacenadas a -70°C (See Lin, 1995), las cuales se transformaron por electroporación con DNA de las clonas de expresión correspondientes. En condiciones de esterilidad las células electrocompetentes se les añade $1\ \mu\text{g}$ de DNA plasmídico purificado. Posteriormente la mezcla de células-plásmido se transfieren a una celda de electroporación fría y se le aplica un pulso de $2.2\ \text{kV}$ con un electroporador MicroPulser de BIO-RAD. Las células transformadas se recuperaron en $1\ \text{mL}$ de medio de cultivo LB líquido sin antibiótico en agitación constante a 37°C durante $3\ \text{h}$. $20\ \mu\text{L}$ y $80\ \mu\text{L}$ de células recuperadas se sembraron en medio de selección LB sólido con espectinomicina $50\ \mu\text{g/mL}$, rifampicina $50\ \mu\text{g/mL}$ y ampicilina $50\ \mu\text{g/mL}$ para obtener colonias transformantes. Las cajas se incubaron a 37°C durante dos días.

Transformación vegetal con *A. tumefaciens* C58

Las colonias positivas de *Agrobacterium* que portan las construcciones de interés se obtuvo un preinóculo de $10\ \text{mL}$ de medio LB líquido con espectinomicina a $50\ \mu\text{g/mL}$, rifampicina a $50\ \mu\text{g/mL}$ y ampicilina a $50\ \mu\text{g/mL}$ en overnight (O.N.) con agitación constante a 30°C .

Posteriormente, en $1\ \text{L}$ de medio LB líquido con espectinomicina a $50\ \mu\text{g/mL}$, rifampicina a $50\ \mu\text{g/mL}$ y ampicilina a $50\ \mu\text{g/mL}$ se inoculó con el preinóculo. Se incubó hasta obtener a una densidad óptica de 0.8 a $600\ \text{nanómetros}$ (Clough y Bent, 1998).

Posteriormente, las células se centrifugaron a $5000\ \text{rpm}$ durante $10\ \text{minutos}$, y se resuspendieron en $1.6\ \text{L}$ de medio de infiltración que contiene 5% de sacarosa y 0.05% del tensioactivo Silwet L-77. Se transformaron 10 plantas de *A. thaliana* de 3 semanas de edad periodo en el que presentaron la mayor cantidad de botones florales cerrados, por cada construcción, crecidas bajo las condiciones descritas anteriormente. La agroinfiltración se llevó a cabo sumergiendo los botones florales en la solución de infiltración durante 3 a 5 segundos con agitación suave. Concluida la infiltración las plantas se colocaron acostadas en una charola limpia de plástico y se cubrieron con un domo el cual se retiró después de aproximadamente 12 a 24 horas y las plantas se colocaron nuevamente en posición vertical. Las plantas infiltradas se mantuvieron en cuarto de crecimiento hasta la obtención de silicuas

que se tornaron marrones y las semillas secas correspondientes a la generación T1 se cosecharon y almacenan en tubos eppendorf a 4°C (Rivero et al., 2014).

Selección de plantas transgénicas homocigotas

Las plantas transformadas con las construcciones *pDXR::LUC*, *pMCT::LUC*, *pCMK::LUC*, *pMDS::LUC*, *pHDS::LUC*, *pHDR::LUC* fueron consideradas la generación T0 se dejaron crecer hasta cosechar las semillas, consideradas como la generación T1. Las semillas T1 se seleccionaron en medio GM 1X suplementado con metionina sulfoximina (MSO) 10 µM/µL, herbicida que es un análogo del glutamato e inhibe la actividad de la glutamina sintasa desencadenando la acumulación tóxica de amonio dentro de la célula vegetal.

A las plántulas T1 que desarrollaron el primer par de hojas verdaderas en presencia de MSO, se les consideró líneas transgénicas independientes, es decir, cada individuo representa un evento diferente de inserción del transgene en el genoma de planta. De esta generación se seleccionan al menos diez plántulas resistentes de cada construcción que se crecen de forma separada en sustrato Metro-Mix 300 como se describió arriba, hasta obtener su semilla, generación T2.

En la generación T2 de cada construcción, se evaluó la segregación de la resistencia al herbicida MSO. Con el análisis de los fenotipos de las plántulas se determinó el número de inserciones del transgene en el genoma de las líneas transgénicas independientes de *A. thaliana*. Para ello se sembraron 100 semillas T2 de las líneas transgénicas independientes obtenidas y 25 semillas silvestres del ecotipo Col-0 como control en medio GM 1X suplementado con MSO 10 µM/µL repitiendo el proceso para cada construcción, con la finalidad de seleccionar plántulas resistentes y registrar el patrón de segregación de la resistencia. Se esperó que los patrones de segregación de la resistencia al herbicida observados se ajustaran a la segregación Mendeliana para un locus 3:1, es decir, que 75 plantas crecieran en presencia del MSO y 25 fueran sensibles y murieran (**Fig. 16**). Se contabilizaron los fenotipos observados y se llevó a cabo la prueba estadística de χ^2 .

Con la siguiente formula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Donde O son el número de plantas observadas en una categoría y E es el número de plantas esperadas en dicha categoría, los grados de libertad (df)=(número de clases-1), $\alpha=0.01$

Con la cual se eligieron las líneas transgénicas independientes, candidatas a portar solo una inserción del transgene. Las cuales se sembraron en sustrato Metro-Mix 300 como se indicó arriba, hasta obtener las semillas que darían lugar a la generación T3.

En la generación T3 se obtuvieron plantas homocigotas y heterocigotas, para seleccionar las líneas homocigotas para el transgene, se seleccionaron 100 semillas de la generación T3 y fueron sembradas en medio GM 1X con MSO 10 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ más un control de 25 semillas silvestres del ecotipo Col-0. Las líneas transgénicas que mostraron un fenotipo resistente en un 100% se consideraron como líneas transgénicas homocigotas y las que mostraron un fenotipo sensible se consideraron heterocigotas.

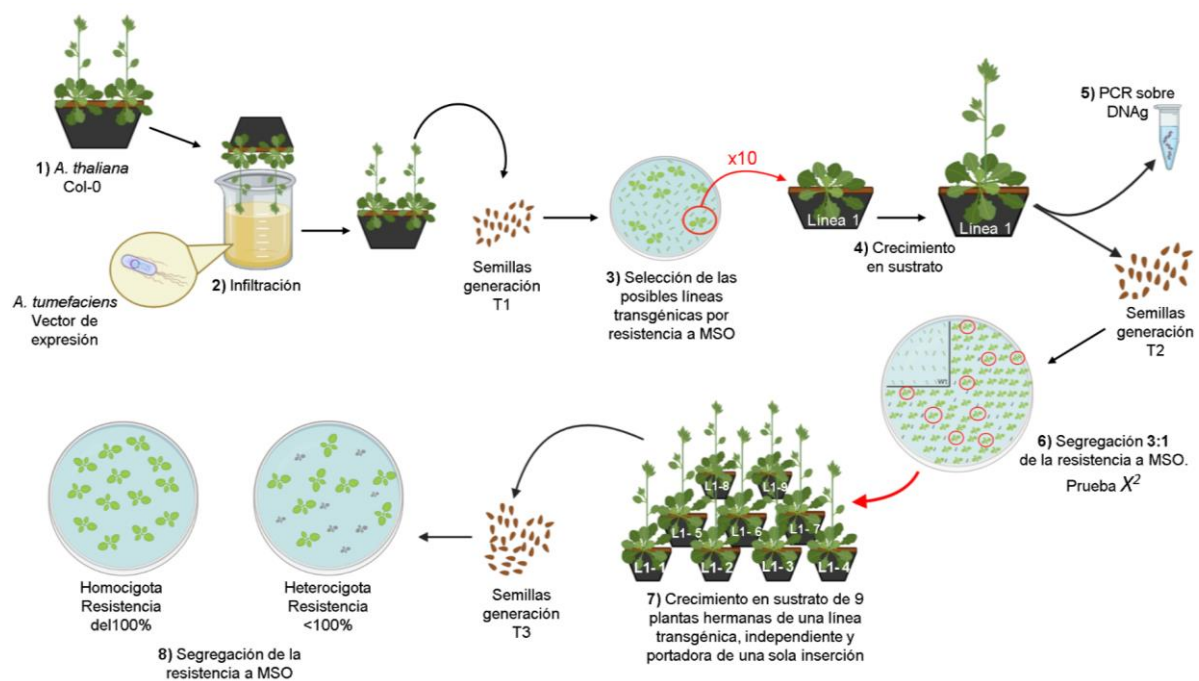


Figura 16. Esquema del proceso de transformación y generación de líneas transgénicas. 1) Se preparan las plantas de *A. thaliana* Col-0 con botones florales cerrados para la transformación, 2) las plantas son sumergidas en medio de infiltración de *A. tumefaciens* transformada con la construcción de interés, se colectan semillas correspondientes a la generación T1 de las cuales 3) se seleccionan al menos 10 de las posibles líneas transgénicas por resistencia a MSO, cada planta representa un evento de transformación diferente. 4) Las plantas T1 crecen en sustrato y de las hojas de la roseta se extrae el DNA genómico para confirmar por 5) PCR sobre DNAg la presencia del

transgene, las semillas obtenidas de estas plantas corresponden a generación T2, 6) con las semillas T2 se evalúa el número de inserciones del transgene en la planta a través de la segregación de la resistencia a MSO y se realiza la prueba estadística X^2 , si corresponde a 3:1 se eligen las plantas y 7) se crecen en sustrato 9 plantas hermanas para cada línea transgénica independiente obtenida (al menos 3 líneas transgénicas portadoras de una sola inserción) y se colectan las semillas correspondientes a la generación T3 donde se obtienen las líneas transgénicas homocigotas evaluando la 8) segregación de la resistencia a MSO.

Reacción de luciferasa y tratamientos

Se esterilizaron y estratificaron semillas de las líneas transgénicas de las construcciones entre 3-4 días en la oscuridad a una temperatura de 4°C. Para estos ensayos se cultivaron las plantas en condiciones de crecimiento en placa en medio GM 1X sin sacarosa. Seis días después de crecimiento bajo fotoperiodo, las plántulas presentaron cotiledones expandidos y dos hojas verdaderas visibles, características adecuadas de acuerdo con Bjornson et al., 2015 para los ensayos de bioluminiscencia. Como control se usaron plántulas de columbia (Col-0) crecidas en la misma placa.

De acuerdo con el protocolo de Bjornson et al., 2015, para reducir el fondo de la señal se aplicó el sustrato luciferina 1 mM (Promega, USA) adicionado con Triton X-100 0.001%, 4 horas antes del registro de la imagen. El sustrato se asperjó aproximadamente a 3 cm por encima de la placa para cada uno de los lados. La bioluminiscencia es resultado de la actividad de la luciferasa que se puede detectar tras la activación de las regiones reguladoras en las líneas transgénicas expresasoras de la luciferasa.

Las imágenes se adquirieron utilizando el equipo In-Vivo Xtrem de Bruker del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del Instituto de Biotecnología (LNMA), de la UNAM. Se utilizó un filtro de 535 nm para la captación de los fotones emitidos por la reacción de la luciferasa, con un tiempo de exposición de 3 minutos.

El procesamiento de las imágenes de bioluminiscencia se realizó a través del programa Molecular Imaging Software "MI" 7.5 win en el LNMA bajo la asesoría de la M. en C. Verónica Rojo León.

Resultados

Obtención de DNA de plásmido de las construcciones pENTR/D-TOPO-región reguladora de los genes DXR

Como se mencionó anteriormente, mi proyecto de tesis forma parte de una iniciativa mayor cuya meta es comprender los mecanismos que modulan la vía MEP en respuesta a señales internas y externas a nivel transcripcional y traduccional.

La delimitación de las regiones reguladoras río arriba del inicio de la transcripción y su clonación en el vector de entrada pENTR/D-TOPO® se realizó previamente en el laboratorio de la Dra. Katayoon Dehesh. Los tamaños de las regiones reguladoras de los genes *DXR*, *MCT*, *CMK*, *MDS*, *HDS* y *HDR* seleccionadas por el grupo de la Dr. Dehesh se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Tamaño de las regiones reguladoras clonadas para generar los vectores de entrada.

Gene	<i>DXR</i>	<i>MCT</i>	<i>CMK</i>	<i>MDS</i>	<i>HDS</i>	<i>HDR</i>
Código de locus (AGI)	At5g62790	At2g02500	At2g26930	At1g63970	At5g60600	At4g34350
Tamaño (bp) de la región reguladora	1256	1346	2035	309	994	891

El DNA plasmídico de estas construcciones se transformó en *E. coli* DH5 alfa y seleccionaron con antibiótico. Se analizaron varias colonias para cada una de las construcciones y su identidad se corroboró por PCR de colonia. En las **figuras 17, 18 y 19** se muestra el análisis por PCR de las colonias para las construcciones usando los oligonucleótidos M13-FW y M13-RV que hibrida en el pENTR/D-TOPO que flanqueado a la región clonada para cada uno de los 6 genes mencionados.

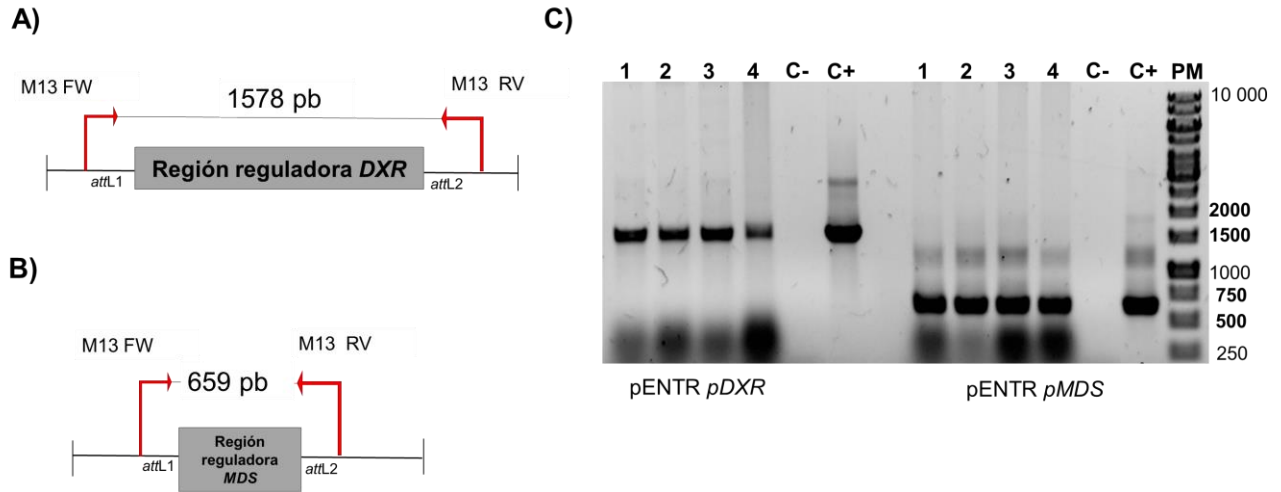


Figura 17. Confirmación de la presencia de pENTR *pDXR* y pENTR *pMDS* en las colonias de *E. coli* DH5 α . **A)** Se muestra el esquema del fragmento amplificado que incluye a la región reguladora de *DXR* y parte del vector de entrada, 1578 pares de bases (pb), también se muestran los sitios de apareamiento de los oligonucleótidos **B)** Se muestra el esquema del fragmento amplificado de la región reguladora de *MDS* y parte del vector de entrada, 659 pb, también se muestran los sitios attL1 y attL2. **C)** Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, donde se muestran los fragmentos correspondientes de pENTR *pDXR* y pENTR *pMDS*. Como control positivo [C+] se utilizó el eluido con el que se transformó. Para el control negativo [C-] no se añadió templado a la reacción.

La región amplificada para la construcción pENTR *pDXR* incluía parte de la secuencia del vector de entrada por ello el tamaño esperado, 1578 pb, era mayor que el tamaño clonado reportado en la tabla 2, se obtuvo el fragmento del peso esperado. De igual manera para la construcción de pENTR *pMDS*, el tamaño esperado del fragmento era de 659 pb y se obtuvo un producto del tamaño esperado (**Fig 17**).

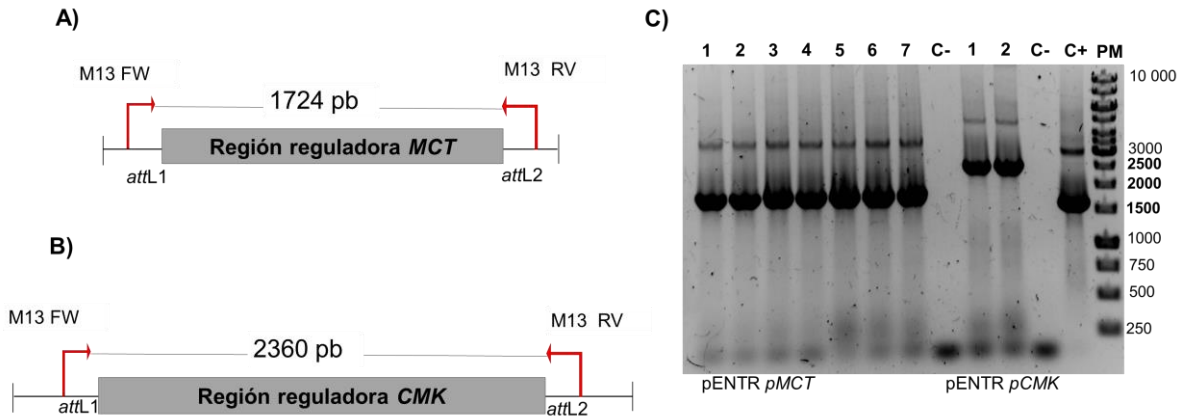


Figura 18. Confirmación de la presencia de pENTR *pMCT* y pENTR *pCMK*, en las colonias de *E. coli* DH5 α . **A)** Se muestra el esquema del fragmento amplificado que incluye a la región reguladora de *MCT* y parte del vector de entrada, 1724 pares de bases (pb), también se muestran los sitios de apareamiento de los oligonucleótidos **B)** Se muestra el esquema del fragmento amplificado de la región reguladora de *CMK* y parte del vector de entrada, 2360 pb, también se muestran los sitios attL1 y attL2. **C)** Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, donde se muestran los fragmentos correspondientes de pENTR *pMCT* y pENTR *pCMK*. Como control positivo [C+] se utilizó el eluido con el que se transformó pENTR *pMCT*. Para el control negativo [C-] no se añadió templado a la reacción.

El fragmento amplificado de la construcción pENTR *pMCT* incluye parte de la secuencia del vector de entrada flanqueando a la región reguladora clonada por ello el tamaño esperado es de 1724 pb, se obtuvo el fragmento del peso esperado. De igual manera para la construcción de pENTR *pCMK*, el tamaño esperado del fragmento era de 2360 pb y se obtuvo un producto del tamaño esperado (**Fig 18**).

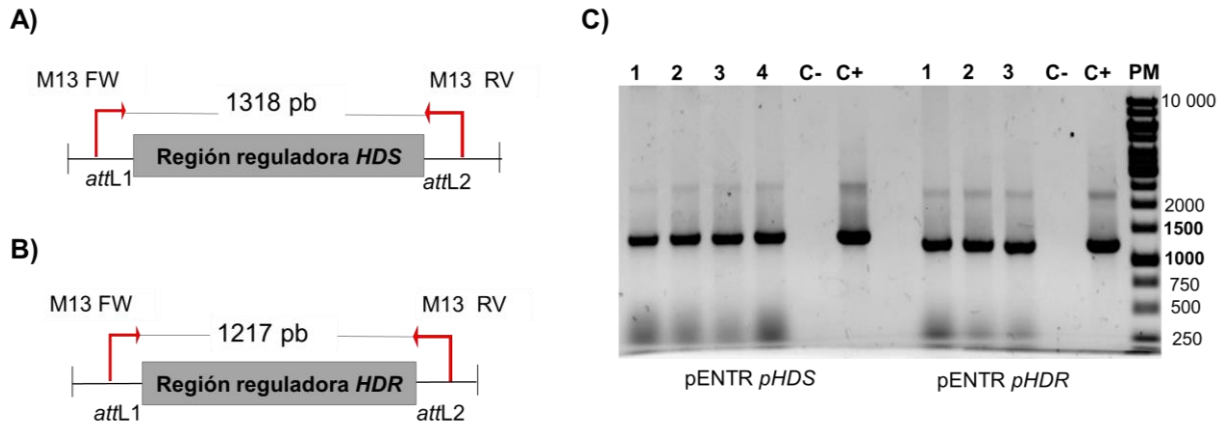


Figura 19. Confirmación de la presencia de pENTR *pHDS* y pENTR *pHDR*, en las colonias de *E. coli* DH5 α . **A)** Se muestra el esquema del fragmento amplificado que incluye a la región reguladora de *HDS* y parte del vector de entrada, 1318 pares de bases (pb), también se muestran los sitios de apareamiento de los oligonucleótidos **B)** Se muestra el esquema del fragmento amplificado de la región reguladora de *HDR* y parte del vector de entrada, 1217 pb, también se muestran los sitios attL1 y attL2. **C)** Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, donde se muestran los fragmentos correspondientes de pENTR *pMCT* y pENTR *pCMK*. Como control positivo [C+] se utilizó el eluido con el que se transformó pENTR *pMCT*. Para el control negativo [C-] no se añadió templado a la reacción.

El tamaño esperado del fragmento amplificado de la construcción pENTR *pHDS* fue de 1318 pb y se obtuvo el fragmento del peso esperado. Para la construcción de pENTR *pHDR*, el tamaño esperado del fragmento fue de 1217 pb y se obtuvo un producto del tamaño esperado (**Fig. 19**).

Resultados de secuenciación

De cada construcción se aislaron al menos dos colonias positivas para cada gen de la vía MEP. Se eligió una colonia de cada construcción para corroborar por secuenciación Sanger su identidad. Los resultados de la secuenciación se usaron para realizar alineamientos múltiples de cada una de las secuencias provenientes de las regiones clonadas contra la secuencia genómica de *A. thaliana* reportada en TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>), con el algoritmo CLUSTAL OMEGA MUSCLE 3.8, mostrado en las **figuras 20, 21, 22, 23, 24 y 25**. También se realizó un breve BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) con los

resultados de secuenciación para confirmar la homología con los genes correspondientes (Anexo 3). Los alineamientos mostraron además de que las regiones reguladoras de cada gen variaban en tamaño como se muestra en la tabla 2, la identidad de las regiones clonadas de los genes *MCT*, *CMK*, *MDS*, *HDS* y *HDR* no mostró cambios en la secuencia. A excepción de la secuencia de la región reguladora de *DXR* la cual presentó dos inserciones de adeninas no reportadas en la secuencia previamente anotada en la base de datos de TAIR (**Fig. 20**). También pudimos notar que no todas las regiones reguladoras clonadas incluyeron la secuencia completa del UTR 5' no traducido reportado en TAIR (tabla 3).

Tabla 3. Estructura de las regiones reguladoras clonadas

Región reguladora	<i>DXR</i>	<i>MCT</i>	<i>CMK</i>	<i>MDS</i>	<i>HDS</i>	<i>HDR</i>
Tamaño (pb)	1256	1346	2035	309	994	891
Cambios en la secuencia reguladora	Inserción de dos adeninas	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
Pares de bases ausentes del UTR 5'	117	28	35	-	8	2

Se analizaron *in silico* los elementos regulatorios presentes en la región reguladora de *DXR* con el programa Plant CARE (Anexo 4) y no se observó que las inserciones previamente mencionadas se situaran en elementos regulatorios importantes, lo cual descartó su relevancia para el estudio transcripcional.

```

PRODXR (TAIR)      CGATAAGGTTAACTTGAATGGAATCGGAATTGGAGAGATGGCTACACCGTAATTATGGT
PRODXR-KD          CGATAAGGTTAACTTGAATGGAATCGGAATTGGAGAGATGGCTACACCGTAATTATGGT
*****
PRODXR (TAIR)      TTTTGTTCCTATTAGTTAACGCATTAATTCAGGCCTCCGATTTCCGATGTTTAAAGAAAAA
PRODXR-KD          TTTTGTTCCTATTAGTTAACGCATTAATTCAGGCCTCCGATTTCCGATGTTTAAAGAAAAA
*****
PRODXR (TAIR)      GTTGCATGCATGACTTGGGATGGAATTTGAGTGGATGCAGCAAGTAACACTTGTTTAACG
PRODXR-KD          GTTGCATGCATGACTTGGGATGGAATTTGAGTGGATGCAGCAAGTAACACTTGTTTAACG
*****
PRODXR (TAIR)      TCTCTTTCACTGTTTTGCCATGTGTCACTTAACGTACAACACTTGTCTCCTCAGATGATCCA
PRODXR-KD          TCTCTTTCACTGTTTTGCCATGTGTCACTTAACGTACAACACTTGTCTCCTCAGATGATCCA
*****
PRODXR (TAIR)      TTAGCAGTAGTAAATGATTTACTGACTCATCTACCAATACCAACATACCATTATCTTACC
PRODXR-KD          TTAGCAGTAGTAAATGATTTACTGACTCATCTACCAATACCAACATACCATTATCTTACC
*****
PRODXR (TAIR)      ATTATCATTATCTATTTGATCTCTGTATCCCCACGAAAACACTATGTAATGTGATAGTCA
PRODXR-KD          ATTATCATTATCTATTTGATCTCTGTATCCCCACGAAAACACTATGTAATGTGATAGTCA
*****
PRODXR (TAIR)      ATCATAACAGCTTAATCACACTTAAATAAAGTAAATATCTTTTTCTTTTTCTTTCTT
PRODXR-KD          ATCATAACAGCTTAATCACACTTAAATAAAGTAAATATCTTTTTCTTTTTCTTTCTT
*****
PRODXR (TAIR)      TTTATGGGATAAATTTTATTCCTTTCCGAAGAAAGAAAAGAGAGCACCATTCAAACAACA
PRODXR-KD          TTTATGGGATAAATTTTATTCCTTTCCGAAGAAAGAAAAGAGAGCACCATTCAAACAACA
*****
PRODXR (TAIR)      ATAATCTTTTTGAACGGATGATCTAATAGTCTACAAGAAGACTAATTTTATTTAAACAAT
PRODXR-KD          ATAATCTTTTTGAACGGATGATCTAATAGTCTACAAGAAGACTAATTTTATTTAAACAAT
*****
PRODXR (TAIR)      CGAACCTAACATGACTCTAATTAGAGATATAGAGAATTATATACGTAAAAAATCAAGTT
PRODXR-KD          CGAACCTAACATGACTCTAATTAGAGATATAGAGAATTATATACGTAAAAAATCAAGTT
*****
PRODXR (TAIR)      GGTAAAGTTACATGGCTTTTGAATTTAAATTTACAATTTGAACATTGAGGAACATATC
PRODXR-KD          GGTAAAGTTACATGGCTTTTGAATTTAAATTTACAATTTGAACATTGAGGAACATATC
*****
PRODXR (TAIR)      AAAGAAATAAGAAATGATAGTAAAAATGTTGACAAAAAAAAGAAATGATAGTAAAAAT
PRODXR-KD          AAAGAAATAAGAAATGATAGTAAAAATGTTGACAAAAAAAAGAAATGATAGTAAAAAT
*****
PRODXR (TAIR)      ATTCAATACATAAATTTTAAAAAGAAAAGTATATATATACTTGTCAAAGATCTAAACTA
PRODXR-KD          ATTCAATACATAAATTTTAAAAAGAAAAGTATATATATACTTGTCAAAGATCTAAACTA
*****
PRODXR (TAIR)      AGTTTGACATTTGGATTATAATTTGTTACAGCATATAACATGTACTTTAT-AAAAAAAAA
PRODXR-KD          AGTTTGACATTTGGATTATAATTTGTTACAGCATATAACATGTACTTTATAAAAAAAAA
*****
PRODXR (TAIR)      AAAAAAGAGAAGAAG-AAAAAAAAAACATGTAACATGTTTATTTTAAAAAAGACAGCA
PRODXR-KD          AAAAAAGAGAAGAAGAAAAAAAAAACATGTAACATGTTTATTTTAAAAAAGACAGCA
*****
PRODXR (TAIR)      TACAACATGTTAGTCAAAACATATTTCAATTTAAGATATTCATATCAAAAATTCATAATC
PRODXR-KD          TACAACATGTTAGTCAAAACATATTTCAATTTAAGATATTCATATCAAAAATTCATAATC
*****
PRODXR (TAIR)      GAACGAATACCATAAACTTTTTCTTTTTTATTTTGTAAAGAGAGAAATCCTTAACCATFAA
PRODXR-KD          GAACGAATACCATAAACTTTTTCTTTTTTATTTTGTAAAGAGAGAAATCCTTAACCATFAA
*****
PRODXR (TAIR)      TCCCTTGTAATGCATATTTCTAATAAATAATTATATTTGACAAAATATATAATTGATGATA
PRODXR-KD          TCCCTTGTAATGCATATTTCTAATAAATAATTATATTTGACAAAATATATAATTGATGATA
*****
PRODXR (TAIR)      CAGATTCTGCTGTTAATACTCTAAAGAAATCAAAATAGAAAATGGGAACATAGTAAGACT
PRODXR-KD          CAGATTCTGCTGTTAATACTCTAAAGAAATCAAAATAGAAAATGGGAACATAGTAAGACT
*****
PRODXR (TAIR)      GGATTATTTACCACCTACAAGTTGTCTGTTACCTTAATAAAAAGGTCCTTGTACTAAATG
PRODXR-KD          GGATTATTTACCACCTACAAGTTGTCTGTTACCTTAATAAAAAGGTCCTTGTACTAAATG
*****
PRODXR (TAIR)      CTCAGCGAAATCTTTAAAAAATGACAAAAATCTGTTGGGTACCATTCAAATCCGATTC
PRODXR-KD          CTCAGCGAAATCTTTAAAAAATGACAAAAATCTGTTGGGTACCATTCAAATCCGATTC
*****
PRODXR (TAIR)      TTTCTTATCATCTCTCTCTCTCACACTGTTTATCTGATTGCTTCTCTCGATAATCA
PRODXR-KD          TTTCTTATCATCTCTCTCTCTCACACTGTTTATCTGATTGCTTCTCTCGATAATCA
*****
PRODXR (TAIR)      AGAGTAGTAGTGGGTTCTCTGAAAAATATTCGATTTTAAAGACTCTGATCATC
PRODXR-KD          AGAGTAGTAGTGGGTTCTCTGAAAAATATTCGATTTTAAAGACTCTGATCATC

```

Figura 20. Inserciones en la región reguladora de *DXR*. Alineamiento con los resultados de la secuenciación de la construcción pENTR *pDXR* que presenta dos inserciones de adeninas contra la secuencia reguladora anotada en TAIR, se muestra el UTR (rojo), la región intergénica (negro) y el inicio de la traducción (azul).

```

PROMCT (TAIR)      CTGCAACAACATGAGTAATTTCCCTTTAGTATACAACCTTTTACAAAAAAGATTCAGAGC
PROMCT-KD          CTGCAACAACATGAGTAATTTCCCTTTAGTATACAACCTTTTACAAAAAAGATTCAGAGC
*****
PROMCT (TAIR)      CAAACCCAAAGAGGGTCTCATAGAAGAAAAGATACAAAAATGACACCTATCTTTTCTGAG
PROMCT-KD          CAAACCCAAAGAGGGTCTCATAGAAGAAAAGATACAAAAATGACACCTATCTTTTCTGAG
*****
PROMCT (TAIR)      TCATTAGTATTAAGCAAAGAACCAACAAACACAGAAATCAGACAAAGCTAATGCTACAC
PROMCT-KD          TCATTAGTATTAAGCAAAGAACCAACAAACACAGAAATCAGACAAAGCTAATGCTACAC
*****
PROMCT (TAIR)      ATTAATCATCACAGATACGTATAGACATTTTGAATTTGATCTGAAAGATAACAGATACTA
PROMCT-KD          ATTAATCATCACAGATACGTATAGACATTTTGAATTTGATCTGAAAGATAACAGATACTA
*****
PROMCT (TAIR)      ATTAGCAATATGCTAATAATAGCTGGTAACTTTTAAAGAGTGACATAAAGATAATCACTG
PROMCT-KD          ATTAGCAATATGCTAATAATAGCTGGTAACTTTTAAAGAGTGACATAAAGATAATCACTG
*****
PROMCT (TAIR)      AAAGCCGTAACCATAAACATGTGACCGATCCAATCCCAATACTTCAGGATTCTAAAAGCC
PROMCT-KD          AAAGCCGTAACCATAAACATGTGACCGATCCAATCCCAATACTTCAGGATTCTAAAAGCC
*****
PROMCT (TAIR)      ATACCATTGTTTTAGTCTCAAAGTGTTTTATTTCAGCTTTGCTCTATACATTACCTCAA
PROMCT-KD          ATACCATTGTTTTAGTCTCAAAGTGTTTTATTTCAGCTTTGCTCTATACATTACCTCAA
*****
PROMCT (TAIR)      GGAATGGATTTCATCTCAAACCTAATACACACATTAGCCATTGACAATAAAGCTTCTAACAT
PROMCT-KD          GGAATGGATTTCATCTCAAACCTAATACACACATTAGCCATTGACAATAAAGCTTCTAACAT
*****
PROMCT (TAIR)      TGAATCACTGAAACTAGACAAAACATGATCTAATCCCAAACCTTGATTCCTAACCATATT
PROMCT-KD          TGAATCACTGAAACTAGACAAAACATGATCTAATCCCAAACCTTGATTCCTAACCATATT
*****
PROMCT (TAIR)      CCTAGATTATATGCACAAATCTTACTCTATCTTCCACAAAACCTTGACTTCAAATCTCATA
PROMCT-KD          CCTAGATTATATGCACAAATCTTACTCTATCTTCCACAAAACCTTGACTTCAAATCTCATA
*****
PROMCT (TAIR)      ACTATTTGTATTAGTCTCAAAGTGTTTTATTTCATCTTTGCTTGAAGGAATGGATTTCATCT
PROMCT-KD          ACTATTTGTATTAGTCTCAAAGTGTTTTATTTCATCTTTGCTTGAAGGAATGGATTTCATCT
*****
PROMCT (TAIR)      CAGACTAATACACATTAGCCATTGACAATAAAGCTTCTAACTTTGAAATTTCAATCACTG
PROMCT-KD          CAGACTAATACACATTAGCCATTGACAATAAAGCTTCTAACTTTGAAATTTCAATCACTG
*****
PROMCT (TAIR)      AAATTAGACAAAAAACATGTACTTTGACTAATCCCAAACCTTGATTCTAACCATATGCAA
PROMCT-KD          AAATTAGACAAAAAACATGTACTTTGACTAATCCCAAACCTTGATTCTAACCATATGCAA
*****
PROMCT (TAIR)      AAATCTTACTCTATCTTCCCAAACGTGACATTCCTAAGAACCTTTGCCAAAGTTTTTGTGTT
PROMCT-KD          AAATCTTACTCTATCTTCCCAAACGTGACATTCCTAAGAACCTTTGCCAAAGTTTTTGTGTT
*****
PROMCT (TAIR)      ATCCAATCTTTCACAGAGAAGTCAAATCGATTTAGGATATAAACCTCCGAGAAGCAAAAC
PROMCT-KD          ATCCAATCTTTCACAGAGAAGTCAAATCGATTTAGGATATAAACCTCCGAGAAGCAAAAC
*****
PROMCT (TAIR)      AAATTCGAGAAGATTTGATTTTTATTTTACCTAATGATTTCTCTCAGTGAGATGGAGCGGG
PROMCT-KD          AAATTCGAGAAGATTTGATTTTTATTTTACCTAATGATTTCTCTCAGTGAGATGGAGCGGG
*****
PROMCT (TAIR)      TTGTTTCTGATGCGATGATTGAGAAGAAGGAGCCATGAGTTTGCTATAGATCTGTTTACC
PROMCT-KD          TTGTTTCTGATGCGATGATTGAGAAGAAGGAGCCATGAGTTTGCTATAGATCTGTTTACC
*****
PROMCT (TAIR)      GACGAGGTA AACGCAGAAGGCCAACACCGATTCCGATACCTGGAAGTGCCTGTCTCAT
PROMCT-KD          GACGAGGTA AACGCAGAAGGCCAACACCGATTCCGATACCTGGAAGTGCCTGTCTCAT
*****
PROMCT (TAIR)      TTGATTCGATAGCATCGGATGCTTCCCTCCACTCATCCCTTCGCCGGAAAAATTCACCGGT
PROMCT-KD          TTGATTCGATAGCATCGGATGCTTCCCTCCACTCATCCCTTCGCCGGAAAAATTCACCGGT
*****
PROMCT (TAIR)      TGTTCCCAACGGTTTCGCATTTCTCCGGTCTTCTCGATTTTTACGTTTTTTCTTTTC
PROMCT-KD          TGTTCCCAACGGTTTCGCATTTCTCCGGTCTTCTCGATTTTTACGTTTTTTCTTTTC
*****
PROMCT (TAIR)      TCTTTAGCTTTGTTGTGTTGTTTACTGTATTGAATTATGGGCCTTATTAAAAGCCATT
PROMCT-KD          TCTTTAGCTTTGTTGTGTTGTTTACTGTATTGAATTATGGGCCTTATTAAAAGCCATT
*****
PROMCT (TAIR)      AGTATTACTGAGTTTTTAAATGGGCCTGATGGGCTTATGTTTTAGTTGGCCTTATATAT
PROMCT-KD          AGTATTACTGAGTTTTTAAATGGGCCTGATGGGCTTATGTTTTAGTTGGCCTTATATAT
*****
PROMCT (TAIR)      ATATTGGTTCTCCGAGGAACCGAGCTTTCTTCTCTCAGGCGAGATAAAACATG
PROMCT-KD          ATATTGGTTCTCCGAGGAACCGAGCTTTCTTCTCTCAGGCGAGATAAAACATG
*****

```

Figura 21. Alineamiento del resultado de la secuenciación de la construcción pENTR *pMCT* contra la secuencia reguladora anotada en la base de datos de TAIR. Se muestra el UTR (rojo), un intrón (morado), exón (naranja), la región intergénica (negro) y el inicio de la traducción (azul).

```

PROCМК (TAIR)      GTGACTTTGGTGTGACTAGAAATAAAGTTGTTATGCTTTTATCTACTGAATATTTTCATTG
PROCМК-KD          GTGACTTTGGTGTGACTAGAAATAAAGTTGTTATGCTTTTATCTACTGAATATTTTCATTG
*
PROCМК (TAIR)      ACAAGGATTGAGATTTCTCAAGTGTGAGAAATTTTCGTPAATCGAGTAGTTCATATGCAT
PROCМК-KD          ACAAGGATTGAGATTTCTCAAGTGTGAGAAATTTTCGTPAATCGAGTAGTTCATATGCAT
*
PROCМК (TAIR)      CAACCATATGATACGGATATTCATAGGTGTATCAACTTTTCACATACAAAAATGTATA
PROCМК-KD          CAACCATATGATACGGATATTCATAGGTGTATCAACTTTTCACATACAAAAATGTATA
*
PROCМК (TAIR)      ATTTAGGTGCATACTTAGAGATAGTAACATAAATATATATTGTTAAGATGTCAAAAATAT
PROCМК-KD          ATTTAGGTGCATACTTAGAGATAGTAACATAAATATATATTGTTAAGATGTCAAAAATAT
*
PROCМК (TAIR)      AATTTTAGTTATTTTACCAATATAAGTTCAAACACAACCACATATTTGCAAGAAATGCCA
PROCМК-KD          AATTTTAGTTATTTTACCAATATAAGTTCAAACACAACCACATATTTGCAAGAAATGCCA
*
PROCМК (TAIR)      TCGTAACCAAATACAAAATCTTTTAAAAATCTTAACTTATTCAAAATGAAAACATATTT
PROCМК-KD          TCGTAACCAAATACAAAATCTTTTAAAAATCTTAACTTATTCAAAATGAAAACATATTT
*
PROCМК (TAIR)      CTATATACAATGAACAAAATCTTCTCAAATATCTAAGGCTCTCACCGGTGCAACATTTAG
PROCМК-KD          CTATATACAATGAACAAAATCTTCTCAAATATCTAAGGCTCTCACCGGTGCAACATTTAG
*
PROCМК (TAIR)      AAGAAAAAATTTCTGTCAAATCTTCTTAAACTCACAGGAGAGAGTAATTATCTTTTTC
PROCМК-KD          AAGAAAAAATTTCTGTCAAATCTTCTTAAACTCACAGGAGAGAGTAATTATCTTTTTC
*
PROCМК (TAIR)      ATTTTCTTTCTATCAAAGCAAGTATTTTTTTAGAACAAAAGCTTCTACTTCAAATGG
PROCМК-KD          ATTTTCTTTCTATCAAAGCAAGTATTTTTTTAGAACAAAAGCTTCTACTTCAAATGG
*
PROCМК (TAIR)      TGGAAAGAAAACATATTACTTTTCTTTGTTGAAATCTAAAGAATTCAATTGAAAAGATTT
PROCМК-KD          TGGAAAGAAAACATATTACTTTTCTTTGTTGAAATCTAAAGAATTCAATTGAAAAGATTT
*
PROCМК (TAIR)      TCTTCTAAATATTGCACATCATACCTTAAGTTCATCCACATAAAAAACCTTTTAATAAA
PROCМК-KD          TCTTCTAAATATTGCACATCATACCTTAAGTTCATCCACATAAAAAACCTTTTAATAAA
*
PROCМК (TAIR)      AATAATACATTTATTTCACATTCAGGCCGTCTCCACGAAAATGAAAGGTAAAGTAAATGTT
PROCМК-KD          AATAATACATTTATTTCACATTCAGGCCGTCTCCACGAAAATGAAAGGTAAAGTAAATGTT
*
PROCМК (TAIR)      ATGGGTCTATAATCAATTTTTTGTATAAGATTAAGTGTATGATAAAAAACGAATAAGAT
PROCМК-KD          ATGGGTCTATAATCAATTTTTTGTATAAGATTAAGTGTATGATAAAAAACGAATAAGAT
*
PROCМК (TAIR)      TTATTTCTTTATCATAGGAAAGACAAAAAACATAAAATAAATATATAGACCTCCACAAA
PROCМК-KD          TTATTTCTTTATCATAGGAAAGACAAAAAACATAAAATAAATATATAGACCTCCACAAA
*
PROCМК (TAIR)      AAAGGATATTACGGGTCTGATGGTTGTCTACTTAGCGCAAGAGTTGAAAAAATACAAA
PROCМК-KD          AAAGGATATTACGGGTCTGATGGTTGTCTACTTAGCGCAAGAGTTGAAAAAATACAAA
*
PROCМК (TAIR)      GAAGTCTAAAAAGACCGAAAGCTTAAATAAAAGTAAAACTACAATAAAAAACGAACATCG
PROCМК-KD          GAAGTCTAAAAAGACCGAAAGCTTAAATAAAAGTAAAACTACAATAAAAAACGAACATCG
*
PROCМК (TAIR)      AAAAAACAAGCGAAAAACTCAACAAACAAGATTCAAGAAGAAAACACTGATGGCGAAC
PROCМК-KD          AAAAAACAAGCGAAAAACTCAACAAACAAGATTCAAGAAGAAAACACTGATGGCGAAC
*
PROCМК (TAIR)      TACGAAGCACAAAAATTTGCATGATTTTTCAACTCCAAGAGTTTGAGTCTCATCGTTG
PROCМК-KD          TACGAAGCACAAAAATTTGCATGATTTTTCAACTCCAAGAGTTTGAGTCTCATCGTTG
*
PROCМК (TAIR)      TTGCAACGAACAATCCCAAACCTAGGCCAGTCTTCAAATCGATATGATAGAGACGCTTAC
PROCМК-KD          TTGCAACGAACAATCCCAAACCTAGGCCAGTCTTCAAATCGATATGATAGAGACGCTTAC
*
PROCМК (TAIR)      AGCTTCTCTAAAGGTTAAAGCAAAAATTTGGGACAAAATAAGTGGACTTAATCATGCAATG
PROCМК-KD          AGCTTCTCTAAAGGTTAAAGCAAAAATTTGGGACAAAATAAGTGGACTTAATCATGCAATG
*
PROCМК (TAIR)      CAATATAGAAGATAAGAACAATTTTTGAATAATAACAAGAAAATGCATCATTTTTAGTAA
PROCМК-KD          CAATATAGAAGATAAGAACAATTTTTGAATAATAACAAGAAAATGCATCATTTTTAGTAA
*
PROCМК (TAIR)      TTCATACAAATGAAGGTTAACCAAGATATCTTCCAAATCCTCACACTTTATGATTTCTTA
PROCМК-KD          TTCATACAAATGAAGGTTAACCAAGATATCTTCCAAATCCTCACACTTTATGATTTCTTA
*
PROCМК (TAIR)      AAATCTTACCATTGACCAATATGAATTTTAAAGGGCAACTTTCTCAAGTGATTTATGGGAT
PROCМК-KD          AAATCTTACCATTGACCAATATGAATTTTAAAGGGCAACTTTCTCAAGTGATTTATGGGAT
*
PROCМК (TAIR)      ACAAGTAGTCTTGTGTTGAAATGAACGCTCTTCATAAGAGGATAGTCTTTTTATCAAAAATG
PROCМК-KD          ACAAGTAGTCTTGTGTTGAAATGAACGCTCTTCATAAGAGGATAGTCTTTTTATCAAAAATG
*
PROCМК (TAIR)      ATTACACATTTCTGAAAATTAATTTTATGTTTCAGAGACTTCTGCATATTGATGAAAAAC
PROCМК-KD          ATTACACATTTCTGAAAATTAATTTTATGTTTCAGAGACTTCTGCATATTGATGAAAAAC
*
PROCМК (TAIR)      CTTTAGCAATGTATGGACATTTTACACTTGAGTGTTCAGTGAAGAAGAGTATCAACGG
PROCМК-KD          CTTTAGCAATGTATGGACATTTTACACTTGAGTGTTCAGTGAAGAAGAGTATCAACGG
*
PROCМК (TAIR)      TAGATTTCAATAAAAAATCCACTCAACTTTATCAAAGCTTTGCTAATATCTTAATTTAAA
PROCМК-KD          TAGATTTCAATAAAAAATCCACTCAACTTTATCAAAGCTTTGCTAATATCTTAATTTAAA
*
PROCМК (TAIR)      TGCCACAGAAGATTGGGTAGCTTTTGTAGTATGCTCTGAATGCACCAATTTGCGATATCA
PROCМК-KD          TGCCACAGAAGATTGGGTAGCTTTTGTAGTATGCTCTGAATGCACCAATTTGCGATATCA
*
PROCМК (TAIR)      ACATACTATTAGTAATCAATCTACAAAAATAGAAACAGACTGAAGTTTATGAAATATAC
PROCМК-KD          ACATACTATTAGTAATCAATCTACAAAAATAGAAACAGACTGAAGTTTATGAAATATAC
*
PROCМК (TAIR)      AAATGAGCTTAGAAAATAAGCTTATACGCAGCCTTGCATAAGCTTATCATCCATAATCTA
PROCМК-KD          AAATGAGCTTAGAAAATAAGCTTATACGCAGCCTTGCATAAGCTTATCATCCATAATCTA
*
PROCМК (TAIR)      TAACCCCAATTGAAGCATCAGTTTGGAGATTAATAAGAGAAAAGAGATTAGGCCAAATTGG
PROCМК-KD          TAACCCCAATTGAAGCATCAGTTTGGAGATTAATAAGAGAAAAGAGATTAGGCCAAATTGG
*
PROCМК (TAIR)      TAAAGGATAGTTATTGTAGTTGACTAATTGAATGTCTACCTAAAAGTGCCCAATGTGAT
PROCМК-KD          TAAAGGATAGTTATTGTAGTTGACTAATTGAATGTCTACCTAAAAGTGCCCAATGTGAT
*
PROCМК (TAIR)      AGAGATGAAAAAATGTGCTATGGGGCAATTTCTCTATACAAAAACATTTTGTATTTTTTG
PROCМК-KD          AGAGATGAAAAAATGTGCTATGGGGCAATTTCTCTATACAAAAACATTTTGTATTTTTTG
*
PROCМК (TAIR)      TTAGAATTGGGCTGATTTTAAAAAATAAAAAATAGGTTGACATATCAGATCAAAGAG
PROCМК-KD          TTAGAATTGGGCTGATTTTAAAAAATAAAAAATAGGTTGACATATCAGATCAAAGAG
*
PROCМК (TAIR)      AAAAAATAAGGTAGGAAGAAACAACAACAATG
PROCМК-KD          AAAAAATAAGGTAGGAAGAAACAACAACAATG

```

Figura 22. Alineamiento del resultado de la secuenciación de la construcción pENTR *pCMK* contra la secuencia reguladora anotada en la base de datos de TAIR. Se muestra el UTR (rojo), la región intergénica (negro) y el inicio de la traducción (azul).

```

PROMDS (TAIR)      CTTCTCTTCTAATTTTCCGGCGATTGAATGGAGACAATGCGTCGCCGTTTTTCAAAGCG
PROMDS-KD          CTTCTCTTCTAATTTTCCGGCGATTGAATGGAGACAATGCGTCGCCGTTTTTCAAAGCG
*****
PROMDS (TAIR)      GTGCGGAAGAGAAGAGTGGGCGAGGAAGTTTAGAGAACTGGAACAGAAAACCTAAAGCG
PROMDS-KD          GTGCGGAAGAGAAGAGTGGGCGAGGAAGTTTAGAGAACTGGAACAGAAAACCTAAAGCG
*****
PROMDS (TAIR)      AAGAAGTGATGAGTAAACTCCTCTACACGTGGTCTTTAGTAACTTCAGTGGATATGTA
PROMDS-KD          AAGAAGTGATGAGTAAACTCCTCTACACGTGGTCTTTAGTAACTTCAGTGGATATGTA
*****
PROMDS (TAIR)      ACATGATCGACGGTCGAGAGTTTATCATATTTTAAATGGGCTTTAGGAAGGAAAGGCCA
PROMDS-KD          ACATGATCGACGGTCGAGAGTTTATCATATTTTAAATGGGCTTTAGGAAGGAAAGGCCA
*****
PROMDS (TAIR)      ATAAAGAAATGAATATTTCCACCACAGAATTATGAATTGAGTAAACCAGAAAATCGAAGA
PROMDS-KD          ATAAAGAAATGAATATTTCCACCACAGAATTATGAATTGAGTAAACCAGAAAATCGAAGA
*****
PROMDS (TAIR)      AGAACGGCAATG
PROMDS-KD          AGAACGGCA---
*****

```

Figura 23. Alineamiento del resultado de la secuenciación de la construcción pENTR *pMDS* contra la secuencia reguladora anotada en la base de datos de TAIR. Se muestra el UTR (rojo), la región intergénica (negro) y el inicio de la traducción (azul).

```

PROHDS (TAIR)      CTCTGAATCATCTGATCTGACTTGCAAAAATTTGAGGTTTTGCTTTGGTTCCTACTAAAT
PROHDS-KD          CTCTGAATCATCTGATCTGACTTGCAAAAATTTGAGGTTTTGCTTTGGTTCCTACTAAAT
*****
PROHDS (TAIR)      TTTTGATATTGGGTTAAGATATGTTTGTGTTTTAGTGCAATACGAGAAGATTGTTAGTGTT
PROHDS-KD          TTTTGATATTGGGTTAAGATATGTTTGTGTTTTAGTGCAATACGAGAAGATTGTTAGTGTT
*****
PROHDS (TAIR)      GAGGGGGTATGCTAATGCTACCTCCCATTCCCATGGTACGCATGTGTAATTTGAAGAAAC
PROHDS-KD          GAGGGGGTATGCTAATGCTACCTCCCATTCCCATGGTACGCATGTGTAATTTGAAGAAAC
*****
PROHDS (TAIR)      TTGGTGGACATTTGTAATTTTACTTAAGTTTCTTATTATTGCTCCATTTGGAATTA
PROHDS-KD          TTGGTGGACATTTGTAATTTTACTTAAGTTTCTTATTATTGCTCCATTTGGAATTA
*****
PROHDS (TAIR)      AACTTTGTTGTAATCTTATTA AAAAATATCAAATATTAGTGGAATTTTCCCTATTTTT
PROHDS-KD          AACTTTGTTGTAATCTTATTA AAAAATATCAAATATTAGTGGAATTTTCCCTATTTTT
*****
PROHDS (TAIR)      AAGAACAATATTTGTTGTATCCATATTCCTTTTCTATAAAGGTGTCAATTTTTCAATAGA
PROHDS-KD          AAGAACAATATTTGTTGTATCCATATTCCTTTTCTATAAAGGTGTCAATTTTTCAATAGA
*****
PROHDS (TAIR)      GGAAAATCTCATTAATTTTGTATATAGGGGTCAAAGTTGAAGAAAAGGATAAATAGAGG
PROHDS-KD          GGAAAATCTCATTAATTTTGTATATAGGGGTCAAAGTTGAAGAAAAGGATAAATAGAGG
*****
PROHDS (TAIR)      ACCTCAAATTTTCATTTCCACGTATCCGTGCTCAATTTTATCCACTTCTGCTAAAC
PROHDS-KD          ACCTCAAATTTTCATTTCCACGTATCCGTGCTCAATTTTATCCACTTCTGCTAAAC
*****
PROHDS (TAIR)      ATTTGGACTATAAATGCTGGTTGGTCTTGGCTGTTGTTGCAACACTTGTGCTAAAC
PROHDS-KD          ATTTGGACTATAAATGCTGGTTGGTCTTGGCTGTTGTTGCAACACTTGTGCTAAAC
*****
PROHDS (TAIR)      GTTTTATCCTGAGTTTCTTTCACCATCCAGCTTCATTTGTGAAAATCGTCAATCCCTCT
PROHDS-KD          GTTTTATCCTGAGTTTCTTTCACCATCCAGCTTCATTTGTGAAAATCGTCAATCCCTCT
*****
PROHDS (TAIR)      CAACTCTTCTCACCCTAATTTCTTCTCCTCTGGAACATTCTTCTCTATTTTGGATT
PROHDS-KD          CAACTCTTCTCACCCTAATTTCTTCTCCTCTGGAACATTCTTCTCTATTTTGGATT
*****
PROHDS (TAIR)      CCCTTGGCCTCAACACTGGTTTCTCAATTGCATGATCTTGGCTCGTCTTCAGGTAAGTT
PROHDS-KD          CCCTTGGCCTCAACACTGGTTTCTCAATTGCATGATCTTGGCTCGTCTTCAGGTAAGTT
*****
PROHDS (TAIR)      GTTTCATACCTTAGAGAATCTCAAATTTGGTTCCTGGGCTGGTTGATTAGTTTCTGTGT
PROHDS-KD          GTTTCATACCTTAGAGAATCTCAAATTTGGTTCCTGGGCTGGTTGATTAGTTTCTGTGT
*****
PROHDS (TAIR)      TATTTCAAGGGGGAACGAAGACAATTTAGCTGGGTAATTTCTGGGTTTTCGCGAATTTTGG
PROHDS-KD          TATTTCAAGGGGGAACGAAGACAATTTAGCTGGGTAATTTCTGGGTTTTCGCGAATTTTGG
*****
PROHDS (TAIR)      TTGATTTTTCGCTCAGAATCAGAATTTGAAGCTAAAAGAGTTCTGCTTTGATTATCCAA
PROHDS-KD          TTGATTTTTCGCTCAGAATCAGAATTTGAAGCTAAAAGAGTTCTGCTTTGATTATCCAA
*****
PROHDS (TAIR)      TTGCCATGATCTTTCACAGTAACCAAAATGGATTTATGAAGAATATCAAATTCAGCTAAT
PROHDS-KD          TTGCCATGATCTTTCACAGTAACCAAAATGGATTTATGAAGAATATCAAATTCAGCTAAT
*****
PROHDS (TAIR)      TTTGCTCTGTGCCTATGCAGTTACTTTGATTCACCTGAGAAAATG
PROHDS-KD          TTTGCTCTGTGCCTATGCAGTTACTTTGATTCAC-----
*****

```

Figura 24. Alineamiento del resultado de la secuenciación de la construcción pENTR *pHDS* contra la secuencia reguladora anotada en la base de datos de TAIR. Se muestra el UTR (rojo), un intrón (morado), la región intergénica (negro) y el inicio de la traducción (azul).

```

PROHDR (TAIR)      CTAACTCTTATGGAATTGGTAACAGTTGACTTGATCTTGGCATAAACTAGCTTAAGAGTT
PROHDR-KD         CTAACTCTTATGGAATTGGTAACAGTTGACTTGATCTTGGCATAAACTAGCTTAAGAGTT
*****

PROHDR (TAIR)      AAGGGGGCTTGT TTTGTTATAACATATGGGCCTATAAAAAGCAGCCGCATTTCTTAAGCCC
PROHDR-KD         AAGGGGGCTTGT TTTGTTATAACATATGGGCCTATAAAAAGCAGCCGCATTTCTTAAGCCC
*****

PROHDR (TAIR)      ATGTGATTTTCTTACATCTACAAGTCTCTGTTTTTTTTTTTTTTTATTACAGTCTTAACGGAT
PROHDR-KD         ATGTGATTTTCTTACATCTACAAGTCTCTGTTTTTTTTTTTTTTTATTACAGTCTTAACGGAT
*****

PROHDR (TAIR)      TACTTTTGTCCAAATCATTTAAGATCAGCAGACTTATTGCCTGTGACGATTATCAATTCA
PROHDR-KD         TACTTTTGTCCAAATCATTTAAGATCAGCAGACTTATTGCCTGTGACGATTATCAATTCA
*****

PROHDR (TAIR)      TTCTATATTTTTTCCTTGT TTTGTACGACACTTAACCTATCCAATGATTTGCACACACAAA
PROHDR-KD         TTCTATATTTTTTCCTTGT TTTGTACGACACTTAACCTATCCAATGATTTGCACACACAAA
*****

PROHDR (TAIR)      AAAAAAAAAACCCTATCCAATGACTACATTTTCTATGTATGTATGTTATGTCAATGAAA
PROHDR-KD         AAAAAAAAAACCCTATCCAATGACTACATTTTCTATGTATGTATGTTATGTCAATGAAA
*****

PROHDR (TAIR)      AATATGCCATTCTCAAAAATGAATATCTTGT TTTTATTACAATTTTATTAATATCCAT
PROHDR-KD         AATATGCCATTCTCAAAAATGAATATCTTGT TTTTATTACAATTTTATTAATATCCAT
*****

PROHDR (TAIR)      GATACATGTGTAGTTGACAAGGTGACAACCTCAGAATCTTATATTCACACCAATCACACAT
PROHDR-KD         GATACATGTGTAGTTGACAAGGTGACAACCTCAGAATCTTATATTCACACCAATCACACAT
*****

PROHDR (TAIR)      CATTAAGAAAAGAGTTTAAACCATAAATTTGCGACTTCAAGAGACTTTCAC TTTTCGCGAC
PROHDR-KD         CATTAAGAAAAGAGTTTAAACCATAAATTTGCGACTTCAAGAGACTTTCAC TTTTCGCGAC
*****

PROHDR (TAIR)      CCAATTTTTTTTTTTTTTTGTGGCGTAGGTACGCTCTTTTAGTAGGATGTCTCTTCCCATTA
PROHDR-KD         CCAATTTTTTTTTTTTTTTGTGGCGTAGGTACGCTCTTTTAGTAGGATGTCTCTTCCCATTA
*****

PROHDR (TAIR)      TTTTCTCACCAAATATGAAATCAAATCCATAAAAAAATAAGACATAAAAAATTACACA
PROHDR-KD         TTTTCTCACCAAATATGAAATCAAATCCATAAAAAAATAAGACATAAAAAATTACACA
*****

PROHDR (TAIR)      TGTCCAATTCCAAGTGGTTCGTTGCATTTTACACTAATTCCCAAATACATTTTCCTTGTC
PROHDR-KD         TGTCCAATTCCAAGTGGTTCGTTGCATTTTACACTAATTCCCAAATACATTTTCCTTGTC
*****

PROHDR (TAIR)      ATTATCCAAAACATATTAATTCAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTGACATCTCTATTTTTTTT
PROHDR-KD         ATTATCCAAAACATATTAATTCAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTGACATCTCTATTTTTTTT
*****

PROHDR (TAIR)      TTTTATTATAAATGTGGAAGAGGCTCTGAGATAACTCGTGACCAAAATCGTCCATTGAA
PROHDR-KD         TTTTATTATAAATGTGGAAGAGGCTCTGAGATAACTCGTGACCAAAATCGTCCATTGAA
*****

PROHDR (TAIR)      GTGAACAGTCAGCATCGTTTTGCTTGCTTGTGCGTTTTCTCTCGAACTCTCTCCATG
PROHDR-KD         GTGAACAGTCAGCATCGTTTTGCTTGCTTGTGCGTTTTCTCTCGAACTCTCTCTCT-----

```

Figura 25. Alineamiento del resultado de la secuenciación de la construcción pENTR *pHDR* contra la secuencia reguladora anotada en la base de datos de TAIR. Se muestra el UTR (rojo), la región intergénica (negro) y el inicio de la traducción (azul).

Obtención de las construcciones *pDXR::LUC*, *pMCT::LUC*, *pCMK::LUC*, *pMDS::LUC*, *pHDS::LUC* y *pHDR::LUC*.

Con el objetivo de generar las construcciones que porten la región reguladora de los genes de la vía MEP descritos anteriormente con el reportero de la luciferasa, se realizó una recombinación con los vectores de entrada previamente secuenciados con el vector destino pBGWL7 empleando las condiciones descritas para la tecnología Gateway (ver Materiales y métodos).

Tras la reacción de recombinación, se transformó en *E. Coli* DH5 α y se analizaron varias colonias de cada una de las transformaciones con las distintas construcciones cuya identidad posteriormente se confirmó por PCR de colonia. En las **figuras 26, 27, 28, 29** y **30** se muestran los resultados del análisis de las construcciones generadas en el vector pBGWL7 de varias colonias por PCR empleando los oligonucleótidos anverso específicos (tabla 1) para cada gen y el oligonucleótido reverso utilizados respectivamente. Estos resultados del PCR en colonia mostraron que al menos se aislaron dos colonias portadoras de los vectores de expresión para cada gen de la vía MEP.

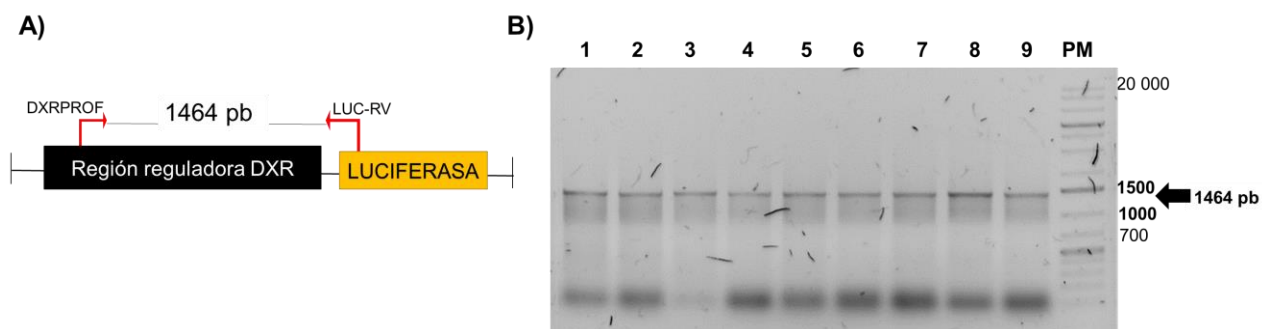


Figura 26. Confirmación de la presencia *pDXR::LUC* en las colonias de *E. coli* DH5 α . **A)** Se muestra el esquema del fragmento amplificado que incluye a la región reguladora de *DXR* y parte del gen de la luciferasa, 1464 pb, también se muestran los sitios de apareamiento de los oligonucleótidos. **B)** Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, donde se muestra los fragmentos correspondientes a *pDXR::LUC*.

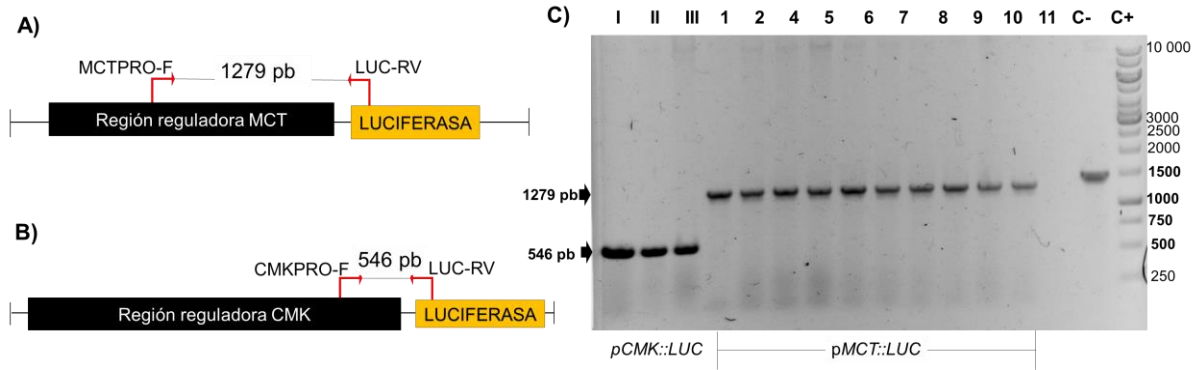


Figura 27. Confirmación de la presencia de *pMCT::LUC* y *pCMK::LUC* en las colonias de *E. coli* DH5 α . **A)** Se muestra el esquema del fragmento amplificado que incluye a la región reguladora de *MCT* y parte del gen de la luciferasa, 1279 pb también se muestran los sitios de apareamiento de los oligonucleótidos **B)** Se muestra el esquema del fragmento amplificado de la región reguladora de *CMK* y parte del gen de la luciferasa, 546 pb, también se muestran los sitios de apareamiento de los oligonucleótidos. **C)** Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, donde se muestran los fragmentos correspondientes de *pCMK::LUC* y *pMCT::LUC*. Como control positivo [C+] se utilizó el DNA plasmídico pENTR *pMCT*. Para el control negativo [C-] no se añadió templado a la reacción.

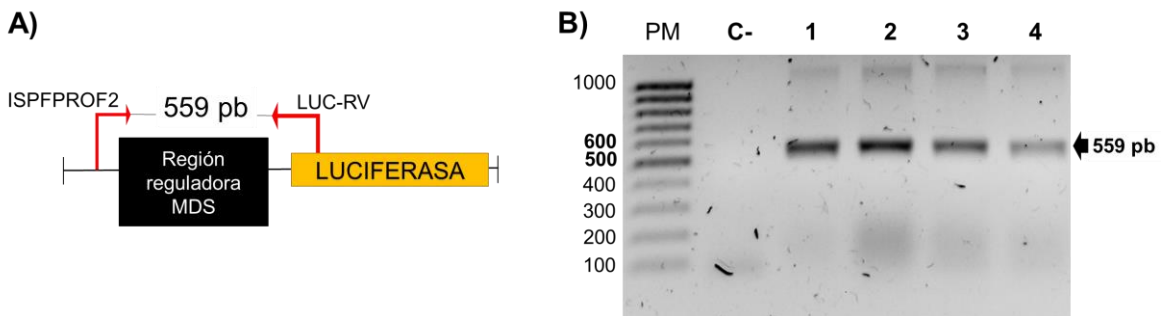


Figura 28. Confirmación de la presencia de *pMDS::LUC* en las colonias de *E. coli* DH5 α . **A)** Se muestra el esquema del fragmento amplificado que incluye a la región reguladora de *MDS* y parte del gen de la luciferasa, 559 pb, también se muestran los sitios de apareamiento de los oligonucleótidos **B)** Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, donde se muestran los fragmentos correspondientes de *pMDS::LUC*. Como control negativo [C-] no se añadió templado a la reacción.

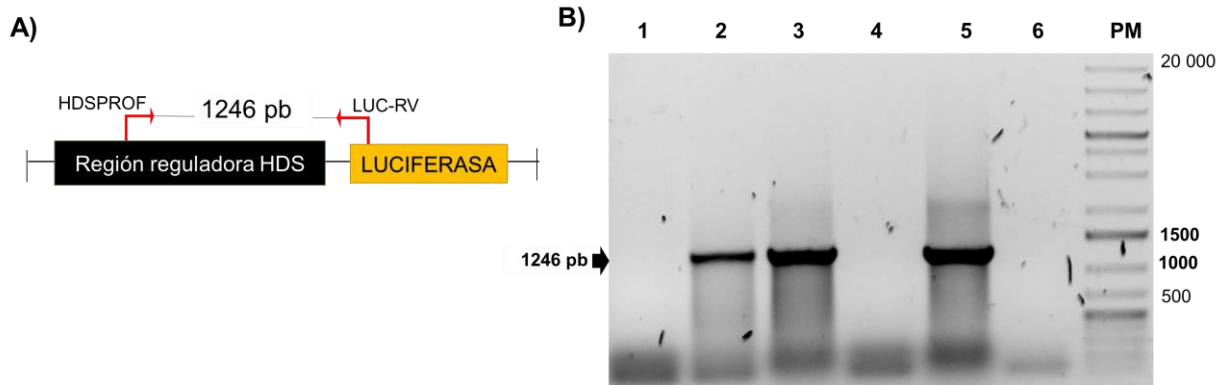


Figura 29. Confirmación de la presencia de *pHDS::LUC* en las colonias de *E. coli* DH5 α . **A)** Se muestra el esquema del fragmento amplificado que incluye a la región reguladora de *HDS* y parte del gen de la luciferasa, 1246 pb, también se muestran los sitios de apareamiento de los oligonucleótidos **B)** Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, donde se muestran los fragmentos correspondientes de *pHDS::LUC*.

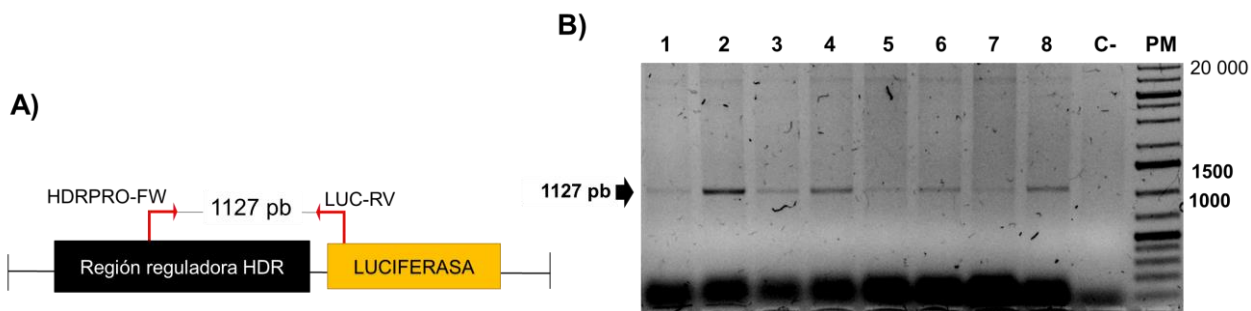


Figura 30. Confirmación de la presencia de *pHDR::LUC* en las colonias de *E. coli* DH5 α . **A)** Se muestra el esquema del fragmento amplificado que incluye a la región reguladora de *HDR* y parte del gen de la luciferasa, 1127 pb, también se muestran los sitios de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados. **B)** Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, donde se muestran los fragmentos correspondientes de *pHDR::LUC*. Como control negativo [C-] no se añadió templado a la reacción.

Obtención de las líneas de *Arabidopsis* portadoras de las construcciones generadas

Para obtener las líneas de *A. thaliana* portadoras de las fusiones transcripcionales, se transformó el DNA plasmídico de cada una de las construcciones provenientes de las colonias confirmadas por PCR en la cepa C58 de *A. Tumefaciens*. Las clonas positivas se corroboraron

por PCR en colonia (Figs. 31, 32, 33, 34, 35, y 36) empleando un oligonucleótido 5'-específico para cada construcción y otro general diseñado sobre la secuencia del gen de luciferasa en la cadena complementaria (Tabla 1).

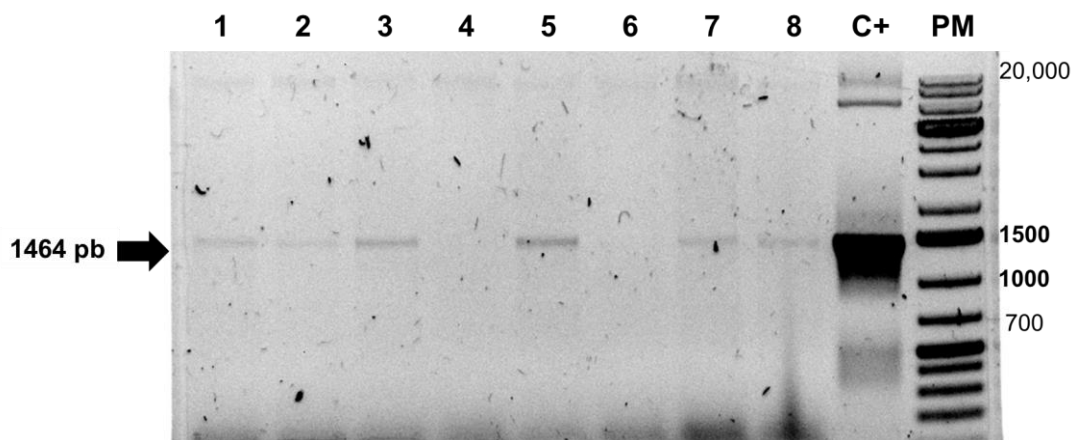


Figura 31. Confirmación de la presencia de *pDXR::LUC* en las colonias de *Agrobacterium tumefaciens* C58. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, se muestran el fragmento amplificado, 1464 pb, correspondiente a *pDXR*. Como control positivo [C+] se utilizó el eluido con el que se transformó. Para el control negativo [C-] no se añadió templado a la reacción.

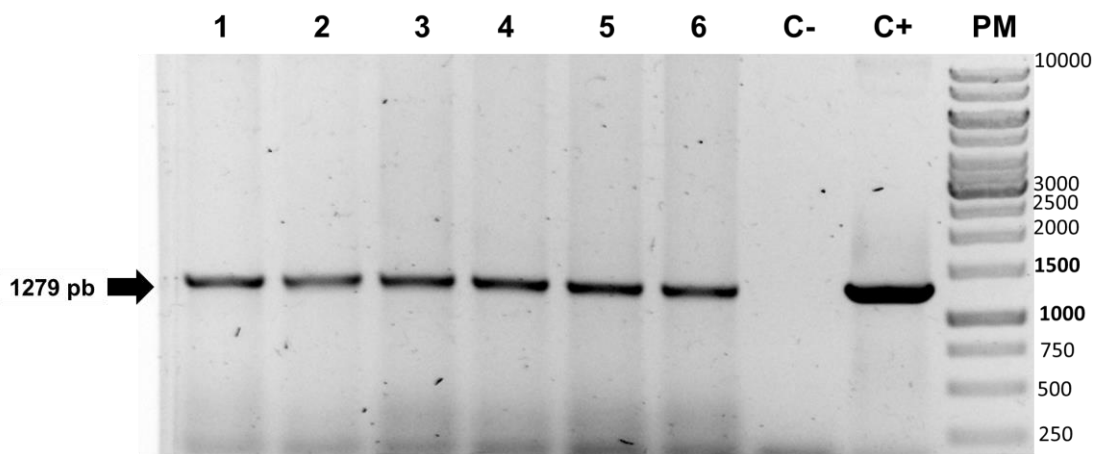


Figura 32. Confirmación de la presencia de *pMCT::LUC* en las colonias de *Agrobacterium tumefaciens* C58. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, se muestran el fragmento amplificado, 1279 pb, correspondiente a *pMCT::LUC*. Como control positivo [C+] se utilizó el eluido con el que se transformó. Para el control negativo [C-] no se añadió templado a la reacción.

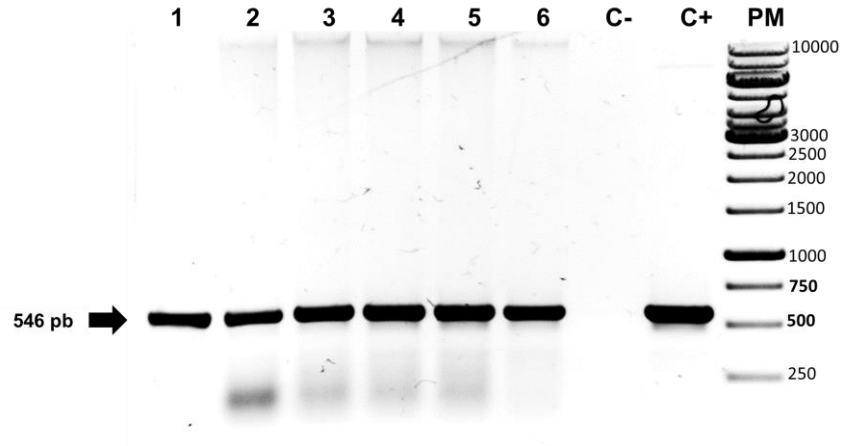


Figura 33. Confirmación de la presencia de *pCMK::LUC* en las colonias de *Agrobacterium tumefaciens* C58. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, se muestran el fragmento amplificado, 620 pb, correspondiente a *pCMK::LUC*. Como control positivo [C+] se utilizó el eluido con el que se transformó. Para el control negativo [C-] no se añadió templado a la reacción.

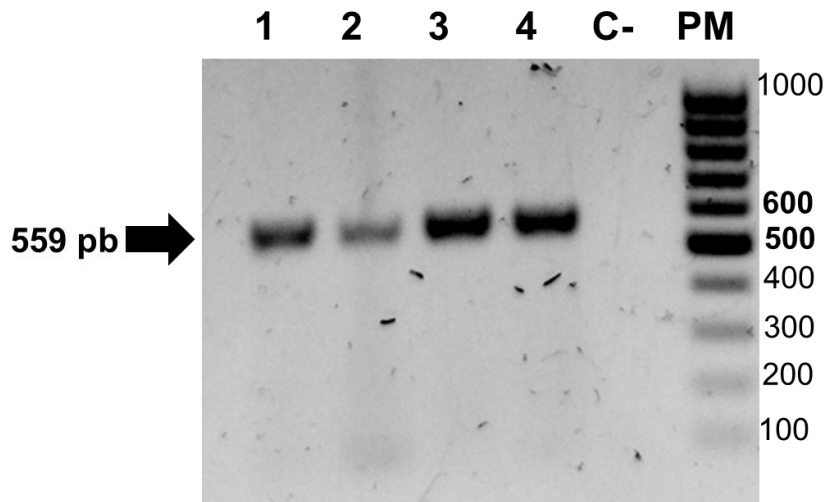


Figura 34. Confirmación de la presencia de *pMDS::LUC* en las colonias de *Agrobacterium tumefaciens* C58. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, se muestran el fragmento amplificado, 559 pb, correspondiente a *pMDS::LUC*. Como control positivo [C+] se utilizó el eluido con el que se transformó. Para el control negativo [C-] no se añadió templado a la reacción.

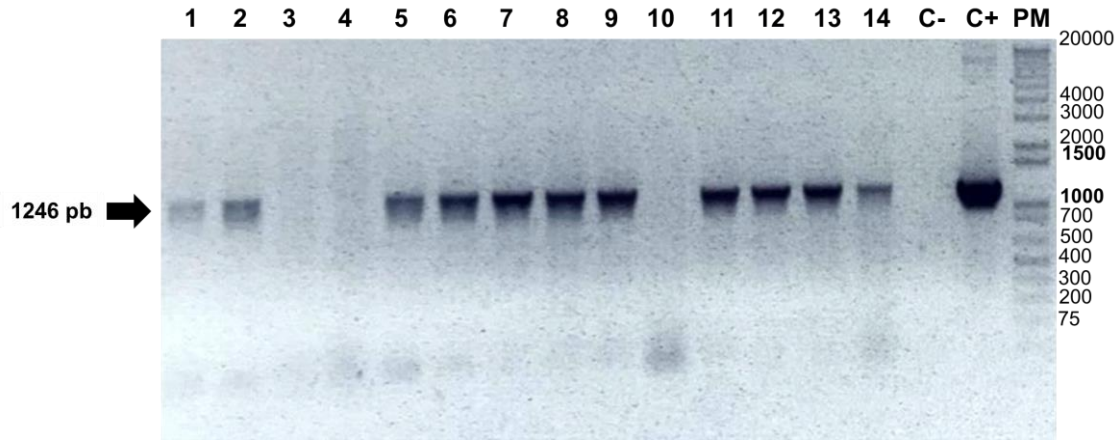


Figura 35. Confirmación de la presencia de *pHDS::LUC* en las colonias de *Agrobacterium tumefaciens* C58. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, se muestran el fragmento amplificado, 1246 pb, correspondiente a *pHDS::LUC*. Como control positivo [C+] se utilizó el eluido con el que se transformó. Para el control negativo [C-] no se añadió templado a la reacción.

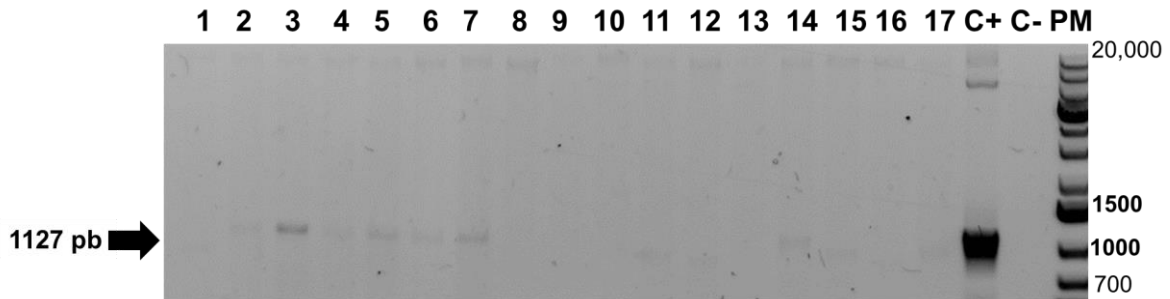


Figura 36. Confirmación de la presencia de *pHDR::LUC* en las colonias de *Agrobacterium tumefaciens* C58. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, se muestran el fragmento amplificado, 1127 pb, correspondiente a pBGWL7 *pHDR::LUC*. Como control positivo [C+] se utilizó el eluido con el que se transformó. Para el control negativo [C-] no se añadió templado a la reacción.

Estos resultados demostraron la identidad e integridad de las colonias positivas para cada una de las construcciones. Se eligió una colonia de cada construcción para transformar plantas de *A. thaliana* por agroinfiltración.

Selección de líneas transgénicas homocigotas

Para cada construcción se transformaron 15 plantas de *Arabidopsis Col-0* las cuales fueron crecidas en sustrato y se cosecharon las semillas correspondientes a la generación T1 a la que se les llamó posibles líneas transgénicas. Se seleccionaron plántulas T1 resistentes al herbicida MSO, a la que se les llamó posibles líneas transgénicas, con las cuales posteriormente se corroboró molecularmente la presencia del transgene para cada construcción. Para ello se colectaron tres hojas de la roseta para extraer el DNA genómico (DNAg) con el protocolo CTAB (Anexo 2). El fragmento amplificado por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada construcción incluyó parte de las secuencias reguladoras y parte de la secuencia del gen de la luciferasa (tabla 1) (ver Anexo 5). Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% de los productos de PCR y se verificó el tamaño esperado de la banda. Las muestras de DNA genómico que no se amplificaron fueron descartadas y las que si amplificaron el transgene fueron consideradas líneas transgénicas independientes que si habían integrado el transgene al genoma de la planta. De esta manera se confirmaron al menos diez líneas transgénicas independientes para cada construcción y se crecieron hasta obtener las semillas correspondientes a la generación T2.

En las plántulas T2 se evaluó el número de inserciones del transgene en el genoma de las líneas a través del análisis estadístico con la prueba estadística X^2 de la segregación de la resistencia a MSO (Tabla 4, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7, Tabla 8, Tabla 9) . Sólo de aquellas líneas que presentaron una segregación del 75% de la resistencia a MSO (Anexo 6), lo que indica la presencia de una inserción única del transgene de interés, se tomaron 9 plántulas. Las líneas seleccionadas para cada construcción se muestran en la Tabla 10, y se crecieron en sustrato hasta obtener las semillas que darían lugar a la generación T3.

Tabla 4. Segregación de líneas reporteras *pDXR::LUC*

Línea	Fenotipo	Observados	Esperados	Xi² P > 0.05
DXR L1	Sensible	29	25	0.355611061
	Resistente	71	75	
DXR L2	Sensible	21	25	0.355611061
	Resistente	79	75	
DXR L.4	Sensible	4	23.75	0.0000029
	Resistente	91	71.25	
DXR L.5	Sensible	28	24.75	0.450647185
	Resistente	71	74.25	
DXR L.6	Sensible	24	23.25	0.857462442
	Resistente	69	69.75	
DXR L.7	Sensible	25	25.25	0.95418793
	Resistente	76	75.75	
DXR L.8	Sensible	12	23.25	0.007058332
	Resistente	81	69.75	
DXR L.9	Sensible	22	24	0.637351888
	Resistente	74	72	

Tabla 5. Segregación de líneas reporteras *pMCT::LUC*

Línea	Fenotipo	Observados	Esperados	Xi² P > 0.05
MCT L.2	Sensible	24	22.5	0.715000655
	Resistente	66	67.5	

Tabla 6. Segregación de líneas reporteras *pCMK::LUC*

Línea	Fenotipo	Observados	Esperados	Xi² P > 0.05
CMK L.1	Sensible	31	23.5	0.074022543
	Resistente	63	70.5	
CMK L.2	Sensible	25	21.25	0.347558037
	Resistente	60	63.75	
CMK L.3	Sensible	28	23	0.228644262
	Resistente	64	69	

Tabla 7. Segregación de líneas reporteras *pMDS::LUC*

Línea	Fenotipo	Observados	Esperados	Xi ² P > 0.05
MDS L.8	Sensible	29	24	0.238592829
	Resistente	67	72	
MDS L.9	Sensible	22	23.25	0.764678982
	Resistente	71	69.75	
MDS L.10	Sensible	12	24	0.004841482
	Resistente	83	71.25	

Tabla 8. Segregación de líneas reporteras *pHDS::LUC*

Línea	Fenotipo	Observados	Esperados	Xi ² P > 0.05
HDS L.1	Sensible	20	25	0.248213079
	Resistente	80	75	
HDS L.2	Sensible	30	25	0.248213079
	Resistente	70	75	
HDS L.3	Sensible	34	29.5	0.323765421
	Resistente	66	70.5	
HDS L.4	Sensible	44	25	0.000011
	Resistente	56	75	
HDS L.6	Sensible	50	23.5	0.0000000008
	Resistente	52	76.5	
HDS L.7	Sensible	27	29.5	0.36777894
	Resistente	64	70.5	
HDS L.8	Sensible	47	25	0.000000376
	Resistente	53	75	

Tabla 9. Segregación de líneas reporteras *pHDR::LUC*

Línea	Fenotipo	Observados	Esperados	χ^2 P > 0.05
HDR L1	Sensible	29	24.75	0.32391722
	Resistente	70	74.25	
HDR L2	Sensible	44	25	0.000011
	Resistente	56	75	
HDR L3	Sensible	26	13.75	0.000136379
	Resistente	29	41.25	
HDR L.4	Sensible	46	22	0.00000005
	Resistente	51	66	
HDR L.5	Sensible	26	24	0.637351888
	Resistente	70	72	
HDR L.6	Sensible	29	24.25	0.265365115
	Resistente	68	72.75	
HDR L.7	Sensible	24	24.75	0.861804433
	Resistente	75	74.25	
HDR L.9	Sensible	28	24.25	0.379230195
	Resistente	69	72.75	
HDR L.10	Sensible	10	23.75	0.001122325
	Resistente	85	71.25	
HDR L.11	Sensible	22	25	0.488422317
	Resistente	78	75	
HDR L.12	Sensible	6	25	0.000011
	Resistente	94	75	
HDR L.13	Sensible	18	23.25	0.208667788
	Resistente	75	69.75	
HDR L.14	Sensible	0	25	0.000000008
	Resistente	100	75	

Tabla 10. Líneas transgénicas generadas en este trabajo

Construcción	Líneas			
<i>pDXR::LUC</i>	L 1	L 2	L 5	
<i>pMCT::LUC</i>	L 2			
<i>pCMK::LUC</i>	L 2	L 3		
<i>pMDS::LUC</i>	L 8	L 9		
<i>pHDS::LUC</i>	L 1	L 2	L 3	L 7
<i>pHDR::LUC</i>	L 1	L 5	L 6	

En las plántulas T3 de cada línea transgénica independiente con una sola inserción, se determinó por resistencia a MSO el estado homocigoto o heterocigoto de cada línea (Anexo 7). Las líneas transgénicas homocigotas determinadas en este trabajo se muestran en la tabla 11. El siguiente paso fue llevar a cabo los análisis de expresión en por lo menos tres líneas homocigotas de cada construcción y seleccionar la línea representativa, sin embargo debido a los límites de tiempo sólo se pudo disponer de tres líneas homocigotas independientes para *pHDS::LUC* y una combinación de líneas homocigotas y heterocigotas para el resto de las construcciones en las que se llevaron a cabo los análisis de bioluminiscencia .

Tabla 11. Líneas transgénicas homocigotas generadas en este trabajo

	Construcciones					
	<i>pDXR::LUC</i>	<i>pMCT::LUC</i>	<i>pCMK::LUC</i>	<i>pMDS::LUC</i>	<i>pHDS::LUC</i>	<i>pHDR::LUC</i>
Líneas	L1-2	L2-1	L2-5	L8-1	L2-1	L1-2
homocigotas	L2-5		L3-1	L9-1	L3-1	L5-7
	L5-3				L7-3	L6-2

Análisis bioluminiscente

Con el objetivo de entender de maneja global y sencilla la dinámica de expresión de los genes de la vía MEP bajo diferentes estímulos, se utilizó el sistema luciferasa. Por lo cual el siguiente paso fue establecer las condiciones para la detección de la bioluminiscencia en las líneas transgénicas generadas en este trabajo. Para ello se analizó *in planta* la bioluminiscencia de las plantas transgénicas, donde se probaron las construcciones más avanzadas en el proceso de selección y se probaron diferentes líneas de la misma

construcción las cuales se esperó que tuvieran un patrón de expresión semejante y con ello determinar el tiempo en el que la bioluminiscencia fuera mayor.

En el análisis se utilizaron plántulas de 30 d las tres líneas homocigotas de *pHDS::LUC* y una línea homocigota de *pDXR::LUC* y una línea homocigota de *pHDR::LUC* el sustrato de luciferina se asperjó y se hicieron cuatro registros de la actividad de la luciferasa, a las 0 horas luego a las 3 h, 6 h y 9 h (Figura 37).

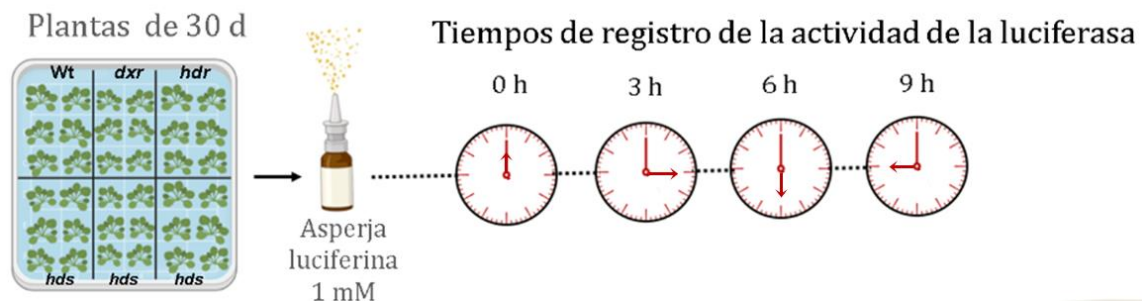


Figura 37. Ensayo preliminar para establecer el sistema de bioluminiscencia.

Observamos la expresión de la luciferasa en la línea transgénica *pHDR::LUC* L1-2 a las 3 h y 6 h. Las líneas trasgénicas de *pHDS::LUC* L2-1, L7-3 mostraron la expresión de la luciferasa en los cuatro tiempos. Inicialmente al tiempo 0 h no se observó expresión en la línea homocigota 3-1 de *pHDS::LUC*, pero a medida que transcurrió el tiempo la bioluminiscencia pudo ser detectada por lo que el patrón de expresión fue similar en las tres líneas analizadas de *HDS*. No observamos bioluminiscencia en L1-2 *pDXR::LUC*. Comparando los patrones de expresión entre las construcciones se determinó que los tiempos donde se obtuvo mayor resolución en la bioluminiscencia fue entre las 3 h y 6 h, por esta razón el registro posterior de la señal se llevó a cabo 4 h después de asperjar el sustrato. Es importante denotar que en este ensayo observamos variabilidad en la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas (**Fig. 38**).

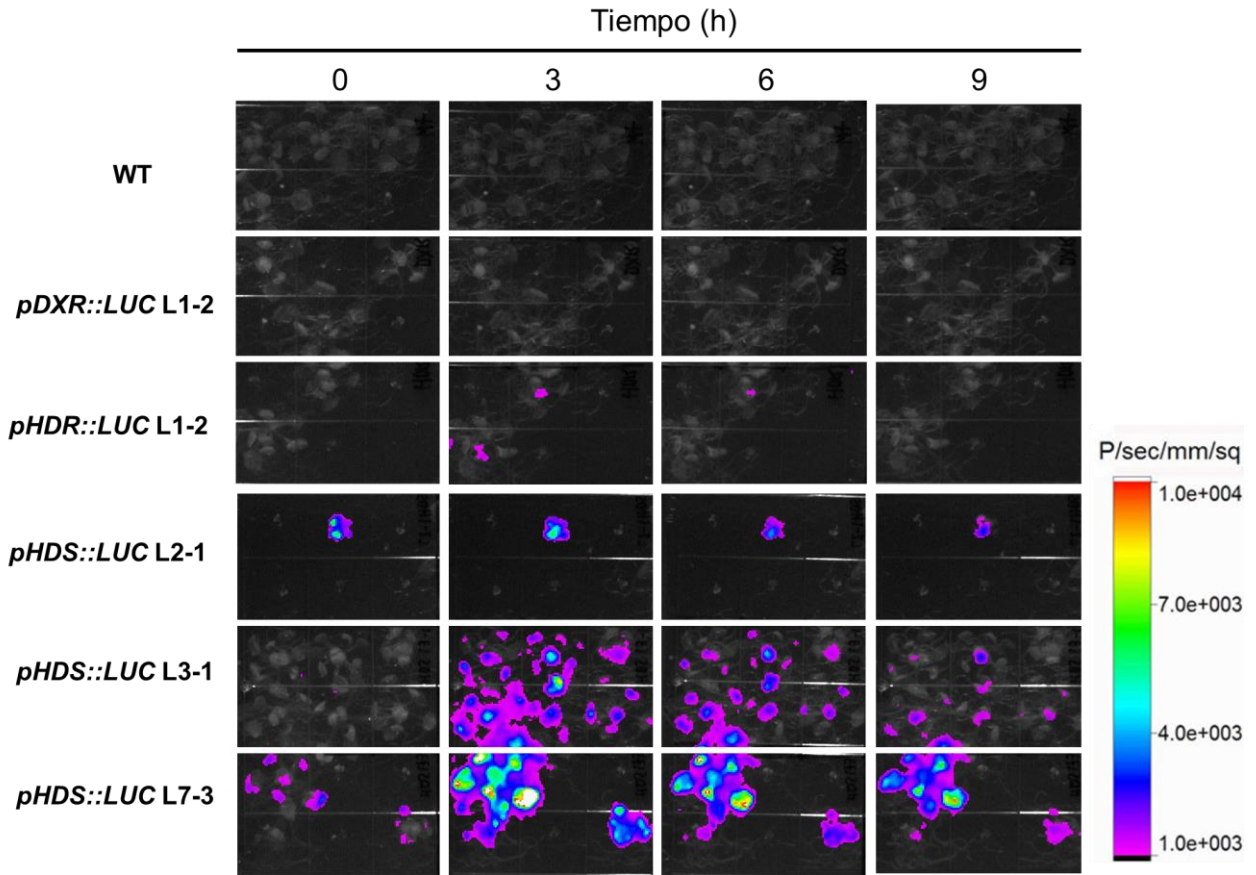


Figura 38. Imágenes de bioluminiscencia de líneas transgénicas homocigotas expresoras de las construcciones *pDXR::LUC*, *pHDR::LUC* y *pHDS::LUC* respectivamente. Se observan plantas transgénicas de 30 d de la línea 1-2 de *DXR*, línea 1-2 de *HDR*, y la línea 2-1 , línea 3-1 , línea 7-3 de *HDS*. Fueron asperjadas con solución de luciferina 1 mM (Promega, USA) 4 horas antes de la adquisición de la imagen. Plantas de Col-0 se usaron como control silvestre (WT).

Con los datos obtenidos de este primer ensayo se estandarizó el tiempo adecuado para la detección de la bioluminiscencia a las 4 horas después de asperjar y se realizó un segundo ensayo de bioluminiscencia con plántulas de 12 d de tres de las líneas homocigotas de *pHDS::LUC* y debido al tiempo requerido para obtener todas las líneas homocigotas, el análisis se llevó a cabo con tres o menos líneas en su condición homocigotas y heterocigotas de *pDXR::LUC*, *pMCT::LUC*, *pCMK::LUC*, *pMDS::LUC* y *pHDR::LUC*, para reducir la variabilidad observada en el primer ensayo crecimos una población inicial de plántulas de cada construcción y seleccionamos cuatro plántulas con los cotiledones extendidos y raíces

largas las cuales transferimos en una misma caja para observar al mismo tiempo *in vivo* la expresión de todos los genes (**Fig. 39**).

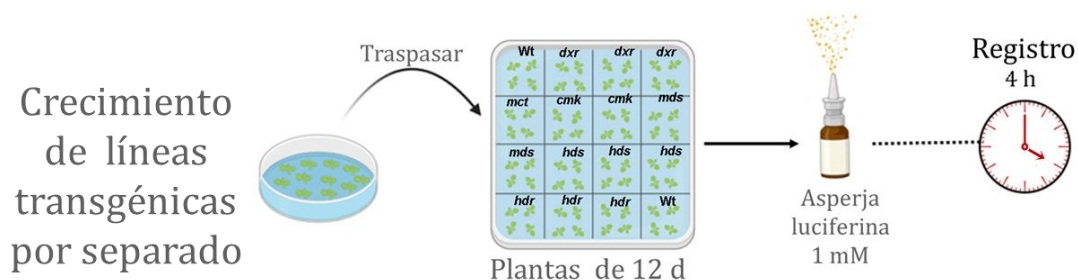


Figura 39. Ensayo de bioluminiscencia *in vivo* de las líneas transgénicas generadas.

Como se puede apreciar en la figura 40, la expresión de *HDS* se observa en las tres líneas transgénicas 2, 3 y 7 *pHDS::LUC* como lo registrado en el primer ensayo. Sin embargo observamos la variabilidad de en la expresión de la luciferasa entre las individuos de una misma línea como en el caso de L2-1 y L3-1de *pHDS::LUC* en el que no todas las plantas crecidas presentan bioluminiscencia. A pesar de que todos los individuos de la L7-3 de *pHDS::LUC* presentan bioluminiscencia observamos variabilidad en la intensidad de la bioluminiscencia entre las plántulas. También es evidente la ausencia de la bioluminiscencia en las líneas de *pDXR::LUC*, *pMCT::LUC*, *pCMK::LUC*, *pMDS::LUC*, tampoco observamos expresión en las líneas de *pHDR::LUC* y de forma particular en L1-2 en contraste con el primer ensayo.

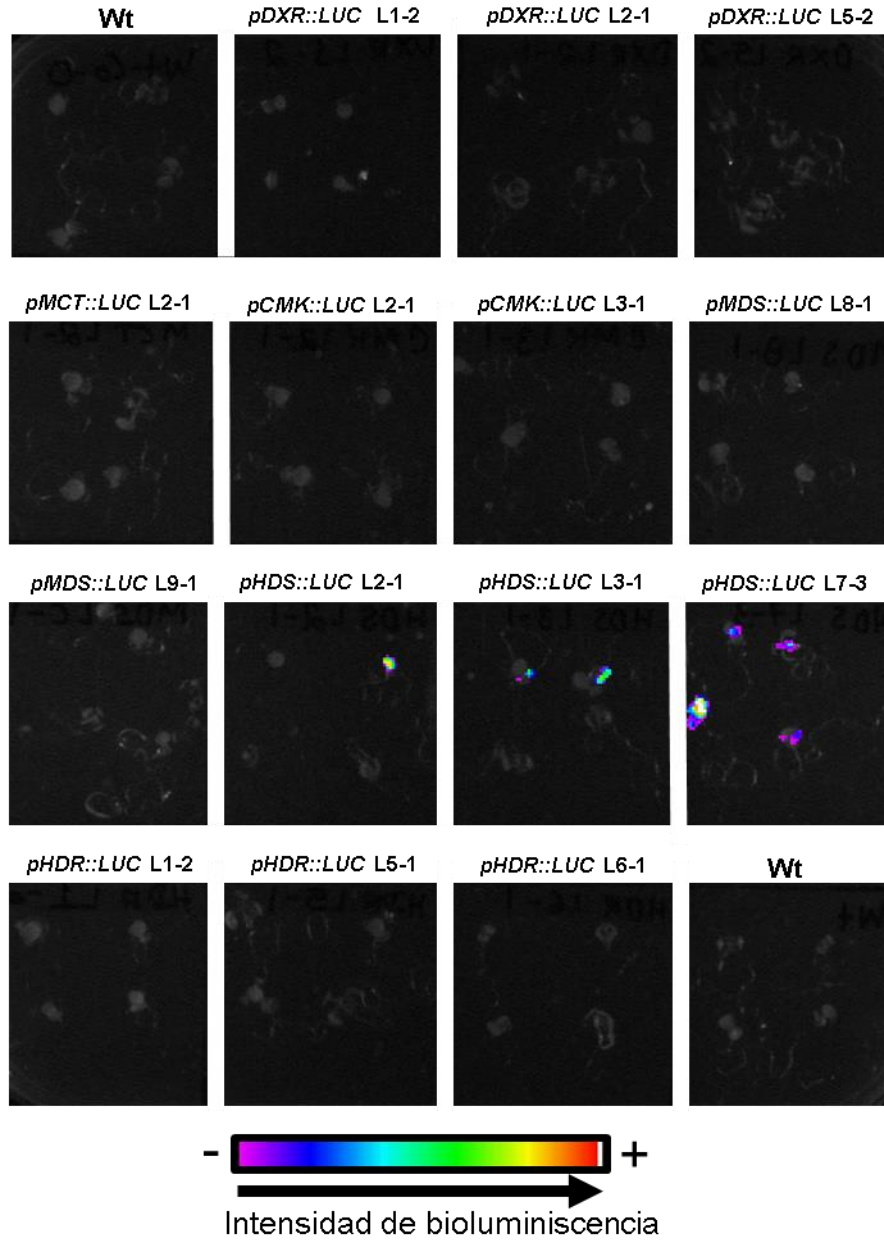


Figura 40. Análisis bioluminiscente de líneas transgénicas homocigotas y heterocigotas expresoras de las construcciones *pDXR::LUC*, *pMCT::LUC*, *pCMK::LUC*, *pMDS::LUC*, *pHDS::LUC* y *pHDR::LUC*. Se observan plantas de 12 d de *A. thaliana* de la línea 1-2 (homocigota), la línea 2-1 (heterocigota) y la línea 5-2 (heterocigota) de *DXR*. La línea 2-1 (homocigota) de *MCT*. La línea 2-1 (heterocigota) y la línea 3-1 (homocigota) de *CMK*. La línea 8-1 (homocigota) y la línea 9-1 (homocigota) de *MDS*. La línea 2-1 (homocigota), línea 3-1 (homocigota), y la línea 7-3 (homocigota) de *HDS*. La línea 1-2 (homocigota), línea 5-1 (heterocigota), y la línea 6-1 (heterocigota) de *HDR*. Fueron asperjadas con solución de

luciferina 1 Mm (Promega, USA) 4 horas antes de la adquisición de la imagen. Plantas de Col-0 se usaron como control silvestre (WT).

Discusión

La vía MEP es una vía biosintética esencial en el metabolismo de las plantas y responde a estímulos de diversa naturaleza; los genes de la vía se expresan en estadíos tempranos del desarrollo, en respuesta a luz y a ciclo circadiano. Con base a los datos generados por Northern Blot, los cuales reportan la expresión de los genes de la vía MEP en plántulas de *Arabidopsis* de 8 d (Córdoba et al., 2009), de 14 d (Hsieh y Goodman 2005) de 6 y 18 d de edad (Guevara-García et al., 2005), decidimos hacer los ensayos de bioluminiscencia *in vivo* con plántulas de las líneas transgénicas generadas de 12 d de edad.

Sin embargo, el montaje de la detección de la bioluminiscencia comenzó con un previo análisis de las plántulas transgénicas homocigotas de 30 d de *pDXR::LUC*, *pHDS::LUC* y *pHDR::LUC*. En este primer ensayo se encontraron elementos a considerar en la ejecución del sistema, destacando la variabilidad en la germinación y en el estadío de desarrollo que mostraron todas las líneas transgénicas, incluso las plántulas silvestres utilizadas como control.

Aunque observamos bioluminiscencia en las tres líneas transgénicas de *HDS*, el patrón de expresión de cada plántula de una misma línea no fue consistente, y es notable que la línea L3-1 de *pHDS::LUC* no presentó expresión al tiempo 0 h. La L1-2 de *pHDR::LUC* si presento bioluminiscencia a las 3 h y 6 h y no observamos bioluminiscencia en la línea L1-2 *pDXR::LUC* en los tiempos probados. Estos datos sugieren que la expresión de la luciferasa es sensible al estado fisiológico de la planta, debido a la desincronía de los estadíos entre las líneas transgénicas y dentro de la misma línea fue difícil determinar si la ausencia de señal observada en la transgénica L1-2 *pDXR::LUC* reflejaba la falta de expresión del gen. No obstante pareciera que la expresión de *HDS* a los 30 d es activa.

En el segundo ensayo considerando la variabilidad en el desarrollo se creció una población inicial de 60 plántulas de cada transgénica y seleccionamos cuatro plántulas de fenotipos homogéneos con los cotiledones extendidos y raíces alargadas que se traspasaron a una sola

caja para observar la expresión de todos los genes de la vía al mismo tiempo. El registro se realizó a las 4 h después de asperjar. En contraste con lo reportado, en nuestro análisis no observamos la expresión de *DXR*, *MCT*, *CMK*, *MDS* y a diferencia del ensayo preliminar a los 30 d no observamos expresión de luciferasa en L1-2 *pHDR::LUC*. Es importante mencionar que no todas las líneas transgénicas utilizadas en este ensayo eran homocigotas había heterocigotas como en el caso de L2-1 y L5-2 de *pDXR::LUC*, la línea 2-1 de *pCMK::LUC*, la L5-1 y L6-1 de *pHDR::LUC*, y a pesar de ello en las homocigotas no observamos señal. Esto nos indicó que el sistema luciferasa debe afinarse con la finalidad de realizar un ensayo robusto y reproducible, se debe mejorar la detección o en su defecto, buscar la inducción de la expresión de los genes de la vía. De este ensayo también es posible observar la variabilidad de la expresión de la luciferasa observada en las transgénicas de *pHDS::LUC*. En el caso de L2-1 y L3-1 de *pHDS::LUC* no a todos los individuos de una misma línea presentaron bioluminiscencia, esto podría deberse al modo de aplicación del sustrato que no asegura la disponibilidad del mismo para todo el tejido de la planta. Observamos variabilidad en la intensidad de la bioluminiscencia en el caso de la L7-3 de *pHDS::LUC* de acuerdo con la escala de intensidad donde rojo es mayor bioluminiscencia y morado menor intensidad.

Conclusión

El objetivo de generar las fusiones transcripcionales entre las regiones reguladoras de 6 de los 7 genes de la vía MEP (exceptuando el gen *DXS*) con el gen reportero luciferasa se cumplió.

El objetivo de obtener las líneas transgénicas con una sola inserción se cumplió parcialmente dado tiempo para la selección el tiempo requerido no permitió generar al menos 3 líneas transgénicas homocigotas independientes para las construcciones *pMCT::LUC*, *pCMK::LUC* y *pMDS::LUC*.

El objetivo de establecer las condiciones para el registro de bioluminiscencia en las líneas transgénicas generadas se cumplió parcialmente y la variabilidad en el estadio de desarrollo afectó la detección de la actividad de la luciferasa *in planta*. Aunado a la variabilidad de la bioluminiscencia entre individuos de una misma línea.

Pude observar bioluminiscencia a los 12 días en líneas transgénicas de de *pHDS::LUC* y *pHDR::LUC* sin embargo no observamos bioluminiscencia en las líneas transgénicas *pDXR::LUC*, *pMCT::LUC*, *pCMK::LUC*, *pMDS::LUC*.

Con base en los resultados presentados en este trabajo, se concluye que existe una gran variabilidad en las líneas transgénicas que limita la detección de la bioluminiscencia y por ello es necesario probar más líneas y diseñar estrategias metodológicas que reduzcan la variabilidad.

A través de las líneas transgénicas de la vía MEP generadas se busca ampliar el conocimiento con respecto a los patrones temporales de expresión de todos los genes de la vía MEP. Aunque quedaron algunos análisis pendientes, este trabajo es un paso hacia la mejor comprensión de los procesos moleculares involucrados en la regulación de vía MEP.

Perspectivas

Son varias las ideas que se pueden proponer para mejorar el sistema de luciferasa y continuar con este proyecto:

- Una vez seleccionadas al menos tres líneas transgénicas homocigotas en las que se observe bioluminiscencia propongo un análisis global de la expresión de los genes de la vía MEP incluyendo DXS (construcción no generada en este trabajo) durante los estadios de desarrollo descritos en la literatura.
- Realizar experimentos con estímulos de luz/oscuridad y ciclo circadiano en plántulas transgénicas de 8 d y 18 para comparar los patrones de expresión con los observados por Northern Blot en el grupo de la Dr. León.
- Realizar ensayos con daño mecánico para buscar cambios en la expresión en los genes de la vía MEP como se ha reportado para *HDS* por el grupo de la Dra. Dehesh.

Bibliografía

- Aharoni, A., Jongsma, M. A., & Bouwmeester, H. J. (2005). Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. In *Trends in Plant Science* (Vol. 10, Issue 12, pp. 594–602). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.10.005>
- ABRC (2013). Handling Arabidopsis plants and seeds. Methods used by the Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC).The Ohio State University, USA). ftp://ftp.arabidopsis.org/ABRC/abrc_plant_growth.pdf

- Ahn, C. S., & Pai, H. S. (2008). Physiological function of IspE, a plastid MEP pathway gene for isoprenoid biosynthesis, in organelle biogenesis and cell morphogenesis in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology*, 66(5), 503–517. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9286-0>
- Banerjee, A., & Sharkey, T. D. (2014). Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation. In *Natural Product Reports* (Vol. 31, Issue 8, pp. 1043–1055). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c3np70124g>
- Banerjee, Aparajita, Wu, Y., Banerjee, R., Li, Y., Yan, H., & Sharkey, T. D. (2013). Feedback inhibition of deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase regulates the methylerythritol 4-phosphate pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 288(23), 16926–16936. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.464636>
- Benn, G., Bjornson, M., Ke, H., de Souza, A., Balmond, E. I., Shaw, J. T., & Dehesh, K. (2016). Plastidial metabolite MEcPP induces a transcriptionally centered stress-response hub via the transcription factor CAMTA3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(31), 8855–8860. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602582113>
- Bjornson, M., Song, X., Dandekar, A., Franz, A., Drakakaki, G., & Dehesh, K. (2015). A Chemical Genetic Screening Procedure for *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *BIO-PROTOCOL*, 5(13). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1519>
- Botella-Pavía, P., Besumbes, Ó., Phillips, M. A., Carretero-Paulet, L., Boronat, A., & Rodríguez-Concepción, M. (2004). Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *The Plant Journal*, 40(2), 188–199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02198.x>
- Budziszewski, G. J., Lewis, S. P., Glover, L. W., Reineke, J., Jones, G., Zieninik, L. S., Lonowski, J., Nyfeler, B., Aux, G., Zhou, Q., McElver, J., Patton, D. A., Martienssen, R., Grossniklaus, U., Ma, H., Law, M., & Levin, J. Z. (2001). *Arabidopsis* genes essential for seedling viability: Isolation of insertional mutants and molecular cloning. *Genetics*, 159(4), 1765–1778.
- Calisto, B. M., Perez-Gil, J., Bergua, M., Querol-Audi, J., Fita, I., & Imperial, S. (2007). Biosynthesis of isoprenoids in plants: Structure of the 2C-methyl-d-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase from *Arabidopsis thaliana*. Comparison with the bacterial enzymes. *Protein Science*, 16(9), 2082–2088. <https://doi.org/10.1110/ps.072972807>
- Carretero-Paulet, L., Ahumada, I., Cunillera, N., Rodríguez-Concepción, M., Ferrer, A., Boronat, A., & Campos, N. (2002). Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Physiology*, 129(4), 1581–1591. <https://doi.org/10.1104/pp.003798>
- Carretero-Paulet, L., Cairó, A., Botella-Pavía, P., Besumbes, O., Campos, N., Boronat, A., & Rodríguez-Concepción, M. (2006). Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate

- reductoisomerase. *Plant Molecular Biology*, 62(4–5), 683–695. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9051-9>
- Cervera, M. (2005). Histochemical and fluorometric assays for uidA (GUS) gene detection. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 286, 203–214. <https://doi.org/10.1385/1-59259-827-7:203>
- Chenge-Espinosa, M., Cordoba, E., Romero-Guido, C., Toledo-Ortiz, G., & León, P. (2018). Shedding light on the methylerythritol phosphate (MEP)-pathway: long hypocotyl 5 (HY5)/phytochrome-interacting factors (PIFs) transcription factors modulating key limiting steps. *The Plant Journal*, 96(4), 828–841. <https://doi.org/10.1111/tpj.14071>
- Chinnusamy, V., Stevenson, B., Lee, B. ha, & Zhu, J. K. (2002). Screening for gene regulation mutants by bioluminescence imaging. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2002(140), p110–p110. <https://doi.org/10.1126/stke.2002.140.p110>
- Cordoba, E., Salmi, M., & León, P. (2009). Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 60(10), 2933–2943. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp190>
- Díaz Granados, C., & Chaparro Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 49–61. <https://doi.org/10.31910/rudca.v15.n1.2012.802>
- Enfissi, E. M. A., Fraser, P. D., Lois, L. M., Boronat, A., Schuch, W., & Bramley, P. M. (2005). Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 3(1), 17–27. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00091.x>
- Estevez, J. M., Cantero, A., Romero, C., Kawaide, H., Jimenez, L. F., Kuzuyama, T., Seto, H., Kamiya, Y., & Leon, P. (2000). Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in arabidopsis. *Plant Physiology*, 124(1), 95–103. <https://doi.org/10.1104/pp.124.1.95>
- Flores-Pérez, Ú., Sauret-Güeto, S., Gas, E., Jarvis, P., & Rodríguez-Concepción, M. (2008). A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in Arabidopsis plastids. *Plant Cell*, 20(5), 1303–1315. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058768>
- Frank, A., & Groll, M. (2017). The Methylerythritol Phosphate Pathway to Isoprenoids. *Chemical Reviews*, 117(8), 5675–5703. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00537>
- Gabrielsen, M., Bond, C. S., Hallyburton, I., Hecht, S., Bacher, A., Eisenreich, W., Rohdich, F., & Hunter, W. N. (2004). Hexameric assembly of the bifunctional methylerythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase and protein-protein associations in the deoxy-xylulose-dependent pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52753–52761. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408895200>

- Gabrielsen, M., Kaiser, J., Rohdich, F., Eisenreich, W., Laupitz, R., Bacher, A., Bond, C. S., & Hunter, W. N. (2006). The crystal structure of a plant 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase exhibits a distinct quaternary structure compared to bacterial homologues and a possible role in feedback regulation for cytidine monophosphate. *FEBS Journal*, *273*(5), 1065–1073. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05133.x>
- Gelvin, S. B. (2000). *Agrobacterium* and Plant Genes Involved in T-Dna Transfer and Integration. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology*, *51*(1), 223. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.223>
- Gelvin, S. B. (2010). Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Annual Review of Phytopathology*, *48*, 45–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081852>
- Gutiérrez-Nava, M. D. L. L., Gillmor, C. S., Jiménez, L. F., Guevara-García, A., & León, P. (2004). Chloroplast Biogenesis genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development. *Plant Physiology*, *135*(1), 471–482. <https://doi.org/10.1104/pp.103.036996>
- Hemmerlin, A., Harwood, J. L., & Bach, T. J. (2012). A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? In *Progress in Lipid Research* (Vol. 51, Issue 2, pp. 95–148). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.001>
- Hsieh, M. H., Chang, C. Y., Hsu, S. J., & Chen, J. J. (2008). Chloroplast localization of methylerythritol 4-phosphate pathway enzymes and regulation of mitochondrial genes in *ispD* and *ispE* albino mutants in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, *66*(6), 663–673. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9297-5>
- Hsieh, M. H., & Goodman, H. M. (2005). The *Arabidopsis* *IspH* homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. In *Plant Physiology* (Vol. 138, Issue 2, pp. 641–653). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.104.058735>
- Hsieh, M. H., & Goodman, H. M. (2006). Functional evidence for the involvement of *Arabidopsis* *IspF* homolog in the nonmevalonate pathway of plastid isoprenoid biosynthesis. *Planta*, *223*(4), 779–784. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0140-9>
- Hsu, P. Y., & Harmer, S. L. (2014). Wheels within wheels: The plant circadian system. In *Trends in Plant Science* (Vol. 19, Issue 4, pp. 240–249). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.007>
- Huttly, A. (2009). Reporter genes. *Methods in Molecular Biology*, *478*, 39–69. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-379-0_3
- Jarvis, P., & López-Juez, E. (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 14, Issue 12, pp. 787–802). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm3702>
- Julliard, J. H., & Douce, R. (1991). Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

- the United States of America, 88(6), 2042–2045.
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2042>
- Julliard, J.H. (1992). Biosynthesis of the pyridoxol ring (vitamin B6) in higher plant chloroplasts and its relationship with the biosynthesis of the thiazole ring (vitamin B1). *C. R. Acad. Sci. III Sci. Vie* 314, 285–290.
- Lange, B. M., Rujan, T., Martin, W., & Croteau, R. (2000). Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24), 13172–13177.
<https://doi.org/10.1073/pnas.240454797>
- Lawrence, S. D., Cline, K., & Moore, G. A. (1997). Chromoplast development in ripening tomato fruit: Identification of cDNAs for chromoplast-targeted proteins and characterization of a cDNA encoding a plastid-localized low-molecular-weight heat shock protein. *Plant Molecular Biology*, 33(3), 483–492.
<https://doi.org/10.1023/A:1005785321165>
- Lemos, M., Xiao, Y., Bjornson, M., Wang, J.-Z., Hicks, D., Souza, A. de, Wang, C.-Q., Yang, P., Ma, S., Dinesh-Kumar, S., & Dehesh, K. (2016). The plastidial retrograde signal methyl erythritol cyclopyrophosphate is a regulator of salicylic acid and jasmonic acid crosstalk. *Journal of Experimental Botany*, 67(5), 1557–1566.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv550>
- Liu, Y., Gan, F., Cruz-Morales, P., & Keasling, J. D. (2020). Engineering Natural Product Biosynthetic Pathways to Produce Commodity and Specialty Chemicals. In Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.14825-5>
- Llamas, E., Pulido, P., & Rodríguez-Concepción, M. (2017). Interference with plastome gene expression and Clp protease activity in Arabidopsis triggers a chloroplast unfolded protein response to restore protein homeostasis. *PLOS Genetics*, 13(9), e1007022. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007022>
- Lois, L. M., Rodríguez-Concepción, M., Gallego, F., Campos, N., & Boronat, A. (2000). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant Journal*, 22(6), 503–513.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00764.x>
- Maughan, S. C., & Cobbett, C. S. (2003). Methionine sulfoximine, an alternative selection for the bar marker in plants. *Journal of Biotechnology*, 102(2), 125–128.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00028-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00028-2)
- McClung, C. R. (2006). Plant circadian rhythms. In *Plant Cell* (Vol. 18, Issue 4, pp. 792–803). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.040980>
- Meier, S., Tzfadia, O., Vallabhaneni, R., Gehring, C., & Wurtzel, E. T. (2011). A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Systems Biology*, 5, 77. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-77>

- Miyashiro, T., & Goulian, M. (2007). Single-Cell Analysis of Gene Expression by Fluorescence Microscopy. In *Methods in Enzymology* (Vol. 423, pp. 458–475). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)23022-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)23022-8)
- Murkin, A. S., Manning, K. A., & Kholodar, S. A. (2014). Mechanism and inhibition of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase. *Bioorganic Chemistry*, 57, 171–185. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2014.06.001>
- Phillips, M. A., León, P., Boronat, A., & Rodríguez-Concepción, M. (2008). The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends in Plant Science*, 13(12), 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.09.003>
- Phillips, M. A., Walter, M. H., Ralph, S. G., Dabrowska, P., Luck, K., Urós, E. M., Boland, W., Strack, D., Rodríguez-Concepción, M., Bohlmann, J., & Gershenzon, J. (2007). Functional identification and differential expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in induced terpenoid resin formation of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Molecular Biology*, 65(3), 243–257. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9212-5>
- pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits Five-minute, directional TOPO® Cloning of blunt-end PCR products into an entry vector for the Gateway® System. (2012). Promega, USA. (Sin fecha). Luciferase Assay System Protocol. Promega Tech .E1500. 100 assays. <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/luciferase-assay-system-protocol.pdf?la=en>
- Proteau, P. J. (2004). 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: An overview. In *Bioorganic Chemistry* (Vol. 32, Issue 6, pp. 483–493). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2004.08.004>
- Rivero, L., Scholl, R., Holomuzki, N., Crist, D., Grotewold, E., & Brkljacic, J. (2014). Handling arabidopsis plants: Growth, preservation of seeds, transformation, and genetic crosses. *Methods in Molecular Biology*, 1062, 3–25. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-580-4_1
- Rodríguez-Concepción, M., & Boronat, A. (2015). Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 25, pp. 17–22). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.04.001>
- Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Eisenreich, W., Richter, G., Schuhr, C. A., Hecht, S., Zenk, M. H., & Bacher, A. (2000). Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6451–6456. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.12.6451>
- Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Lüttgen, H., Fischer, M., Eisenreich, W., Schuhr, C. A., Fellermeier, M., Schramek, N., Zenk, M. H., & Bacher, A. (2000). Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase from tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), 8251–8256. <https://doi.org/10.1073/pnas.140209197>

- Sacchettini, J. C., & Poulter, C. D. (1997). Creating isoprenoid diversity. In *Science* (Vol. 277, Issue 5333, pp. 1788–1789). <https://doi.org/10.1126/science.277.5333.1788>
- Schrader, J., Bohlmann, J., Alonso-Gutierrez, J., Bell, S., Berger, R. G., Bernhardt, R., Zhou, Y. J. (2015). *Biotechnology of isoprenoids*. Springer. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02025a&AN=lib.MX001001888116&lang=es&site=eds-live>
- Schwender, J., Müller, C., Zeidler, J., & Lichtenthaler, H. K. (1999). Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy- D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 455(1–2), 140–144. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00849-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00849-2)
- Seemann, M., Tse Sum Bui, B., Wolff, M., Miginiac-Maslow, M., & Rohmer, M. (2006). Isoprenoid biosynthesis in plant chloroplasts via the MEP pathway: Direct thylakoid/ferredoxin-dependent photoreduction of GcpE/IspG. *FEBS Letters*, 580(6), 1547–1552. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.01.082>
- Seemann, M., Wegner, P., Schünemann, V., Bui, B. T. S., Wolff, M., Marquet, A., Trautwein, A. X., & Rohmer, M. (2005). Isoprenoid biosynthesis in chloroplasts via the methylerythritol phosphate pathway: The (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) from *Arabidopsis thaliana* is a [4Fe-4S] protein. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 10(2), 131–137. <https://doi.org/10.1007/s00775-004-0619-z>
- Sprenger, G. A., Schörken, U., Wiegert, T., Grolle, S., de Graaf, A. A., Taylor, S. v., Begley, T. P., Bringer-Meyer, S., & Sahm, H. (1997). Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), 12857–12862. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.12857>
- Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H., & Seto, H. (1998). A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), 9879–9884. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.9879>
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2015). Luciferase reporters. Retrieved November 12, 2015, from <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/luciferasereporters.html>
- Tholl, D., & Lee, S. (2011). Terpene Specialized Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*, 9(9), e0143. <https://doi.org/10.1199/tab.0143>
- Thompson, J. F., Hayes, L. S., & Lloyd, D. B. (1991). Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene*, 103(2), 171–177. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90270-L](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90270-L)

- van Leeuwen, W., Hagendoorn, M. J. M., Ruttink, T., van Poecke, R., van der Plas, L. H. W., & van der Krol, A. R. (2000). The Use of the Luciferase Reporter System for in Planta Gene Expression Studies. *Plant Molecular Biology Reporter*, 18(2), 143–144. <https://doi.org/10.1007/bf02824024>
- Velten, J. P., Pogson, B. J., Cazzonelli, C. I. (2008). Luciferase as a reporter of gene activity in plants. *Transgenic Plant Journal*, Vol. 2, Issue 2. 1749-0413. <http://handle.uws.edu.au:8081/1959.7/540789>
- Vickers, C. E., Bongers, M., Liu, Q., Delatte, T., & Bouwmeester, H. (2014). Metabolic engineering of volatile isoprenoids in plants and microbes. *Plant, Cell & Environment*, 37(8), 1753–1775. <https://doi.org/10.1111/pce.12316>
- Vogel, C., & Pleiss, J. (2014). The modular structure of ThDP-dependent enzymes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 82(10), 2523–2537. <https://doi.org/10.1002/prot.24615>
- Walter, M. H., Fester, T., & Strack, D. (2000). Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the “yellow pigment” and other apocarotenoids. *Plant Journal*, 21(6), 571–578. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00708.x>
- Walley, J. W., Coughlan, S., Hudson, M. E., Covington, M. F., Kaspi, R., Banu, G., Harmer, S. L., & Dehesh, K. (2007). Mechanical Stress Induces Biotic and Abiotic Stress Responses via a Novel cis-Element. *PLoS Genetics*, 3(10), e172. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030172>
- Xiao, Y., Savchenko, T., Baidoo, E. E. K., Chehab, W. E., Hayden, D. M., Tolstikov, V., Corwin, J. A., Kliebenstein, D. J., Keasling, J. D., & Dehesh, K. (2012). Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes. *Cell*, 149(7), 1525–1535. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.038>
- Zhang, L., Zhan, X., Wang, X., Xu, J., Wang, M., Li, L., Bai, G., Fang, H., Hu, S., Li, J., Yan, J., Li, J., & Yang, X. (2019). SEED CAROTENOID DEFICIENT functions in isoprenoid biosynthesis via the plastid MEP pathway. *Plant Physiology*, 179(4), 1723–1738. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01148>

Anexo 1. Protocolo MIRAPREP. Aislar DNA plasmídico.

1. Preparar o hacer el montaje de 50 mL de cultivo bacteriano con antibiótico SpR e incubar toda la noche a 250 rpm a 37°C.
2. Transferir las bacterias a un tubo Falcon de 50 mL y centrifugar a 3500xg a 8°C por 10 minutos.
3. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 2 mL de buffer de resuspensión (1) el cual debe estar en hielo.
4. Añadir 2 ml de buffer de lisis (2) que debe estar a temperatura ambiente invertir el tubo cuatro veces e incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 2 mL de buffer de neutralización (3) e invertir 4 veces.
6. Distribuir el lisado en 4 tubos Eppendorf de 1.5 mL decantando nunca pipeteando.
7. Centrifugar los cuatro tubos a 13400 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos.
8. Colectar el sobrenadante de los cuatro tubos, en un nuevo tubo de 15 mL el cual abarcara el volumen de no más de 6 mL y descartar el pellet formado en cada tubo eppendorf.
9. Agregar 5 mL de etanol al 96% en total son 11 mL en el tubo de 15 mL
10. Mezclar en el vortex por 5 segundos.
11. Cargar el volumen total de la muestra en 4 columnas de centrifugación, vaciando secuencialmente y centrifugando por 3 segundos a 13400 rpm hasta que todo el volumen haya pasado por las columnas, del resultado de las centrifugaciones consecutivas se descarta el líquido ya centrifugado.
12. Descartar el fluido centrifugado
13. Repetir el paso 11 hasta que la muestra entera haya pasado por las columnas de centrifugación.
14. Lavar cada columna con 500 μ L con buffer de lavado y centrifugado a 13400 rpm a temperatura ambiente por 30 segundos.
15. Descartar el líquido centrifugado.
16. Repetir el paso 14-15.
17. Dar un spin final a 13 400 rpm a temperatura ambiente por 1.5 minutos osea 90 segundos .
18. Descartar el tubo viejo y montar la columna en un tubo nuevo eppendorf .
19. Agregar 30-35 μ L de agua destilada estéril e incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
20. Centrifugar a 13 400 rpm por 2 minutos para eluir el DNA de la columna.
21. Combinar el eluido de las cuatro columnas en un solo tubo \sim 120 μ L
22. Medir la concentración de DNA plasmídico aislado en el NanoDrop-One.
23. Guardar la muestra en el congelador.

Anexo 2. Protocolo extracción CTAB

Reactivos:

- Buffer 2X CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) al 2% (w/v) 1.4 M NaCl, 100 mM Tris HCl pH 8.0 20mM EDTA.
- Cloroformo
- 2-Propanol
- 70% Etanol
- TE buffer (10 mM Tris HCl pH 8.0 1 mM EDTA)
- Nitrógeno líquido
- Motor moledor de pastilla y pilas AA

Procedimiento:

1. Triturar una pequeña cantidad de tejido de planta en un tubo eppendorf de 1.5 mL
2. Agregar 300 μ L de buffer 2X CTAB e incubar a 65°C por lo menos 10 min (hasta varias horas)
3. Dejar en frío
4. Agregar 300 μ L de cloroformo y vortexear a fondo.
5. Dar un spin brevemente en una microcentrífuga para separar las fases.
6. Transferir la fase superior que será la fase acuosa a un tubo nuevo.
7. Agregar 300 μ L de 2-Propanol y mezclar bien.
8. Dar un spin por 5 minutos en una microcentrífuga para formar un pellet de DNA.
9. Remover el sobrenadante y lavar el pellet con 500 μ L de etanol al 70%.
10. Dar un spin brevemente en una microcentrífuga.
11. De manera cuidadosa remover el etanol y dejar secar el pellet.
12. Agregar 100 μ L de buffer TE y permitir que la pastilla se disuelva.
13. Mezclar o vortexear antes de usar el DNA genómico.
14. Usar de 1 a 2 μ L en una reacción de PCR.

Anexo 3. Blast (*basic local alignment search tool*)

Resultado de la secuenciación de la región reguladora *DXR* con oligonucleótido anverso y reverso.

```

Arabidopsis thaliana chromosome 5 sequence
Sequence ID: CP002688.1 Length: 26975502Number of Matches: 1
Range 1: 25217816 to 25218660GenBankGraphics
Features: 527 bp at 5' side: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate
reductoisomerase3 bp at 3' side: Protein with RING/U-box and TRAF-
like domain
Query 1 CGATAAGGTTAACTTGAATGGAATCGGAATTGGAGAGATGGCTACACCGTAATTATGGT 60
|
Sbjct 25218660 CGATAAGGTTAACTTGAATGGAATCGGAATTGGAGAGATGGCTACACCGTAATTATGGT 25218601
Query 61 TTTTGTTCATTAGTTAACGCATTAATTCAGGCTCCGATTCCGATGTTTAAAGAAAAA 120
|
Sbjct 25218600 TTTTGTTCATTAGTTAACGCATTAATTCAGGCTCCGATTCCGATGTTTAAAGAAAAA 25218541
Query 121 GTTGCATGCATGACTTGGGATGGAATTTGAGTGGATGCAGCAAGTAACTTGTTTAACG 180
|
Sbjct 25218540 GTTGCATGCATGACTTGGGATGGAATTTGAGTGGATGCAGCAAGTAACTTGTTTAACG 25218481
Query 181 TCTCTTCACTGTTTTGCCATGTGTCACTTAACGTACAACACTTGTCTCAGATGATCCA 240
|
Sbjct 25218480 TCTCTTCACTGTTTTGCCATGTGTCACTTAACGTACAACACTTGTCTCAGATGATCCA 25218421
Query 241 TTAGCAGTAGTAAATGATTTACTGACTCATCTACCAATACCAACATACCATTATCTTACC 300
|
Sbjct 25218420 TTAGCAGTAGTAAATGATTTACTGACTCATCTACCAATACCAACATACCATTATCTTACC 25218361
Query 301 ATTATCATTTTATCTATTTGATCTCTGTATCCCCACGAAAACACTATGTAATGTGATAGTCA 360
|
Sbjct 25218360 ATTATCATTTTATCTATTTGATCTCTGTATCCCCACGAAAACACTATGTAATGTGATAGTCA 25218301
Query 361 ATCATAACAGCTTAATCACACTTAAATAAAGTAAATTAatctttttctttttcttttctt 420
|
Sbjct 25218300 ATCATAACAGCTTAATCACACTTAAATAAAGTAAATTTATCTTTTTTCTTTTTCTTTCTT 25218241
Query 421 tttATGGGATAAATTTTATTCCTTTCCGAAGAAAGAAAAGAGAGACCATTCAAACAACA 480
|
Sbjct 25218240 TTTATGGGATAAATTTTATTCCTTTCCGAAGAAAGAAAAGAGAGACCATTCAAACAACA 25218181
Query 481 ATAATCTTTTGAACGGATGATCTAATAGTCTACAAGAAGACTAATTTTATTTAAACAAT 540
|
Sbjct 25218180 ATAATCTTTTGAACGGATGATCTAATAGTCTACAAGAAGACTAATTTTATTTAAACAAT 25218121
Query 541 CGAACCTAACATGACTCTAATTAGAGATATAGAGAATTATATACGTAAAAAATTCAGTT 600
|
Sbjct 25218120 CGAACCTAACATGACTCTAATTAGAGATATAGAGAATTATATACGTAAAAAATTCAGTT 25218061
Query 601 GGTTAAAGTTACATGGCTTTTGAATTTAAATTTACAAATTGAACATTGAGGAACATATC 660
|
Sbjct 25218060 GGTTAAAGTTACATGGCTTTTGAATTTAAATTTACAAATTGAACATTGAGGAACATATC 25218001
Query 661 AAAGAAATAAGAATGATAGTGAAAAATGTTGACaaaaaaaaaGAATGATAGTGAAAAAT 720
|
Sbjct 25218000 AAAGAAATAAGAATGATAGTGAAAAATGTTGACAAAAAAAAAAGAATGATAGTGAAAAAT 25217941
Query 721 ATTCAATACATAATTTTAAAAAGAAAAGTATATTATATACTTGTCAAAGATCTAAACTA 780
|
Sbjct 25217940 ATTCAATACATAATTTTAAAAAGAAAAGTATATTATATACTTGTCAAAGATCTAAACTA 25217881
Query 781 AGTTTGACATTTGGATTATAATTGTTACAGCATATAACATGTACTTTATAaaaaaaaaa 840
|
Sbjct 25217880 AGTTTGACATTTGGATTATAATTGTTACAGCATATAACATGTACTTTATAAAAAAAAAAAA 25217821
Query 841 aaaaa 845
|
Sbjct 25217820 AAAAA 25217816

```

Resultado de la secuenciación de la región reguladora *MCT* con oligonucleótido anverso y reverso

Arabidopsis thaliana chromosome 2 sequence

Sequence ID: CP002685.1 Length: 19698289 Number of Matches: 3

Range 1: 673564 to 674498 GenBankGraphics

Features: 8 bp at 5' side: NADH dehydrogenase (ubiquinone)s772 bp at 3' side: hypothetical protein

Query	144	CTGCAACACATGAGTAATTCCTTTAGTATACAACCTTTTACaaaaaaaaGATTCAGAGC	203
Sbjct	674498	CTGCAACACATGAGTAATTCCTTTAGTATACAACCTTTTACAAAAAAGATTCAGAGC	674439
Query	204	CAAACACCAAGAGGGTCTCATAGAAGAAAAGATACAAAAATGACACCTATCTTTCAGA	263
Sbjct	674438	CAAACACCAAGAGGGTCTCATAGAAGAAAAGATACAAAAATGACACCTATCTTTCAGA	674379
Query	264	TCATTAGTATTAAGCAAAGAACCAACAACACAGAAATCAGACAAAGCTAATGCTACAC	323
Sbjct	674378	TCATTAGTATTAAGCAAAGAACCAACAACACAGAAATCAGACAAAGCTAATGCTACAC	674319
Query	324	ATTAATCATCACAGATACGTATAGACATTTGAAATTGATCTGAAAGATAACAGATACTA	383
Sbjct	674318	ATTAATCATCACAGATACGTATAGACATTTGAAATTGATCTGAAAGATAACAGATACTA	674259
Query	384	ATTAGCAATATGCTAATAATAGCTGGTAACTTTAAGAGTGTACATAAAGATAATCACATG	443
Sbjct	674258	ATTAGCAATATGCTAATAATAGCTGGTAACTTTAAGAGTGTACATAAAGATAATCACATG	674199
Query	444	AAAGCCGTAACCATAAACATGTGACCGATCCAATCCCAATACTTCAGGATTCTAAAAGCC	503
Sbjct	674198	AAAGCCGTAACCATAAACATGTGACCGATCCAATCCCAATACTTCAGGATTCTAAAAGCC	674139
Query	504	ATAACCATTGTTTTAGTCTCAAAGTGTTATTCAGCTTTGCTCTATACATTACCTCAA	563
Sbjct	674138	ATAACCATTGTTTTAGTCTCAAAGTGTTATTCAGCTTTGCTCTATACATTACCTCAA	674079
Query	564	GGAATGGATTCTCAACTAATACACACATTAGCCATTGACAATAAAGCTTCTAACAT	623
Sbjct	674078	GGAATGGATTCTCAACTAATACACACATTAGCCATTGACAATAAAGCTTCTAACAT	674019
Query	624	TGAATCACTGAACTAGACAAAAACATGATCTAATCCCAACCTTGATCTAACCATAT	683
Sbjct	674018	TGAATCACTGAACTAGACAAAAACATGATCTAATCCCAACCTTGATCTAACCATAT	673959
Query	684	CCTAGATTATATGCACAAATCTTACTCTATCTTCCACAGAACTTGACTTCAAATCTCATA	743
Sbjct	673958	CCTAGATTATATGCACAAATCTTACTCTATCTTCCACAAAACCTTGACTTCAAATCTCATA	673899
Query	744	ACTATATGTATTAGTCTCAAAGTGTATTTCATCTTTGCTTGCAAGGAATGGATTCTATCT	803
Sbjct	673898	ACTATTTGTATTAGTCTCAAAGTGTATTTCATCTTTGCTTGCAAGGAATGGATTCTATCT	673839
Query	804	CAGACTAATACACATTAGCCATTGACAATAAAGCTTCTAACTATGACATTACAATCACTG	863
Sbjct	673838	CAGACTAATACACATTAGCCATTGACAATAAAGCTTCTAACTTTGAAATTTCAATCACTG	673779
Query	864	AAATTAGACAATAAACATGTACATTGACTAATCCCAAAA-TTGATTCTAACCATATGCAC	922
Sbjct	673778	AAATTAGACAATAAACATGTACTTTGACTAATCCCAAACTTGATTCTAACCATATGCAA	673719
Query	923	AAGTCT-ACACTAACTTCTCAGACGTGACAT-CATAGAAGCTTTGACCAAAGATTTTGG	980
Sbjct	673718	AAATCTTACTCTATCTTCTCAACCGTACATTCTAAGAA-CTTTG-CCAAAGTTTTTGT	673661
Query	981	TTATCCCATCTTTCACAGACAAAATCTAATCCGATTTAGGGATAAAAAACCTCCCAAAG	1040
Sbjct	673660	TTATCCAATCTTTCACAGAGAAG-TCAAATC-GATTTAGG-ATATAAA-CCTCCGAGAAG	673605
Query	1041	CAAATAAATTTCAACAAGATTTTAttttttttttCCCCAAT 1081	
Sbjct	673604	CAAAACAATTCGAGAAGATTTGATTTTATTTTACCTAAT 673564	

Resultado de la secuenciación de la región reguladora CMK con oligonucleótido anverso y reverso

Arabidopsis thaliana genome assembly, chromosome: 2
 Sequence ID: LR699766.1Length: 19545947Number of Matches: 1 Range
 1: 11365704 to 11366541

Query	1	TGATCTGATATGTCACCTA	AttttttttttttttATAAGAATCAGCCCAATTCTAACAAAA	60
Sbjct	11365704	TGATCTGATATGTCACCTA	TTTTTTTTTTTTTATAAGAATCAGCCCAATTCTAACAAAA	11365763
Query	61	AATCAAAATGTTTTGTATAGAGAAATGGCCCAATAGCACATTTTTCATCTCTATGAC		120
Sbjct	11365764	AATCAAAATGTTTTGTATAGAGAAATGGCCCAATAGCACATTTTTCATCTCTATGAC		11365823
Query	121	ATTTGGGCACTTTAGGTAGACAATCAATTAGTCAACTACATAAATATCCTTTACCAAT		180
Sbjct	11365824	ATTTGGGCACTTTAGGTAGACAATCAATTAGTCAACTACATAAATATCCTTTACCAAT		11365883
Query	181	TTGGCCTAATCTCTTTCTCTTATTAATCTCCAAACTGATGCCTCAATTGGGGTTATAGAT		240
Sbjct	11365884	TTGGCCTAATCTCTTTCTCTTATTAATCTCCAAACTGATGCCTCAATTGGGGTTATAGAT		11365943
Query	241	TATAGGATGATAAGCTTATGCAACGCTGCGTATAAGCTTATTTCTAAGCTCATTGTGATA		300
Sbjct	11365944	TATAGGATGATAAGCTTATGCAACGCTGCGTATAAGCTTATTTCTAAGCTCATTGTGATA		11366003
Query	301	ATTTCAATAAATTCAGTCTGTTTCTATTTTTGTAGATTGATTACTAATAGTATGTTGATA		360
Sbjct	11366004	ATTTCAATAAATTCAGTCTGTTTCTATTTTTGTAGATTGATTACTAATAGTATGTTGATA		11366063
Query	361	TCGCAAATGGTGCATTCAGAGCATACTAAAAAAGCTACCCAATCTCTGTGGCATTAA		420
Sbjct	11366064	TCGCAAATGGTGCATTCAGAGCATACTAAAAAAGCTACCCAATCTCTGTGGCATTAA		11366123
Query	421	ATTAAGATATTAGCAAGCTTTTGATAAAGTTGAGTGGATTTTATTGAAATCTACCGTT		480
Sbjct	11366124	ATTAAGATATTAGCAAGCTTTTGATAAAGTTGAGTGGATTTTATTGAAATCTACCGTT		11366183
Query	481	GATACTCTTCTCACTGCAACACTCAAGTGTAAAGATGTCCATACATTGCTAAAGTTTT		540
Sbjct	11366184	GATACTCTTCTCACTGCAACACTCAAGTGTAAAGATGTCCATACATTGCTAAAGTTTT		11366243
Query	541	CATGCAATATGCAGAAGTCTCTGAACATAAAATTTAATTTTCAGAAATGTGTAATCATT		600
Sbjct	11366244	CATGCAATATGCAGAAGTCTCTGAACATAAAATTTAATTTTCAGAAATGTGTAATCATT		11366303
Query	601	TTGATAAAAGACTATCCTCTTATGAAGGACGTTCAATTCAAACAAGACTACTTGTATCCC		660
Sbjct	11366304	TTGATAAAAGACTATCCTCTTATGAAGGACGTTCAATTCAAACAAGACTACTTGTATCCC		11366363
Query	661	ATAAATCACTTGAGAAAGTTGCCCTTAAATTCATATTTGGTCAATGGTAAGATTTTAGGA		720
Sbjct	11366364	ATAAATCACTTGAGAAAGTTGCCCTTAAATTCATATTTGGTCAATGGTAAGATTTTAGGA		11366423
Query	721	AATCATAAAGTGTGAGGATTTGGAAGATATCTTGGTTAACCTTCATTTGTATGAATTACT		780
Sbjct	11366424	AATCATAAAGTGTGAGGATTTGGAAGATATCTTGGTTAACCTTCATTTGTATGAATTACT		11366483
Query	781	AAAAATGATGCATTTTCTTGTATTATTCAAAAATGTTTCTTATCTCTATATTGCAT		838
Sbjct	11366484	AAAAATGATGCATTTTCTTGTATTATTCAAAAATGTTTCTTATCTCTATATTGCAT		11366541

Resultado de la secuenciación de la región reguladora *MDS* con oligonucleótido anverso y reverso

```

Arabidopsis thaliana genome assembly, chromosome: 1
Sequence ID: LR699745.2 Length: 30401407Number of Matches: 1
Range 1: 23655759 to 23656067GenBankGraphicsNext
Query 1 CTTCTCTTCTAATTTTCCGGCGATTGAATGGAGACAATGCGTCGCCGTTTTTCAAAGCG 60
        |||
Sbjct 23656067 CTTCTCTTCTAATTTTCCGGCGATTGAATGGAGACAATGCGTCGCCGTTTTTCAAAGCG 23656008
Query 61 GTGCGGAAGAGAAGAGTGGGCGAGGAAGTTTAGAGAACTGGAACAGAAAACCTAAAGCG 120
        |||
Sbjct 23656007 GTGCGGAAGAGAAGAGTGGGCGAGGAAGTTTAGAGAACTGGAACAGAAAACCTAAAGCG 23655948
Query 121 AAGAAGTGATGAGTAAACTCCTCTACACGTGGTCTTTAGTAACTTCAGTGGATATGTA 180
        |||
Sbjct 23655947 AAGAAGTGATGAGTAAACTCCTCTACACGTGGTCTTTAGTAACTTCAGTGGATATGTA 23655888
Query 181 ACATGATCGACGGTCGAGAGTTTATCATATTTTAAATGGGCTTTAGGAAGGAAAGGCCA 240
        |||
Sbjct 23655887 ACATGATCGACGGTCGAGAGTTTATCATATTTTAAATGGGCTTTAGGAAGGAAAGGCCA 23655828
Query 241 ATAAAGAAATGAATATTTCCACCACAGAATTATGAATTGAGTAAACCAGAAAATCGAAGA 300
        |||
Sbjct 23655827 ATAAAGAAATGAATATTTCCACCACAGAATTATGAATTGAGTAAACCAGAAAATCGAAGA 23655768
Query 301 AGAACGGCA 309
        |||
Sbjct 23655767 AGAACGGCA 23655759

```

Resultado de la secuenciación de la región reguladora *HDS* con oligonucleótido anverso y reverso

Arabidopsis thaliana chromosome 5 sequence

Sequence ID: CP002688.1 Length: 26975502 Number of Matches: 1

Range 1: 24358445 to 24359304 GenBankGraphicsNext Features: 493 bp at 5' side: DHBP synthase RibB-like alpha/beta domain-containing protein. 143 bp at 3' side: 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase

Query	1	CTCTGAATCATCTGATCTGACTTGCAAAAATTTGAGGTTTTGCTTTGGTTCTTACTAAAT	60
Sbjct	24358445	CTCTGAATCATCTGATCTGACTTGCAAAAATTTGAGGTTTTGCTTTGGTTCTTACTAAAT	24358504
Query	61	TTTTGATATTGGGTTAAGATATGTTTGTGTTTTAGTGCAATACGAGAAGATTGTTAGTGTT	120
Sbjct	24358505	TTTTGATATTGGGTTAAGATATGTTTGTGTTTTAGTGCAATACGAGAAGATTGTTAGTGTT	24358564
Query	121	GAGGGGTATGCTAATGCTACCTCCCATCCCATGGTACGCATGTGTAATTTGAAGAAAC	180
Sbjct	24358565	GAGGGGTATGCTAATGCTACCTCCCATCCCATGGTACGCATGTGTAATTTGAAGAAAC	24358624
Query	181	TTGGTGGACCATTTCGTAATTTTACTTAAGTTTCTTATTATTGCTCCATTGGAAATTA	240
Sbjct	24358625	TTGGTGGACCATTTCGTAATTTTACTTAAGTTTCTTATTATTGCTCCATTGGAAATTA	24358684
Query	241	AACTTTGTTGTAATCTTATTAATAAATATATCAAAATATTAGTGGAAATTTTCTATTTTT	300
Sbjct	24358685	AACTTTGTTGTAATCTTATTAATAAATATATCAAAATATTAGTGGAAATTTTCTATTTTT	24358744
Query	301	AAGAACAATATTTGTTGTATCCATATCTTTTCTTATAAAGGTGTCAATTTTCAATAGA	360
Sbjct	24358745	AAGAACAATATTTGTTGTATCCATATCTTTTCTTATAAAGGTGTCAATTTTCAATAGA	24358804
Query	361	GGAAAATCTCATAATTTTGTATATAGGGGTCAAAGTTGAAGAAAAGGATAAATAGAGG	420
Sbjct	24358805	GGAAAATCTCATAATTTTGTATATAGGGGTCAAAGTTGAAGAAAAGGATAAATAGAGG	24358864
Query	421	ACCTCAAAATTCATTTTCCACGTATCCGTGCTCTAATTTTATCCACTTCTGCTAAAAC	480
Sbjct	24358865	ACCTCAAAATTCATTTTCCACGTATCCGTGCTCTAATTTTATCCACTTCTGCTAAAAC	24358924
Query	481	ATTTGGACTATAAATGTCTGGTTGGTCTTGGCTGTTTGTGTTGCAACACTTGTGCTAAAAC	540
Sbjct	24358925	ATTTGGACTATAAATGTCTGGTTGGTCTTGGCTGTTTGTGTTGCAACACTTGTGCTAAAAC	24358984
Query	541	GTTTTATCCTGAGTTTCTTTCCACATCCAGCTTCATTTGTGAAAAATCGTCAATCCCTCT	600
Sbjct	24358985	GTTTTATCCTGAGTTTCTTTCCACATCCAGCTTCATTTGTGAAAAATCGTCAATCCCTCT	24359044
Query	601	CAAACCTTCTCACCCTAATTTCTTCCCTCTGGAACATTCTCTTCTCTATTATTTTGATT	660
Sbjct	24359045	CAAACCTTCTCACCCTAATTTCTTCCCTCTGGAACATTCTCTTCTCTATTATTTTGATT	24359104
Query	661	CCCTTGGCCTCAACACTGGTTTCTCAATTGCATGATCTTGGCTCGTCTCAGGTACTGTT	720
Sbjct	24359105	CCCTTGGCCTCAACACTGGTTTCTCAATTGCATGATCTTGGCTCGTCTCAGGTACTGTT	24359164
Query	721	GTTTCATACCTTAGAGAATCTCAAATGGTTCTTGGGTCTGGTTGATTAGTTTCTGTGT	780
Sbjct	24359165	GTTTCATACCTTAGAGAATCTCAAATGGTTCTTGGGTCTGGTTGATTAGTTTCTGTGT	24359224
Query	781	TATTTCAAGGGGAACGAAGACAATTTAGCTGGGTAATCTGGGTTTTCGGGAATTTGG	840
Sbjct	24359225	TATTTCAAGGGGAACGAAGACAATTTAGCTGGGTAATCTGGGTTTTCGGGAATTTGG	24359284
Query	841	TTGATTTTTCGTCAGAATC 860	
Sbjct	24359285	TTGATTTTTCGTCAGAATC 24359304	

Resultado de la secuenciación de la región reguladora HDR con oligonucleótido anverso y reverso

Arabidopsis thaliana chromosome 4 sequence

Sequence ID: CP002687.1 Length: 18585056 Number of Matches: 1 Range 1: 16431041 to 16431931 Features:3 bp at 5' side: 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase. 80 bp at 3' side: S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein.

Table with columns: Query, Sbjct, and sequence alignments. Shows matches between a query sequence and a subject sequence (16431931) with alignment coordinates and sequence text.

Anexo 4. Análisis *in silico* de los elementos en cis reportados en la región reguladora de los genes de la vía MEP.

DXR

```

>PlantCARE_2342
+ TCGATAAGGT TAACTTGAAA TGGAAATCGGA ATTGGAGAGA TGGCTACACC GTAATTATGG TTTTTGTTTC
- AGCTATTCCA ATGAACTTT ACCTTAGCCT TAACCTCTCT ACCGATGTGG CATTAAATACC AAAAAACAAG

+ CATTAGTTAA CGCATTAAAT CAGGCTCCGA TTTCCGATGT TTAAGAAAA AGTTGCATGC ATGACTTGGG
- GTAATCAATT GCCTAATTAA GTCCGAGGCT AAAGGCTACA AATTTCTTTT TCAACGTACG TACTGAACCC

+ ATGGAAATTTG AGTGGATGCA GCAAGTAACA CTTGTTTAA C GTCTCTTTCA CTGTTTTGC ATGTGTCACT
- TACCTTAAAC TCACCTACGT CGTTCCATTGT GAACAATTTG CAGAGAAAAGT GACAAAACGG TACACAGTGA

+ TAACGTACAA CACTTGTCTT CAGATGATCC ATTAGCAGTA GTAAATGATT TACTGACTCA TCTACCAATA
- ATTGCATGTT GTGAACAGGA GTCTACTAGG TAATCGTCA CATTACTAA ATGACTGAGT AGATGGTTAT

+ CCAACATACC ATTA TCTTAC CATTATCATT TATCTATTGA TCTCTGTATC CCCACGAAAA CACTATGTAA
- GGTGTATGG TAATAGAATG GTAATAGTAA ATAGATAACT AGAGACATAG GGGTGCCTTT GTGATACATT

+ TGTGATAGTC AATCATAACA GCTTAATCAC ACTTAAATAA AGTAAATTAT CTTTTTCTT TTTCTTTTCT
- ACACTATCAG TTAGTATTGT CGAATTAGTG TGAATTTATT TCATTTAATA GAAAAAGAA AAAGAAAAA

+ TTTTATGGGA TAAATTTTAT TCCTTTCCGA AGAAAAGAAA GAGAGCACCA TTCAAAACAA AATAACTTT
- AAAATACCCT ATTTAAAAA AGGAAAGGCT TCTTTCTTTT CTCTCGTGGT AAGTTTGTG TTATTAGAAA

+ TTGAACGGAT GATCTAATAG TCTACAAGAA GACTAATTTT ATTTAAACAA TCGAACCTAA CATGACTCTA
- AACTTGCCTA CTAGATTATC AGATGTTCTT CTGATTAATA TAAATTTGTT AGCTTGGATT GTACTGAGAT

+ ATTAGAGATA TAGAGAATTA TATACGTAAA AAATCAAGT TGGTTAAAGT TACATGGCTT TTGAAATTA
- TAATCTCTAT ATCTCTTAA ATATGCATTT TTAAGTTCA ACCAATTTCA ATGTACCGAA AACTTTAAAT

+ AATTTACAAA TTGAACATTG AGGAACATAT CAAAGAAATA AGAATGATAG TGAAAAATGT TGACAAAAA
- TTAATGTTT AACTTGTAA TCCTTGTATA GTTTCTTTAT TCTTACTATC ACTTTTACA ACTGTTTTT

+ AAAAGAAATGA TAGTAAAAA TATTCAATAC ATAAATTTTA AAAAGAAAAG TATATTATAT ACTTGTCAA
- TTTTCTTACT ATCCTTTTTT ATAAGTTATG TATTAATAAT TTTTCTTTT ATATAATATA TGAAACAGTT

+ GATCTAAACT AAGTTTGA CA TTTGGATTAT AATTGTTACA GCATATAACA TGTACTTTAT AAAAAA
- CTAGATTTGA TTCAACTGT AAACCTAATA TTAACAATGT CGTATATTGT ACATGAATA TTTTTTTTT

+ AAAAAAGAGA AGAAGAAAAA AAAACATGT AACATGTTT ATTTTGAAG AAGACAGCAT ACAACTGTT
- TTTTTCTCT TCTTCTTTT TTTTTGTACA TTGTACAAA TAAAACTTT TTCTGTCTGA TGTGTACAA

+ AGTCAAAACA TATTCATTT AAGATATTCA TATCAAAAT TCATTAATACG AACGAATACC ATAACTTTT
- TCAGTTTTGT ATAAAGTTAA TTCTATAAGT ATAGTTTTTA AGTATTATGC TTGCTTATGG TATTTGAAA

+ TCTTTTTTAT TTTGTAAGAG AGAAATCCTT AACCTTAAT CCCTTGAAT GCATATTTCT AATAAATAT
- AGAAAAATA AAACA TCTG TCTTTAGGAA TTGGTAATTA GGGAACATTA CGTATAAGA TTATTATTA

+ ATATTTGACA AACTATATAA TTGATGATAC AGATTCTGCT GTTAAACT CTAAAGAAAT CAATAGAAA
- TATAAATCTG TTGATATAT AACTACTATG TCTAAGACGA CAATTTATGA GATTTCTTA GTTTATCTT







+ ATGGGAACAT AGTAAGACTG GATTATTTAC CACTTACAAG TTGTCGTTAC CTTAATAAA AGGTCCTTGT
- TACCCTTGT TAAATCGAC CTAAATAATG GTGAATGTT AACAGCAATG GAATTTT TCCAGGAACA

+ TACTAAATGC TCAGCGAAAT CTTTAAAAA TGACAAAAAT CTGTTGGGTA CCATTCAAAT CCAGATTCCT
- ATGATTTACG AGTCGCTTTA GAAATTTTT ACTGTTTTTA GACAACCCTAT GGTAAAGTTA GGTCTAAGGA

+ TTCTTATCAT CATCTCTCTC TCTCACACTG TTTATCTGAT TCGTCTTCTC TGATAATCAA GAGTAGTAGT
- AAGAATAGTA GTAGAGAGAG AGAGTGTGAC AAATAGACTA AGCAGAAGAG ACTATTAGTT CTCATCATCA

+ GCGGTTCTCT GGAATAATTT CGATTTTTAA
- CGCCAAGAGA CCTTTATAA GCTAAAAAT

```

	GT1-motif->light responsive element		MYC
	GA-motif->part of a light responsive element		MYB
	TCT-motif->part of a light responsive element		Myc

MCT

```

>PlantCARE_10002
+ TGC AACACA TGAGTAATTT CCTTTAGTAT ACAACCTTTT ACAAAAAAAG ATT CAGAGCC AACACCAAAA
- AC GTTGTGTG ACTCATTAAA GGAATCATTA TGTTGGAAAA TGTTTTTTTC TAAGTCTCGG TTTGTGGTTT

+ GAGGGTCTCA TAGAAGAAAA GATACAAAAA ATGACACCTA TCTTTCAGAT CATTAGTATT AAAGCAAAAG
- CTC CAGAGT ATCTTCTTTT CTATGTTTTT TACTGTGGAT AGAAAGCTA GTAATCATAA TTTCTTTCT

+ ACCAACAAAC ACAGAAATCA GACAAAGCTA ATGCTACACA TTAAATCATCA CAGATACGTA TAGACATTTT
- TG GTTGTGTTG TGTCTTTAGT CTGTTTCGAT TACGATGTGT AATTAGTAGT GTCTATGCAT ATCTGTAAAA

+ GAAATTTGATC TGAAAGATTA CAGTACTAA TTAGCAATAT GCTAATAATA GCTGGTAACT TTTAAAGAGTG
- CTTTAACTAG ACTTCTATT GTCTATGATT AATCGTTATA CGATTATTAT CGACCATTGA AAATCTCAC

+ TACATAAAGA TAATCACTGA AAGCCGTAAAC CATAAACATG TGACCAGATCC AATCCCAATA CTT CAGGATT
- ATG TATTCTT ATTAGTACTT TCCGGCATTG GTATTTGTAC ACTGGCTAGG TTAGGGTTAT GAAGTCTTAA

+ CTAAAGCCCA TAACCATTTG TTTTAGTCTC AAAAGTGTTC ATTCAGCTTT GCTCTATACA TTACCTCAAAG
- GATTTTCGGT ATTGATAAAC AAAATCAGAG TTTTCACAAA TAAGTCGAAA CGAGATATGT AATGGAGTTC

+ GAATGGATTC ATCTCAAAC AATACACACA TTAGCCATTG ACAATAAAGC TTCTAACATT GAATCACTGA
- CTTACCTAAG TAGAGTTTGA TTATGTGTGT AATCGGTAAAC TGTTATTTTCG AAGATTGTAA CTTAGTACT

+ AACTAGACAA AAACATGATC TAATCCAAA CCTTGATTCT AACCATATTC CTAGATTATA TGCACAAATC
- TTGATCTGTT TTTGTACTAG ATTAGGGTTT GGAACTAAGA TTGGTATAAG GATCTAATAT ACGTGTTTAG

+ TTACTCTATC TTCCACAAA CTTGACTTCA AATCTCATAA CTATTTGTAT TAGTCTCAA GTGTTTATTC
- AATGAGATAG AAGGTGTTTT GAACCTGAGT TTAGAGTATT GATAAACATA ATCAGAGTTT CACAAATAG

+ ATCTTTGCTT GCAAGGAAATG GATTCATCTC AGACTAATAC ACATTAGCCA TTGACAAATA AGCTTCTAAC
- TAGAAACGAA CGTTCCTTAC CTAAGTAGAG TCTGATTATG TGTAAATCGGT AACTGTTATT TCGAAGATTG

+ TTTGAAATTT CAATCACTGA AATTAGACAA AAAACATGTA CTTTGACTAA TCCCAAAACT TGATTCTAAC
- AAACTTTAAA GTTAGTGACT TTAACTGTT TTTTGTACT GAAACTGATT AAGGTTTTTGA ACTAAGATTG

+ CATATGCAAA AACTTATCTC TATCTTCTC AAAAGTGACA TTCTAAGAAC TTTGCCAAAG TTTTGTTTA
- GTATACGTTT TTAGAAATGAG ATAGAAAGGAG TTTGCACTGT AAGATTCTTG AAACGGTTTC AAAACAAT

+ TCCAACTCTT CACAGAGAAAG TCAAAATCGAT TTAGGATATA AACCTCCGAG AAGCAAAACA AATTCGAGAA
- AAGTTAGAAA GTGTCTCTC AGTTTAGCTA AATCCTATAT TTGGAGGCTC TTCGTTTTGT TTAAGCTCTT

+ GATTTGATTT TTATTTTACC TAATGATTCT CTCAGTGAGA TGGAGCGGGT TGTTCTGAT GCGATGATTG
- CTAAACTAAA AATAAATGG ATTAATAAGA GAGTCACTCT ACCTCGCCC ACAAAGCTA CGCTACTAAC

+ AGAAGAAAGGA GCCATGAGTT TGCTATAGAT CTGTTCAACG ACGAGGTAATA CGCAGAAAGGC ACCAACACCG
- TCTTCTTCTT CGGTACTCAA ACGATATCTA GACAAGTGGC TGCTCCATTT GCGTCTTCCG TGGTGTGGC

+ ATTCCGATAC CTGGAAGTGC GTGTCTCAT TGATTCGATA GCATCGGATG CTTCTCCAC TCATCCCTTC
- TAAGGCTATG GACCTTCAAC CACAGAGTAA ACTAAGCTAT CGTAGCCTAC GAAGGAGGAGT AGTAGGAAAG

+ GCCGAAAAAA TTCACCGGTT GTTCCCAACG GTTTCGCCAT TTTCTCCGGT CTTCTTCGAT TTTTACGTTT
- CGGCCTTTT AAGTGGCCAA CAAGGTTGC CAAAGCGGTA AAAGAGGCCA GAAGAAGCTA AAAATGCAA

+ TTTTCTTCT CTTTAGCTTT GTTGTGTTGT TTTACTGTAT TGAATTATGG GCCTTATTA AAAGCCCATTA
- AAAAGAAAAG GAATCGAAA CAACACAACA AAATGACATA ACTTAATACC CGGAATATT TTCGGGTAT

+ GTATTACTGA GTTTTTAATG GGCCTGATGG GCTTATTGTT TTTAGTTGGC CTTATATATA TATTGGTTCT
- CATAAATGACT CAAAATTAC CCGACTACC CGAATAACAA AAATCAACCG GAATATATAT ATAACCAAGA

+ CCGAGGAACC GGAG
- GGCTCCTTGG CCTC
  
```

- AE-box->part of a module for light response
- TCT-motif->part of a light responsive element
- MYB
- MYB recognition site
- MYC

CMK

```

>PlantCARE_17324
+ TGACTTTGGT GTGACTAGAA TAAAGTTGTT ATGCTTTTAT CTACTGAATA TTTTCATTCA CAAGGATTGA
- ACTGAAACCA CACTGATCTT ATTTCAACAA TACGAAAATA GATGACTTAT AAAAGTAAAG GTTCCTAACT

+ GATTTCTCAA GTTGTGAGAA TTTTCGTAAA TCGAGTAGTT CATATGCATC AACCATATGA TACGGATATT
- CTAAGAGATT CAACACTCTT AAAAGCATTT AGCTCATCAA GTATACGTAG TTGGTATACT ATGCCTATAA

+ CCATAGGTT ATCAACTTTT CACATACAAA AAATGTATAA TTTAGGTGCA TACTTAGAGA TAGTAACTAA
- GGTATCCACA TAGTTGAAAA GTGTATGTTT TTTACATATT AAATCCACGT ATGAATCTCT ATCATTGATT

+ ATATATTATT GTTAAGATGT CAAAAATATA ATTTTAGTTA TTTTACCAAT ATAAGTTCAA ACACAACCAC
- TATATATAAA CAATTCTACA GTTTTTATAT TAAAATCAAT AAAATGGTTA TATTCAAGTT TGTGTTGGTG

+ ATATTTGCAA GAAATGCCAT CGTAAACAAA TACAAAATCT TTTTAAAAAT CTTAACTTAT TCAAAATGAA
- TATAAACGTT CTTTACGGTA GCATTGGTTT ATGTTTTAGA AAAATTTTTA GAATGAAAT AOTTTTTACTT

+ AACATATTTT TATATACAAT GAACAAAATC TTCTCAAATA TCTAAGGGTC TCACCGGTGC AACATTTAGA
- TTGTATAAAG ATATATGTTA CTTGTTTTAG AAGAGTTTAT AGATTCCCAG AGTGGCCACG TTGTAAATCT

+ AGAAAAAAT TTCTGTCAA TTCTTCTAAA CTCACAAGGA GAGAGTAAT ATCTTTTTCA TTTTTTTTTC
- TCTTTTTTAA AAGACAGTTT AAGAAGATTT GAGTGTCTCT CTCTCATTAA TAGAAAAAGT AAAAAAAG

+ TATCAAAGAC AAGTATTTTT TTAGAACAAA AGCTTCTACT TCAAAATGGT GGAAGAAAAC ATATTACTTT
- ATAGTTTCTG TTCATAAAAA AATCTTGTTT TCGAAGATGA AGTTTTACCA CCTTCTTTTG TATAAATGAAA

+ TCCTTTGTGG AAATCTAAAG AATTCAATTG AAAAGATTTT CTTCTAAATA TTGCATATC ATACCTTAAAG
- AGGAAACACC TTTAGATTTT TTAAGTTAAC TTTTCTAAAA GAAGATTTAT AACGTGATAG TATGGAAATTC

+ TTCATCCACA TAAAAACTTT TTAATTAATA ATAATACATT TATTCACATT CAAGGCCGTC TCCACGAAAA
- AAGTAGGTTT ATTTTTGAAA AATTAAATTT TATTATGTA ATAAAGTATA GTTCCGGCAG AGGTGCTTTT

+ TGAAGGTA GTAAATGTTA TGGGTCTATA ATCAATTTTT TGATAAGATT AAGTGTCTA TGTAAAAAC
- ACTTTCATT CATTACAAT ACCCAGATAT TAGTTAAAAA ACTATTCTAA TTCACAGTAT ACTATTTTTG

+ GAATAAGATT TATTTCTTTA TCATAGGAAA GACAAAAAAC ATAATATAA CTATATAGAC CCTCCACAAA
- CTTATCTAA ATAAAGGAAT AGTATCCTTT CTGTTTTTG TATTTATATT GATATATCTG GGAGGTGTTT

+ AAGGATATTA CGGGTCTGAT TGGTTGTCTT ACTTAGCGCA AGAGTTGAAA AAAATACAAG AAGTGTAAAA
- TTCCTATAAT GCCCAGACTA ACCAACAGGA TGAATCGCGT TCTCAACTTT TTTTATGTTT TCACATTTT

+ AGACCGAAG CTAAAAATA AGTAAAAAT ACAATAAAA CGAACATCGA AAAAAACAAA GCGAAAAACT
- TCTGGCTTTT CATTATATT TCATTTTTGA TGTATTTTTT GCTTGTAGCT TTTTGTGTTT AGTTTTTGA

+ CAACAAACAA AGATTCAAGA AGAAACACTG ATTGCGAAT CCGAAGCACA AAAATTTGCA TGAATTTTTCA
- GTTGTGTTT TCTAAGTTCT TCTTTGTGAC TAACGCTTGA TGCTTCTGT TTTTAAACGT ACTAAAAAGT

+ ACTCCAAAGA GTTTGAGTCC TCATCGTTGT TGCAACGAAC AATCCCAAAC CTAGGCCAGT CTTCAAATCG
- TGAGGTTTCT CAAACTCAGG AGTAGCAACA AGGTTGCTTG TTAGGTTTTG GATCCGGTCA GAAGTTTAGC

+ ATATGATAGA GACGCTTACA GCTTCTCTAA AGGTTAAGC AAAAAATGGG ACAATAAAG TGGACTTAA
- TATACTATCT CTGCGAATGT CGAAGAGATT TCCAAATTCG TTTTAAACC TGTTATTTT ACCTGAATTA

+ CATGCAATGC AATATAGAAG ATAAAGAAACA TTTTGAATA ATAACAAGAA AATGCATCAT TTTTAGTAA
- GTACGTTACG TTATATCTT TATTCTTTG AAAAACTTAT TATTGTTCTT TTACGTAGTA AAAATCATT

+ TCATACAAAT GAAGGTTAAC CAGATATCT TCCAAATCCT CACACTTTAT GATTCCTAA AATCTTACCA
- AGTATGTTT CTTCCAAATG GTTCTATAGA AGGTTTAGGA GTGTGAAATA CTAAAGGATT TTAGAATGGT

+ TTGACCAATA TGAATTTTTA GGGCAACTTT CTCAAGTAT TTATGGGATA CAAGTAGTCT TGTGAAAT
- AACTGTTTAT ACTTAAATTT CCCGTTGAAA GAGTTCACTA AATACCCTAT GTTCATCAGA ACAAACTTA

+ GAACGTCCTT CATAAGAGGA TAGCTTTTA TCAAAAATGA TTACACATTT CTGAAAATTA AATTTTATGT
- CTTGCAGGAA GTATTCTCCT ATCAGAAAAT AGTTTTTACT AATGTGTAAA GACTTTTAA TTAATATAA

+ TCAGAGACTT CTGCATATT CATGAAAACC TTTAGCAATG TATGGACATT CTTACACTTG AGTGTGAC
- AGTCTCTGAA ACAGTATAAC GTACTTTTGG AAATCGTTAC ATACCTGTA GAATGTGAA CTACAACGTC

+ TGAAGAAGAG TATCAACGGT AGATTTCAAT AAAAATCCAC TCAACTTTAT CAAAAGCTTT GCTAATATCT
- ACTTCTTCTC ATAGTTGCCA TCTAAAGTTA TTTTLAGGTG AGTTGAAATA GTTTTCGAAA CGATTATAGA

+ TAATTTAAAT GCCACAGAAG ATTGGGTAGC TTTTATAGTA TGCTCTGAA GCACCAATTT GCGATATCAA
- ATTAATTTA CGGTGTCTT TAACCCATCG AAAAAATCAT ACGAGACTTA CGTGGTTAA CGCTATAGTT

+ CATACTATTA GTAATCAATC TACAAAAATA GAAACAGACT GAAGTTTATG AAATATATA AATGAGCTTA
- GTATGATAAT CATTAGTTAG ATGTTTTTAT CTTTGTCTGA CTTCAAATAC TTTAATATG TTACTCGAAT

+ GAAATAGCT TATACGCAGC GTTGCATAG CTTATCATCC TATAATCTAT AACCCCAAT GAAGCCTCAG
- CTTTATTCGA ATATGCGTCG CAACGTATTC GAATAGTAGG ATATTAGATA TTGGGGTTAA CTTGCTAGTC

+ TTTGGAGATT AATAAAGAAA AGAGATTAG CCAAATGGT AAAGGATAGT TATTGTAGTT GACTAATGA
- AAACCTCTAA TTATCTCTT TCTCTAATCC GGTAAACCA TTTCTATCA ATAAATCAA CTGATTAAT

+ ATTTGCTACC TAAAGTGCC AAATGTCATA GAGATGAAA AATGTGCTAT TGGCCCAAT TCTCTATACA
- TAACAGATGG ATTTACAGT TTTACAGTAT CTCTACTTTT TTACACGATA ACCCGTTAA AGAGATATGT

+ AAAACATTTT GATTTTTTGT TAGAATGGG CTGATTTTA TAAAAAAA AAAAATAGGT GACATATCAG
- TTTTGTAAA CTAAAAACA ATCTTAAACC GACTAAGAA ATTTTTTTTT TTTTATCCA CTGTATAGTC

+ ATC
- TAG

```

- MYB
- MYC
- MyC
- GATA-motif->part of a light responsive element
- GT1-motif->light responsive element
- TCT-motif->part of a light responsive element

MDS

```

>PlantCARE_17604
+ TCTCTTCTA ATTTCCGGC GATTGAATGG AGACAATGCG TCGCCGTTTT TCAAAAGCGG TCGGGAAGAG
- AAGAGAAGAT TAAAAGGCCG CTAACCTACC TCTGTACGC AGCGGCAAAA AGTTTTCGCC ACGCCTTCTC

+ AAGAGTGGCG GAGGAAGTTT AGAGAACTG GAACAGAAAA CCTAAAGCGA AGAAGTGTAG AGTAAAACCTC
- TTCTCACCCG CTCCTTCAAA TCTCTTTGAC CTTGTCTTTT GGATTTTCGCT TCTTACTACTC TCATTTTGAG

+ CTCTACACGT GGTCTTTAGT AAACCTCAGT GGATATGTAA CATGATCGAC GGTCGAGAGT TTATCATATT
- GAGATGTGCA CCAGAAATCA TTTGAAGTCA CCTATACATT GTACTAGCTG CCAGCTCTCA AATAGTATAA

+ TTAATGGCCG TTTAGGAAGG AAAGGCCCAA TAAAGAAATG AATATTTCCA CCACAGAATT ATGAATTGAG
- AATTACCCG AAATCCTTCC TTTCCGGGTT ATTTCTTTC TATATAAGGT GGTGTCTTAA TACTTAACTC

+ TAAACCAGAA AATCGAAGAA GAACGGC
- ATTTGGTCTT TTAGCTTCTT CTTGCCG

```

G-box->cis-acting regulatory element involved in light responsiveness

HDS

```

>PlantCARE_17772
+ TCTGAATCAT CTGATCTGAC TTGCAAAAAT TTGAGGTTTT GCTTTGGTTC TTAATAAAAT TTTGATATTG
- AGACTTAGTA GACTAGACTG AACGTTTTTA AACTCCAAAA CGAAACCAAG AATGATTTAA AACTATAAC

+ GGTAAAGATA TGTTTGTGTT TAGTGCAATA CGAGAAGATT GTTAGTGTG AGGGGGTATG CTAATGCTAC
- CCAATTCAT ACAACA AAAATCACGTTAT GCTCTTCTAA CAATCACAAC TCCCCCATA CATTACGATG

+ CTCCCATTC CATGGTACGC ATGTGTAATT TGAAGAACT TGGTGGACCA TTTCGTAATT TTTACTTAAG
- GAGGGTAAGG GTACCATGCG TACACATTA ACTTCTTTGA ACCACCTGGT AAAGCATTA AAATGAATTC

+ TTTCTTATTA TTGCTCCATT TGGAAATTA ACTTTGTGT AATCTTATTA AAAAATTATC AAATATTAGT
- AAAGAATAAT AACGAGGTAA ACCTTTAATT TGAACAACA TTAGAATAAT TTTTAATAG TTTATAATCA

+ GGAATTTTT CCTATTTTT AGAACAATAT TTGTTGTATC CATATCTTT TCTTATAAG GTGTCAATTT
- CCTTAAAAA GGATAAAAA TCTTTTATA AACACATAG GTATAAGAAA AGAATATTTC CACAGTAAA

+ TTCAATAGAG GAAAATCTCA TTAATTTTTG TATATAGGGG TCAAAGTTGA AGAAAAGGAT AAATAGAGGA
- AAGTTATCTC CTTTTAGAGT AATTA AAAAC ATATATCCCC AGTTTCAACT TCTTTTCTTA TTTATCTCCT

+ CCTCAAAATT TCATTTTCCA CGTATCCGTG CTCTAATTTT ATTCCACTTC TGCTAAAAA TTTGGACTAT
- GGAGTTTTAA AGTAAAAGET GCATAGGCAC GAGATTAAAA TAAGGTGAAG ACGATTTTGT AAACCTGATA

+ AAATGCTGG TTGGTCTGG CTGTTTGTG GCAACACTTG TGCTAAAACG TTTTATCCTG AGTTTCTTTC
- TTTACAGACC AACCAGAACC GACAAACAAA CGTTGTGAAC ACGATTTTGC AAAATAGGAC TCAAAGAAAG

+ ACCATCCAGC TTCATTTGTG AAAAATCGTC AATCCCTCFC AAACCTCTCT CACCATAAT TTCTTCTCT
- TGGTAGGTCG AAGTAAACAC TTTTTCAGC TTAGGGAGAG TTTGAGAAGA GTGGTGATTA AAGAAGGAGA

+ GGAACATTC CTCTCTATT ATTTTGATTC CCTTGGCCTC AACACTGGT TCTCAATTGC ATGATCTTGG
- CCTTGTAAAG GAAGAGATA TAAAACCTAAG GGAACCGGAG TTGTGACCAA AGAGTTAACG TACTAGAACC

+ CTCGTCTTCA GGTACTGTTG TTTCATACCT TAGAGAATCT CAAATGGTT CTGGGCTCG GTTTGATTAG
- GAGCAGAAGT CCATGCAAC AAGTATGGA ATCTCTAGA GTTTAACCAA GAACCCAGAC CAAACTAATC

+ TTTCTGTGTT ATTTCAAGGG GGAACGAAGA CAATTTAGCT GGGTAATTCT GGGTTTTGCG GAATTTTGGT
- AAAGACAAA TAAAGTTCCC CCTTGTCTCT GTTAAATCGA CCCATTAAGA CCCAAAACGC CTTAAAACCA

+ TGATTTTTGC GTCAGAATCA GAATTTGAAG CTAAAAGAG TTCTGCTTTG ATTATCCAAT TGCCATGATC
- ACTAAAACG CAGTCTTAGT CTTAACTTC GATTTTCTFC AAGACGAAAC TAATAGGTTA ACGGTACTAG

+ TTTACAGTA ACCAAAATGG ATTTATGAAG AATATCAAAT TCAGCTAAT TTGCTCTGTG CCTATGCAGT
- AAAGTGTAT TGTTTTTACC TAAACTATTC TTATAGTTTA AGTCGATTAA AACGAGACAC GGATACGTCA

+ TACTTTGATT CA
- ATGAAACTAA GT

```

- AE-box->part of a module for light response
- MYB
- G-box->cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
- MYC
- TCT-motif->part of a light responsive element
- Myb
- GT1-motif->light responsive element

HDR

```

>PlantCARE_18020
+ TAACTCTTAT GGAATTGGTA ACAGTTGACT TGATCTTGGC ATAAACTAGC TTAAGAGTTA AGGGGGCTTG
- ATTGAGAATA CCTTAACCAT TGTCAACTGA ACTAGAACCG TATTTGATCG AATTCTCAAT TCCCCCGAAC
+ TTTTGTTATA ACATATGGGC CTATAAAAGC AGCCGCATTT CTTAAGCCCA TGTGATTTTC TTACATCTAC
- AAAACAATAT TGTATACCCG GATATTTTTCG TCGGCGTAAA GAATTCGGGT ACACTAAAAG AATGTAGATG
+ AAGTCTCTGT TTTTTTTTTT TATTCACGTC TTAACGGATT ACTTTTGTCC AAATCATTTA AGATCAGCAG
- TTCAGAGACA AAAAAAAAAA ATAAGTGCAG AATTGCCTAA TGAAAACAGG TTTAGTAAAT TCTAGTCGTC
+ ACTTATTGCC TGTGACGATT ATCAATTCAT TCTATATTTT TCCTTGTTTT GTACGACACT TAACCTATCC
- TGAATAACGG ACGACTGCTAA TAGTTAAGTA AGATATAAAA AGGAACAAAA CATGCTGTGA ATTGGATAGG
+ AATGATTTGC ACACACAAAA AAAAAAAAAA CCTATCCAAT GACTACATTT TCTATGTATG TATGTTATTG
- TTAATAACG TGTGTGTTTT TTTTTTTTTT GGATAGGTTA CTGATGTAAA AGATACATAC ATACAATAAC
+ TCAATGAAAA ATATGCCATT CTCAAAAATG AATATTCTTG TTTTTATTAC AATTTTTATT AATATCCATG
- AGTACTTTTT TATACGGTAA GAGTTTTTAC TTATAAGAAC AAAAATAATG TTAAAAATAA TTATAGGTAC
+ ATACATGTGT AGTTGACAAG GTGACAACCTC AGAATCTTAT ATTCACACCA ATCACACATC ATTAAGAAA
- TATGTACACA TCAACTGTTC CACTGTTGAG TCTTAGAATA TAAAGTGTGGT TAGTGTGTAG TAATTTCTTT
+ AGAGTTTAAAC CATAAATTTG CGACTTCAAG AGACTTTCAC TTTGCGGACC CAATTTTTTT TTTTTTGTGG
- TCTCAAAATTG GTATTTAAAC GCTGAAGTTC TCTGAAAGTG AAAGCGCTGG GTTAAAAAAA AAAAAACACC
+ CGTAGGTACG CTCTTTTAGT AGGATGTCTC TTCCCATAT TTTCTCACCA AATATGAAAT CAAATCCCAT
- GCATCCATGC GAGAAAATCA TCCTACAGAG AAGGGTAATA AAAGAGTGGT TTATACTTTA GTTTAGGGTA
+ AAAAAAATA AGACATAAAA AATTACACAT GTCCAATTCC AAGTGGTTCG TTGCATTTTA CACTAATTCC
- TTTTTTTTAT TCTGTATTTT TTAATGTGTA CAGGTTAAGG TTCACCAAGC AACGTAATAA GTGATTAAGG
+ CAAATACATT TCCTTGTCAT TTATCCAAAA ACATATTAAT TCAATTTTTT TTTTTTTTTT TGACATCTCT
- GTTTATGTAA AGGAACAGTT AATAGGTTTT TGTATAATTA AGTTAAAAAA AAAAAAAAAA ACTGTAGAGA
+ ATTTTTTTTT TTTATTATAA ATGTGGAAGA GGCTCTGAGA TAACTCGTGG ACCAAAATCG TCCATTGAAG
- TAAAAAAA AAATAATATT TACACCTTCT CCGAGACTCT ATTGAGCACC TGGTTTTAGC AGGTAACCTC
+ TGAACAGTCA GCATCGTTTT GCTTGCTTGT GCGTTTCTCT CGAACTCTC
- ACTTGTCACT CGTAGCAAAA CGAACGAACA CGCAAAGAGA GCTTGAGAG

```

- GT1-motif->light responsive element
- MYB
- GATA-motif->part of a light responsive element
- Myb

Anexo 5. PCR sobre DNA genómico de plantas transgénicas.

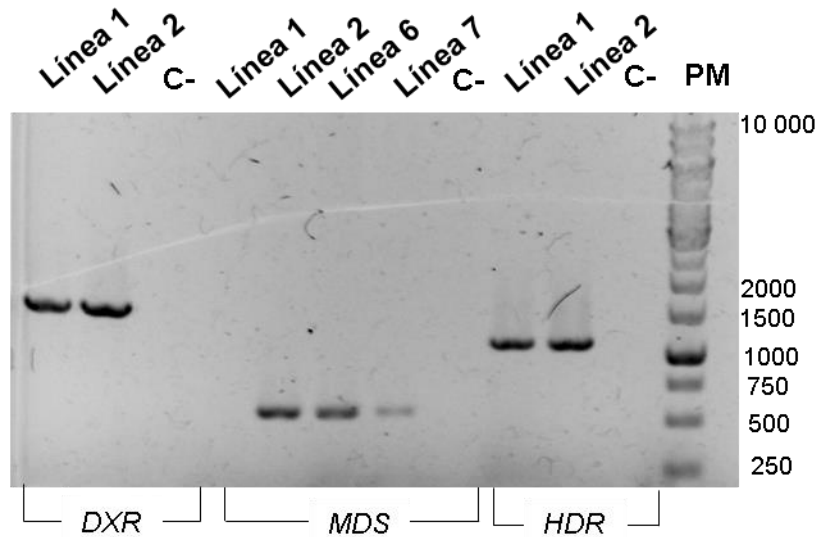


Figura 1. Confirmación de la presencia de las construcciones de interés en el genoma de las plantas resistentes a MSO de la generación T1 resultado de la transformación de *Arabidopsis*. De izquierda a derecha, se muestra la presencia del fragmento de 1477 pb que incluye parte de la región reguladora de *DXR* y parte del gen de la luciferasa para dos líneas transgénicas de *pDXR::LUC*. Se muestra que la línea 1 de *pMDS::LUC*, no porta el transgene, en cambio en las líneas 2, 6 y 7 amplifican para el fragmento 659 pb correspondiente a la región reguladora de *MDS* y parte del gen de la luciferasa. Se muestra la presencia del fragmento amplificado de 1129 pb, que incluye parte de la región reguladora de *HDR* y parte del gen de la luciferasa, de las líneas transgénicas 1 y 2 de *pHDR::LUC*. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, los transgenes amplificaron con oligonucleótidos específicos (ver tabla 1). En el control negativo (C-) no se usó templado para la reacción.

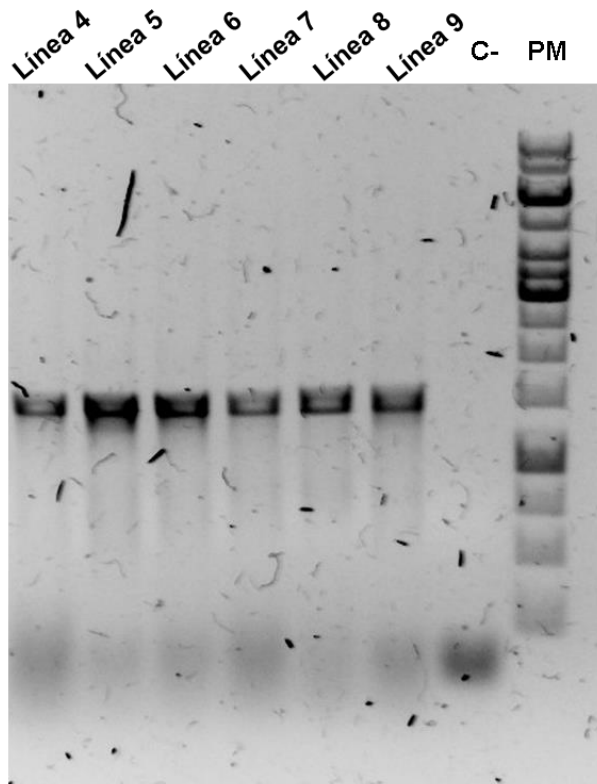


Figura 2. Confirmación de la presencia de la construcción *pDXR::LUC* en el genoma de las plantas de la generación T1 resistentes a MSO. Se muestra que la línea 4, la línea 5, la línea 6, la línea 7, la línea 8 y la línea 9 de *pDXR::LUC* amplifican para el fragmento de 1477 pb, que incluye parte de la región reguladora de *DXR* y parte del gen de la luciferasa. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio de transgenes amplificados con oligonucleótidos específicos (ver tabla 1). En el C- no se usó templado para la reacción.

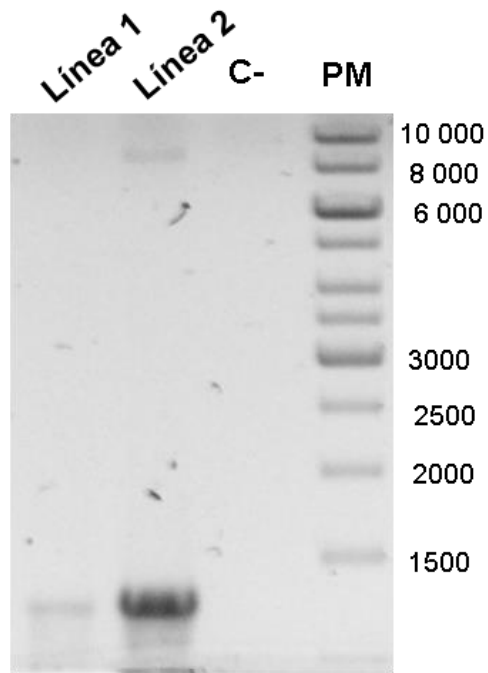


Figura 3. Confirmación de la presencia de la construcción *pMCT::LUC* en el genoma de las plantas de la generación T1 resistentes a MSO. Se muestra que la línea 1 y la línea 2 de *pMCT::LUC* amplifican para el fragmento de 1245 pb, que incluye parte de la región reguladora de *MCT* y parte del gen de la luciferasa. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de. El transgene se amplificó con oligonucleótidos específicos (ver tabla 1). En el C- no se usó templado para la reacción.

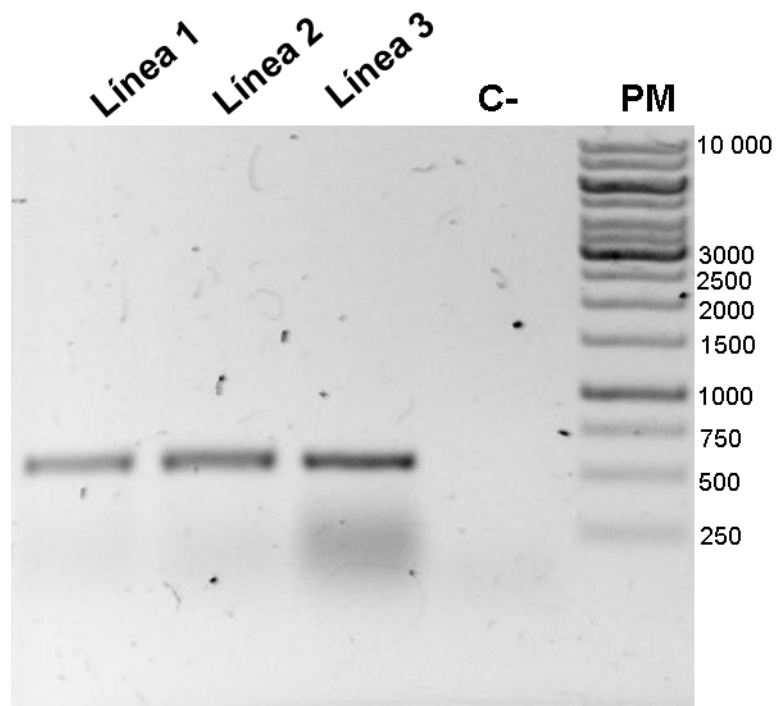


Figura 4. Confirmación de la presencia de la construcción p*CMK::LUC* en el genoma de las plantas de la generación T1 resistentes a MSO. Se muestra que la línea 1, la línea 2 y la línea 3 de p*CMK::LUC* amplifican para el fragmento de 620 pb, que incluye parte de la región reguladora de *CMK* y parte del gen de la luciferasa. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. El transgene se amplificó con oligonucleótidos específicos (ver tabla 1). En el C- no se usó templado para la reacción.

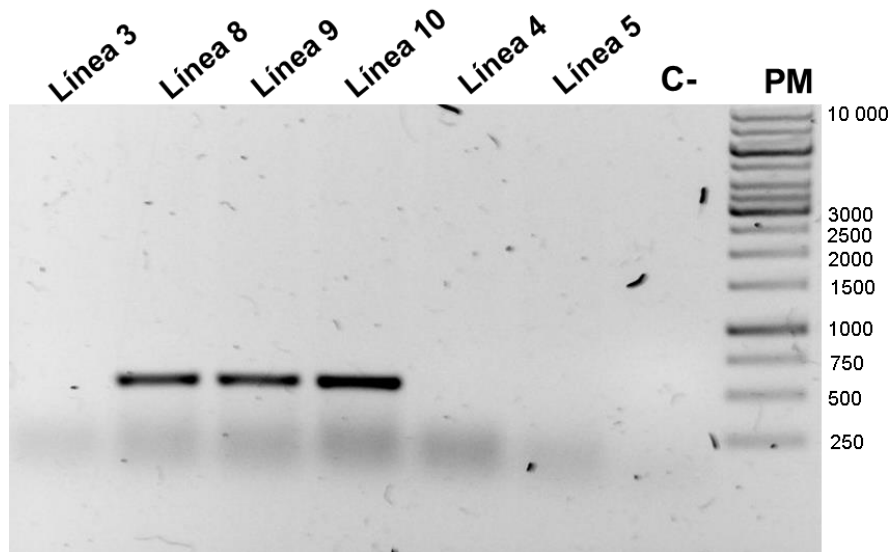


Figura 5. Confirmación de la presencia de la construcción *pMDS::LUC* en el genoma de las plantas de la generación T1 resistentes a MSO. Se muestra que la línea 8, la línea 9 y la línea 10 de *pMDS::LUC* amplifican para el fragmento de 659 pb, que incluye a la región reguladora de *MDS* y parte del gen de la luciferasa, mientras que las líneas 3, 4 y 5 no portan el transgene. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. El transgene se amplificó con oligonucleótidos específicos (ver tabla 1). En el C- no se usó templado para la reacción.

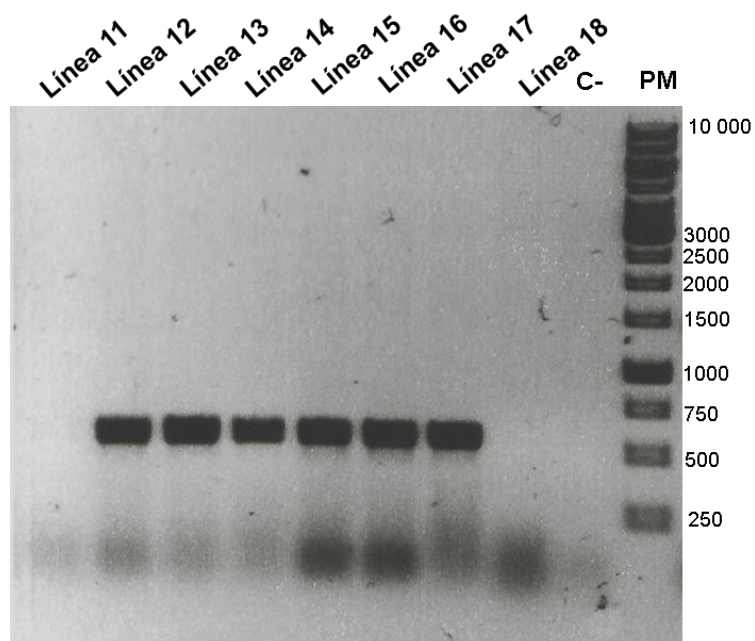


Figura 6. Confirmación de la presencia de la construcción *proMDS::LUC* en el genoma de las plantas de la generación T1 resistentes a MSO. Se muestra que la línea 12, la línea 13, la línea 14, la línea 15, la línea 16 y la línea 17 de *proMDS::LUC* amplifican para el fragmento de 659 pb, que incluye a la región reguladora de *MDS* y parte del gen de la luciferasa. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio de transgenes amplificados con oligonucleótidos específicos (ver tabla 1). En el C- no se usó templado para la reacción.

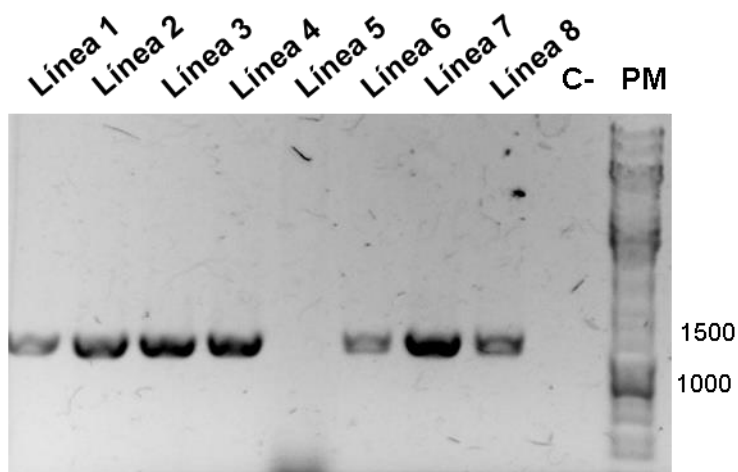


Figura 7. Confirmación de la presencia del transgene *pHDS::LUC* en el genoma de las plantas de la generación T1 resistentes a MSO. Se muestra que la línea 5 de *pHDS::LUC*, no porta el transgene, mientras que todas las demás líneas amplifican el fragmento de 1245 pb, que incluye a la región reguladora de *HDS* y parte del gen de la luciferasa. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. El transgene se amplificó con oligonucleótidos específicos (ver tabla 1). En el C- no se usó templado para la reacción.

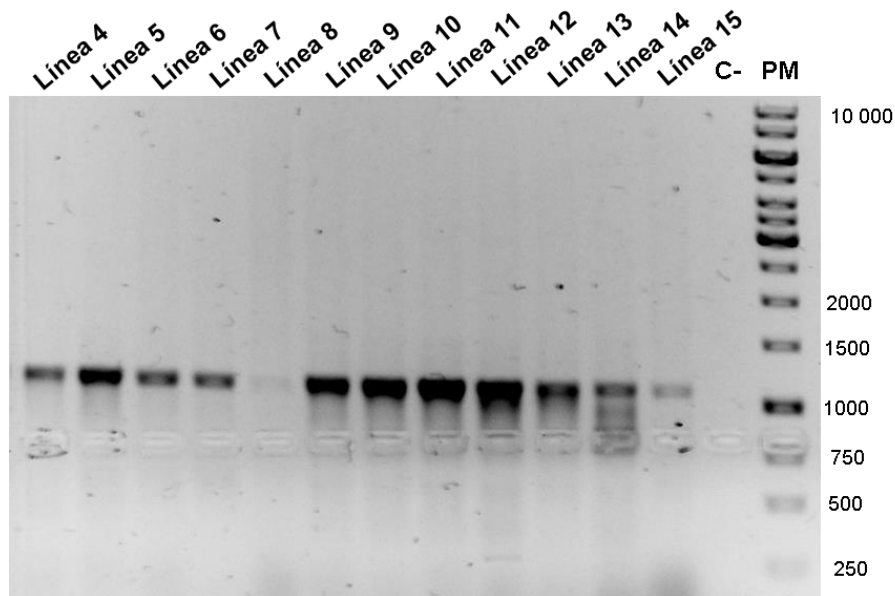


Figura 8. Confirmación de la presencia del transgene *pHDR::LUC* en el genoma de las plantas de la generación T1 resistentes a MSO. Se muestra que la línea 8 de *pHDR::LUC*, no porta el transgene, mientras que todas las demás líneas amplifican el fragmento de 1129 pb, que incluye parte de la región reguladora de *HDS* y parte del gen de la luciferasa. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. El transgene se amplificó con oligonucleótidos específicos (ver tabla 1). En el C- no se usó templado para la reacción.

Anexo 6. Análisis de la segregación de la resistencia a MSO en semillas de la generación T2 de líneas transgénicas.

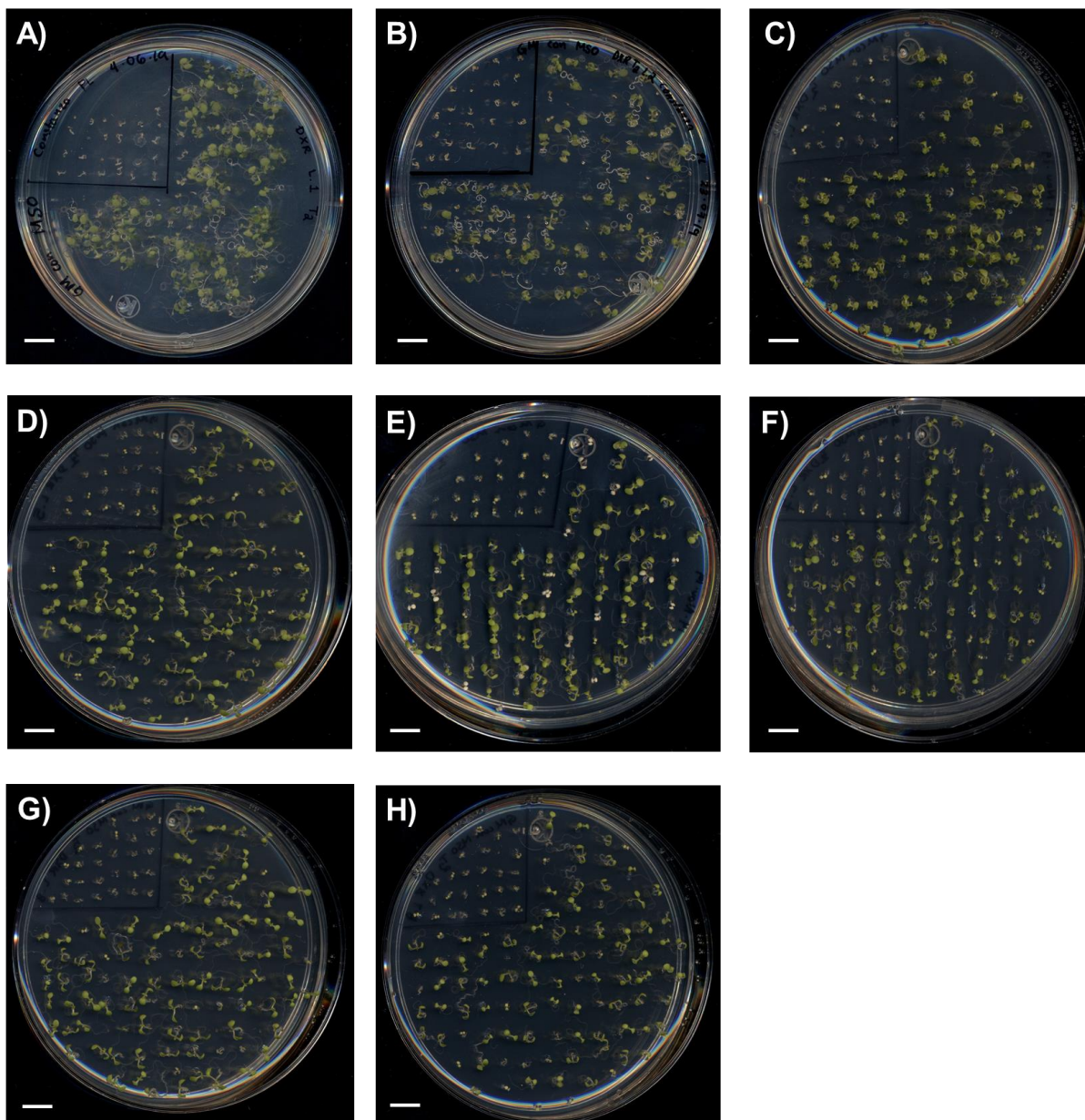


Figura 1. Análisis de la segregación de la resistencia a MSO en semillas de líneas de *pDXR::LUC*, generación T2. Se observa en A) Línea 1 $X^2=0.35$, B) Línea 2 $X^2=0.35$, C) Línea 4 $X^2=0.0000029$, D) Línea 5 $X^2=0.45$, E) Línea 6 $X^2=0.85$, F) Línea 7 $X^2=0.95$, G) Línea 8 $X^2=0.007$, H) Línea 9 $X^2=0.63$. La barra de color blanco en las fotos es la escala de 1 cm.

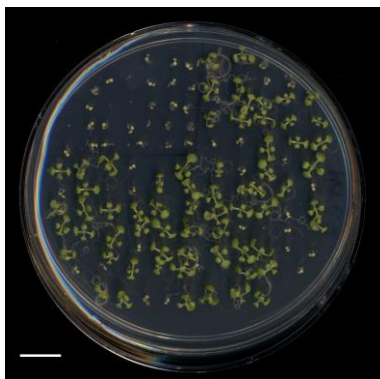


Figura 2. Análisis de la segregación de la resistencia a MSO en semillas de la línea 2 de *pMCT::LUC*, generación T2. Se observa Línea 2 $\chi^2=0.71$. La barra de color blanco en las fotos es la escala de 1 cm.

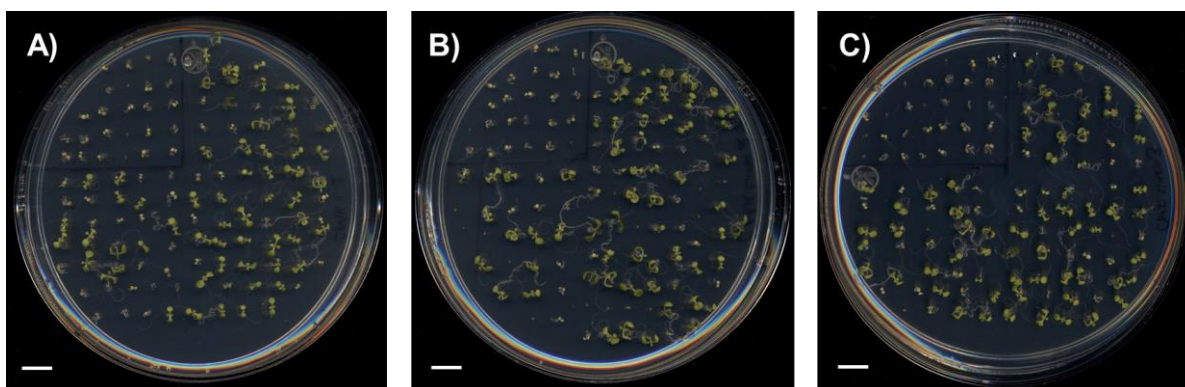


Figura 3. Análisis de la segregación de la resistencia a MSO en semillas de líneas de *pCMK::LUC*, generación T2. Se observa en A) Línea 1 $\chi^2=0.074$, B) Línea 2 $\chi^2=0.34$, C) Línea 3 $\chi^2=0.22$. La barra de color blanco en las fotos es la escala de 1 cm.

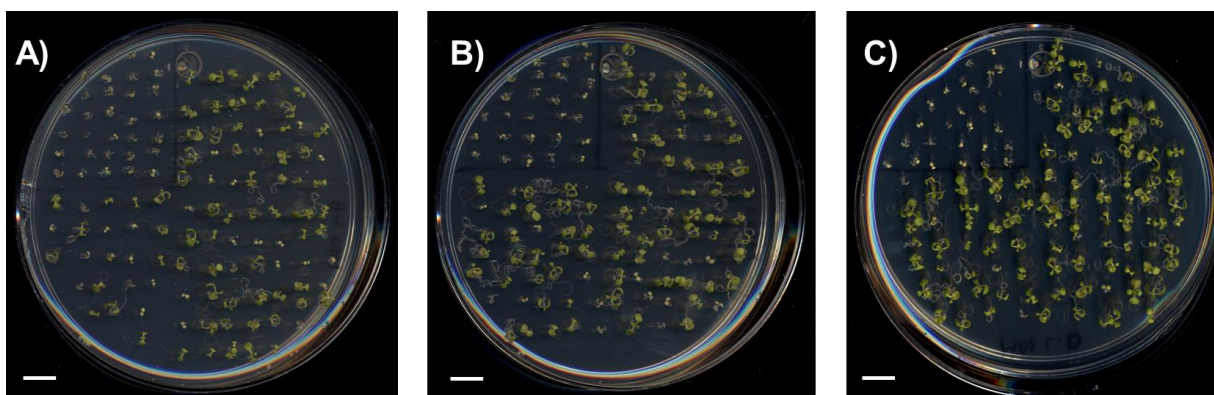


Figura 4. Análisis de la segregación de la resistencia a MSO en semillas de líneas de *pMDS::LUC*, generación T2. Se observa en A) Línea 8 $\chi^2=0.23$, B) Línea 9 $\chi^2=0.76$, C) Línea 10 $\chi^2=0.004$. La barra de color blanco en las fotos es la escala de 1 cm.

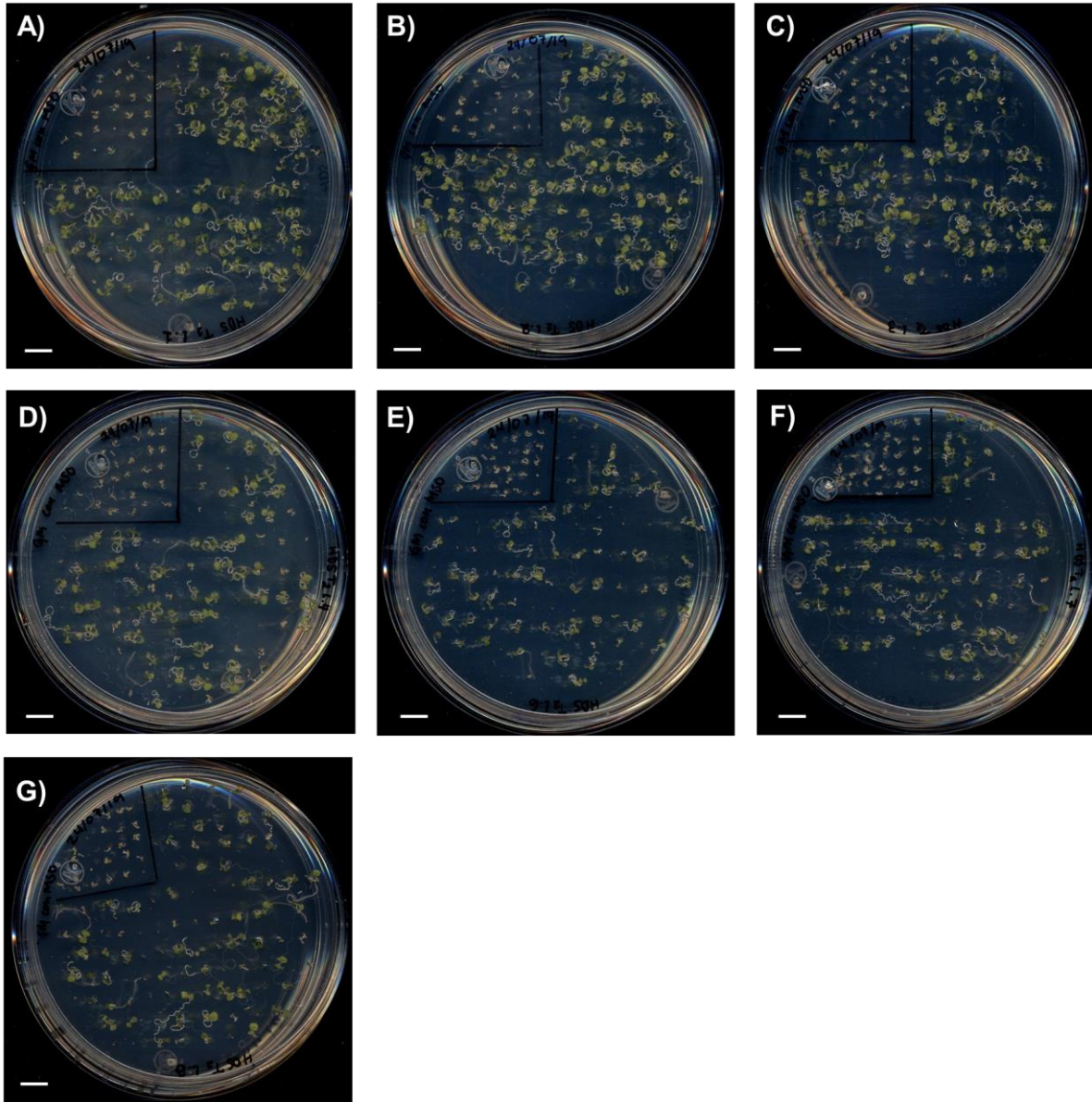


Figura 5. Análisis de la segregación de la resistencia a MSO en semillas de líneas de *pHDS::LUC*, generación T2. Se observa en A) Línea 1 $X^2=0.24$, B) Línea 2 $X^2=0.24$, C) Línea 3 $X^2=0.32$, D) Línea 4 $X^2=0.00011$, E) Línea 6 $X^2=0.0000000008$, F) Línea 7 $X^2=0.36$, G) Línea 8 $X^2=0.0000003$. La barra de color blanco en las fotos es la escala de 1 cm.

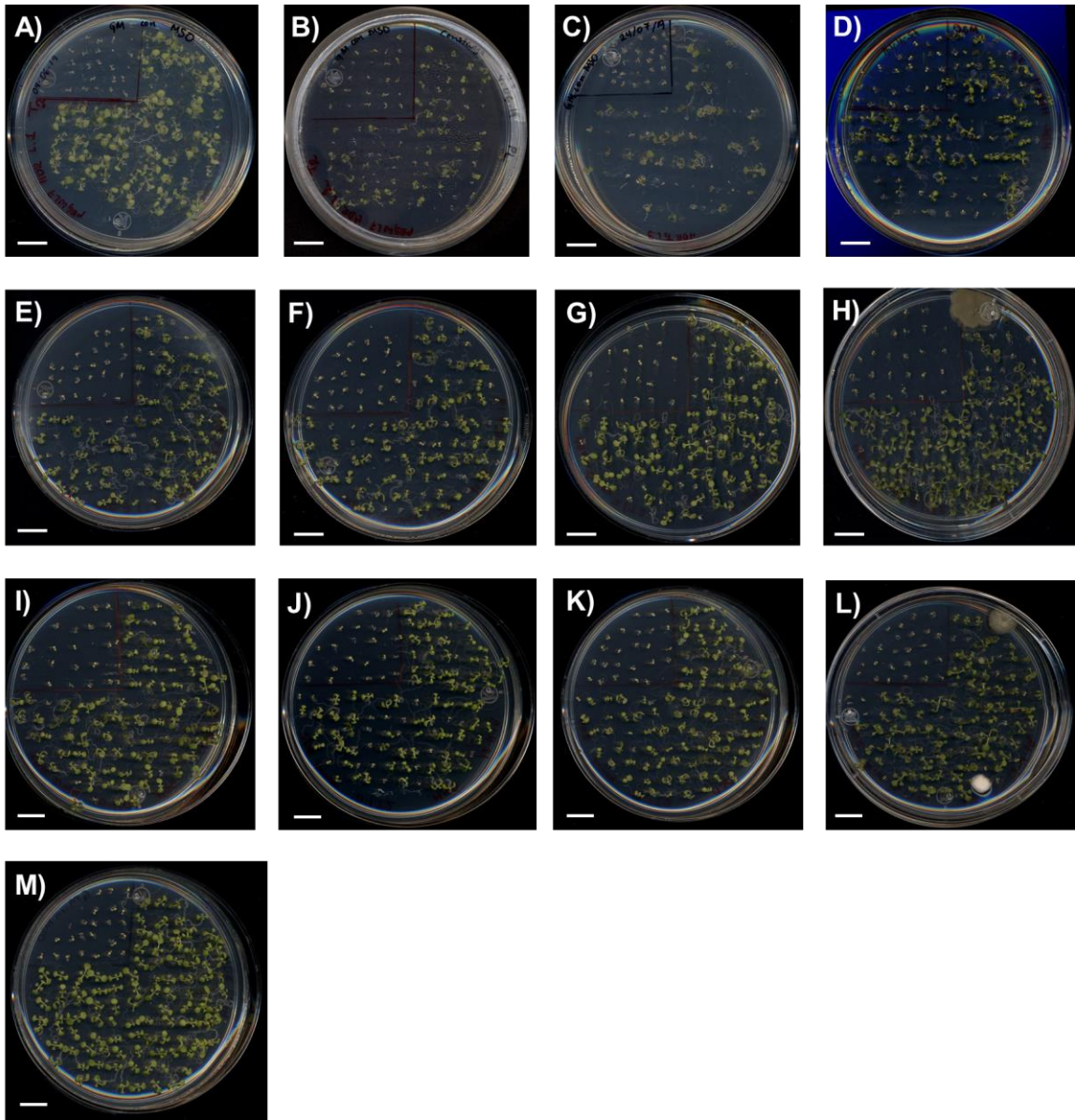
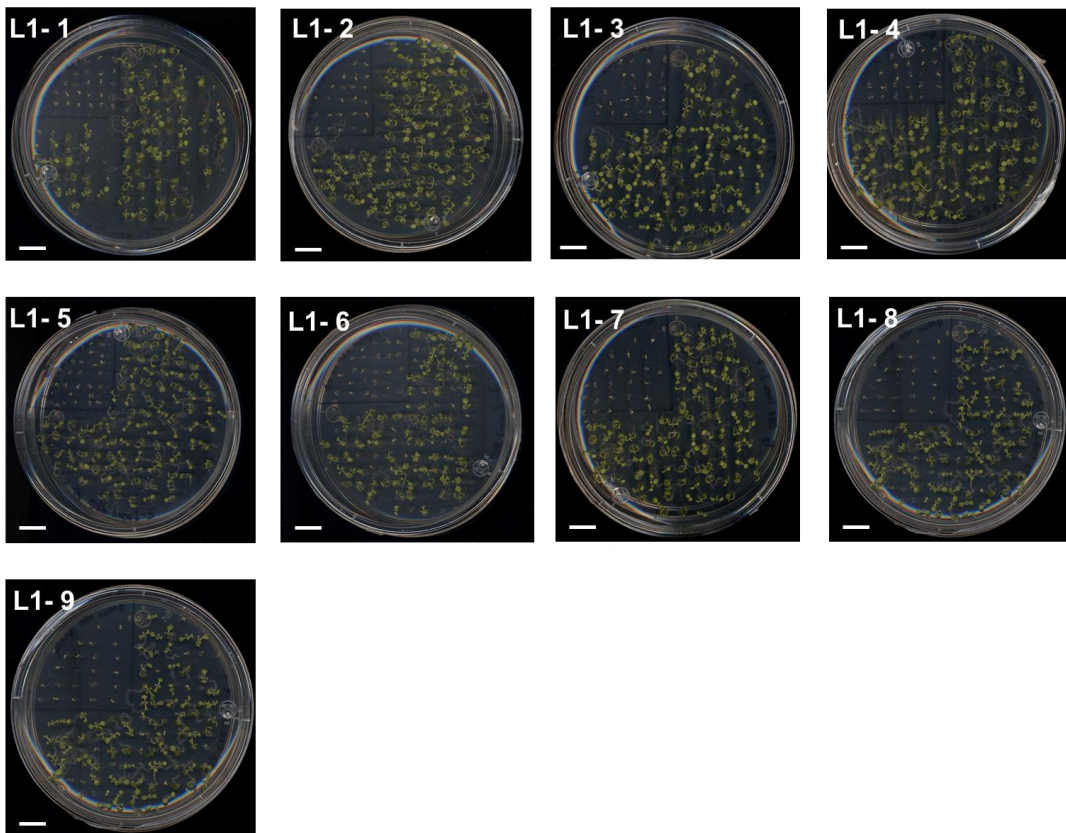


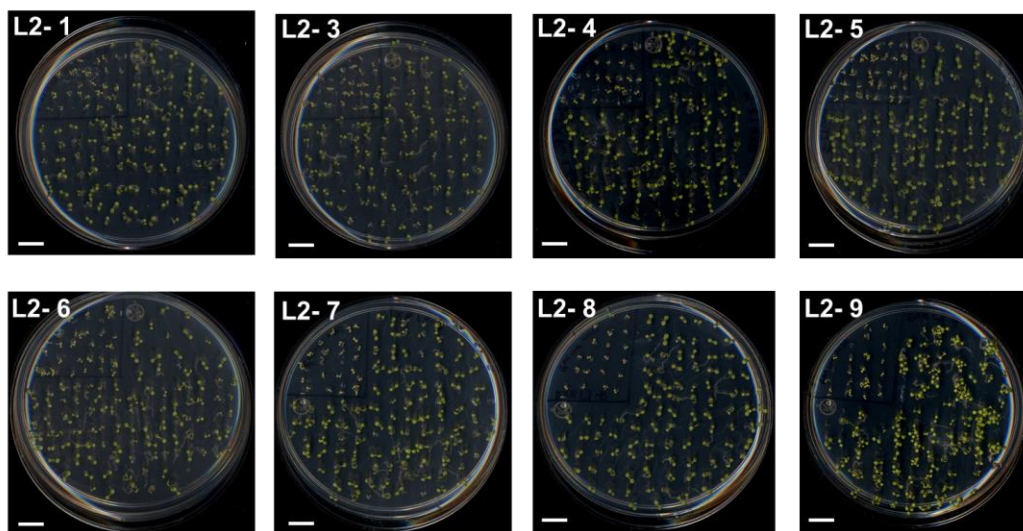
Figura 6. Análisis de la segregación de la resistencia a MSO en semillas de líneas de *pHDR::LUC*, generación T2. Se observa en A) Línea 1 $X^2=0.32$, B) Línea 2 $X^2=0.00001$, C) Línea 3 $X^2=0.0001$, D) Línea 4 $X^2=0.00000005$, E) Línea 5 $X^2=0.63$, F) Línea 6 $X^2=0.26$, G) Línea 7 $X^2=0.86$, H) Línea 9 $X^2=0.37$, I) Línea 10 $X^2=0.0011$, J) Línea 11 $X^2=0.48$, K) Línea 12 $X^2=0.00001$, L) Línea 13 $X^2=0.208$, M) Línea 14 $X^2=0.00000007$. La barra de color blanco en las fotos es la escala de 1 cm.

Anexo 7. Determinación de líneas transgénicas homocigotas y heterocigotas en semillas de la generación T3 por la resistencia a MSO.

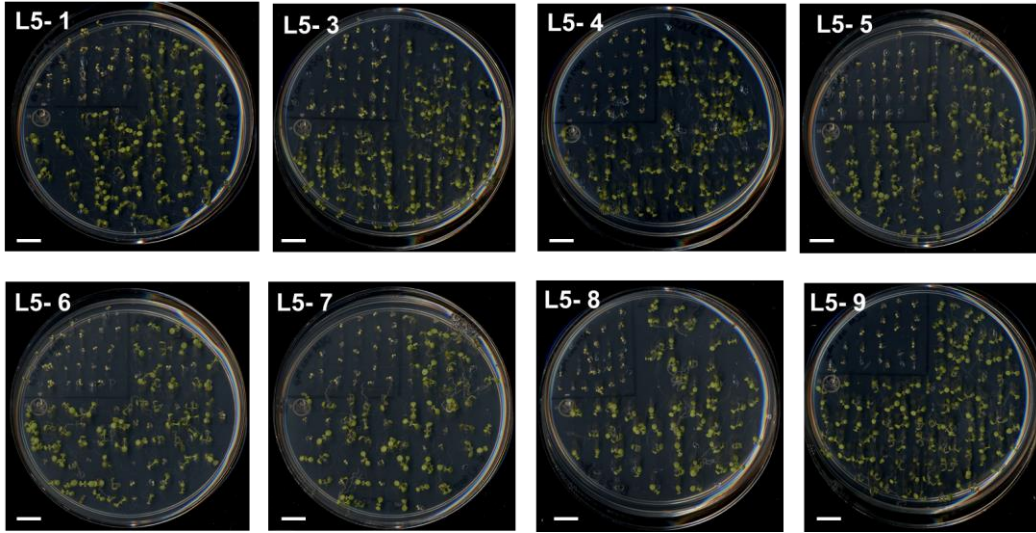
***pDXR::LUC* Línea 1**



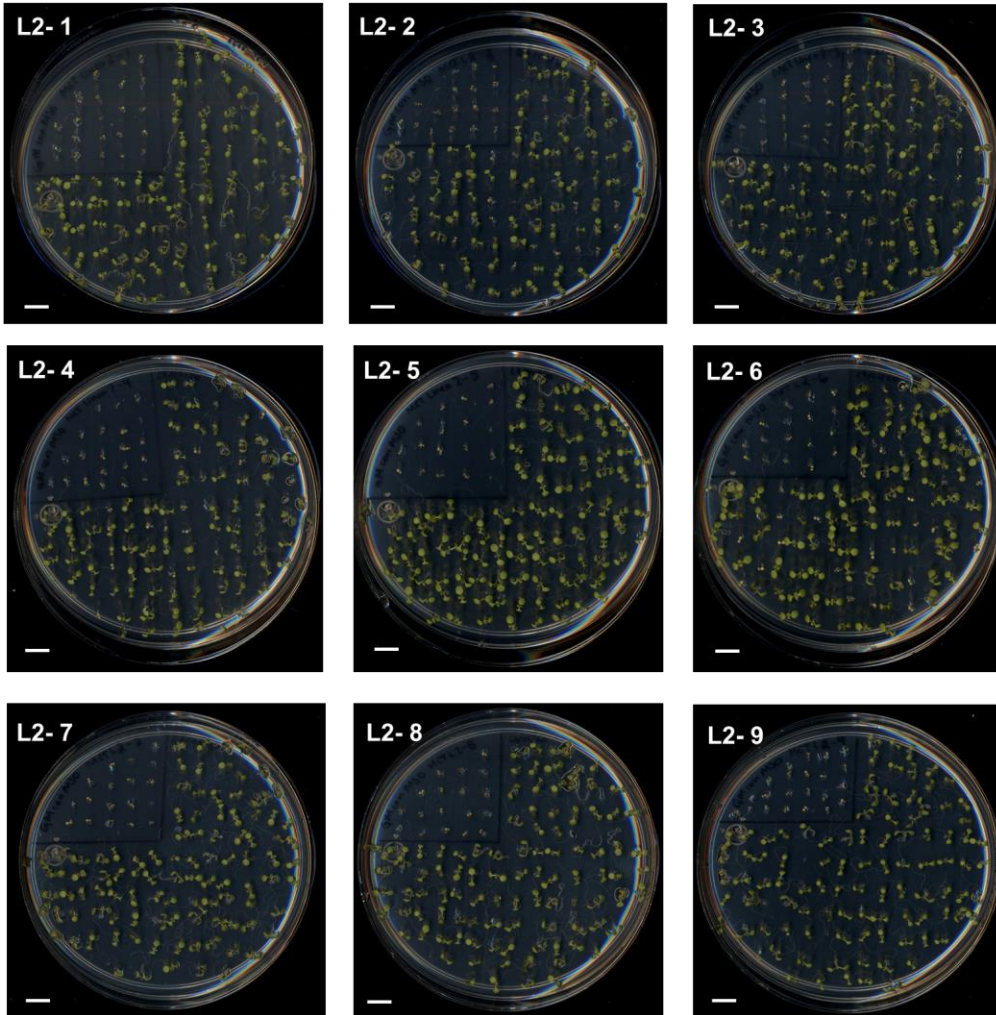
***pDXR::LUC* Línea 2**



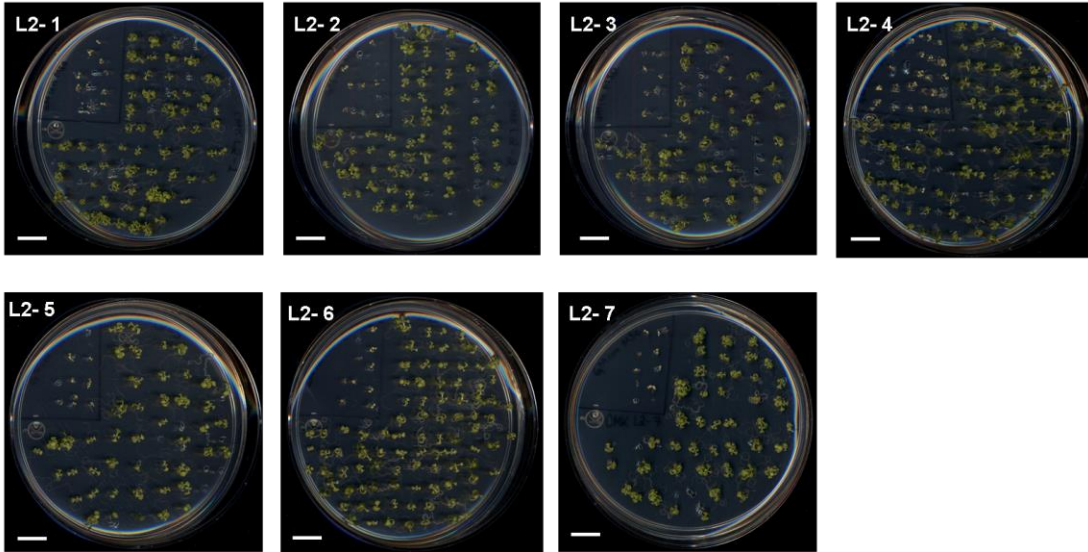
pDXR::LUC Línea 5



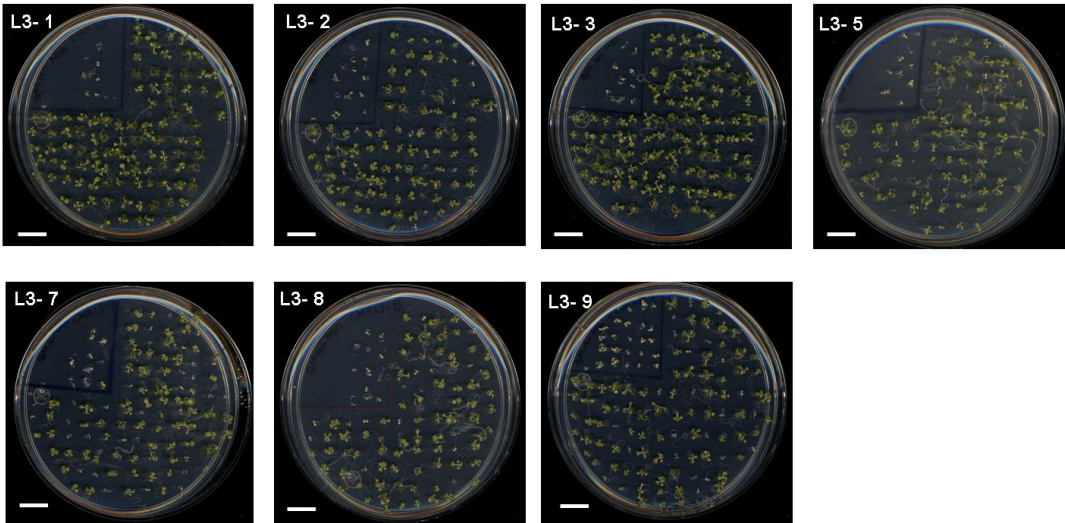
pMCT::LUC Línea 2



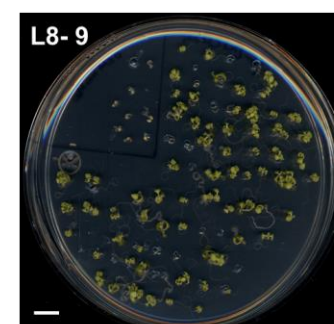
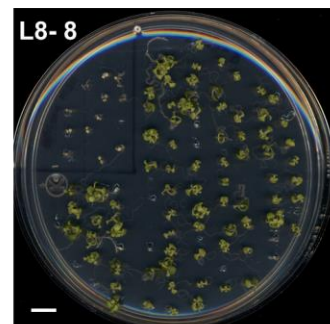
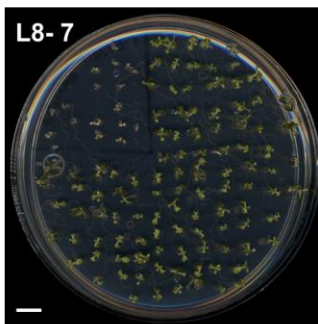
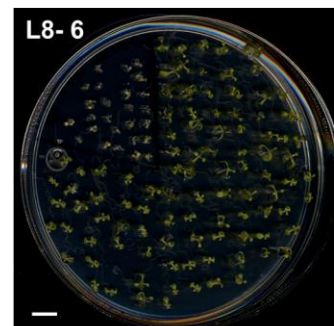
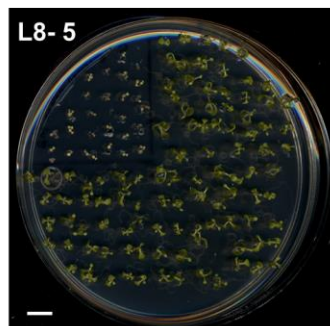
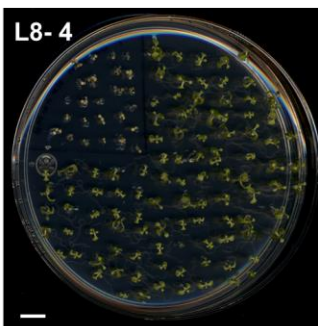
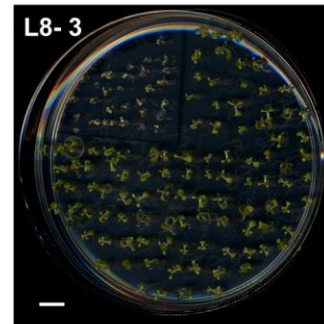
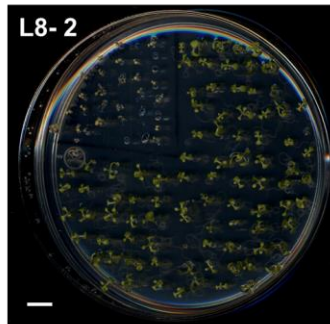
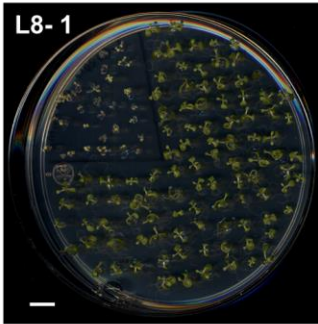
pCMK::LUC Línea 2



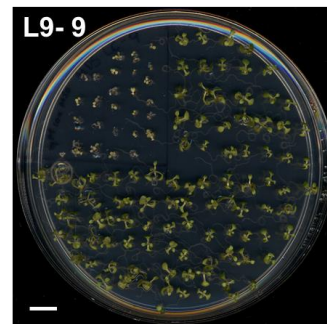
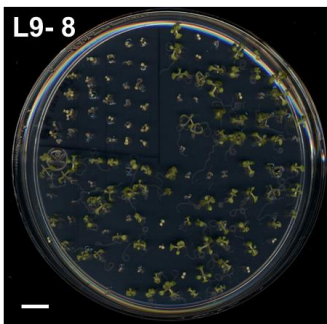
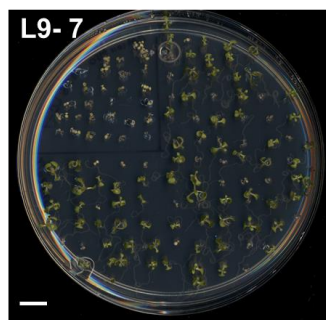
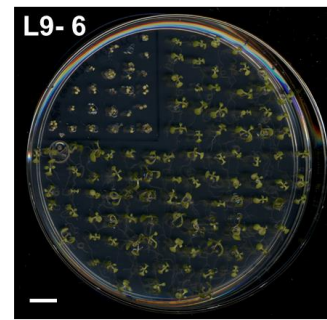
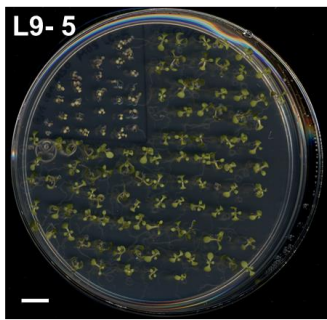
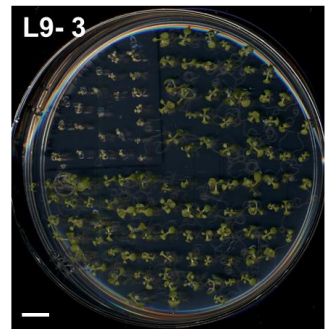
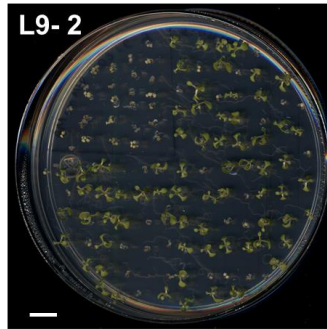
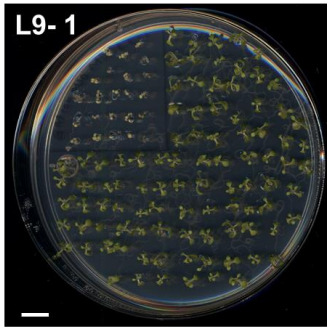
pCMK::LUC Línea 3



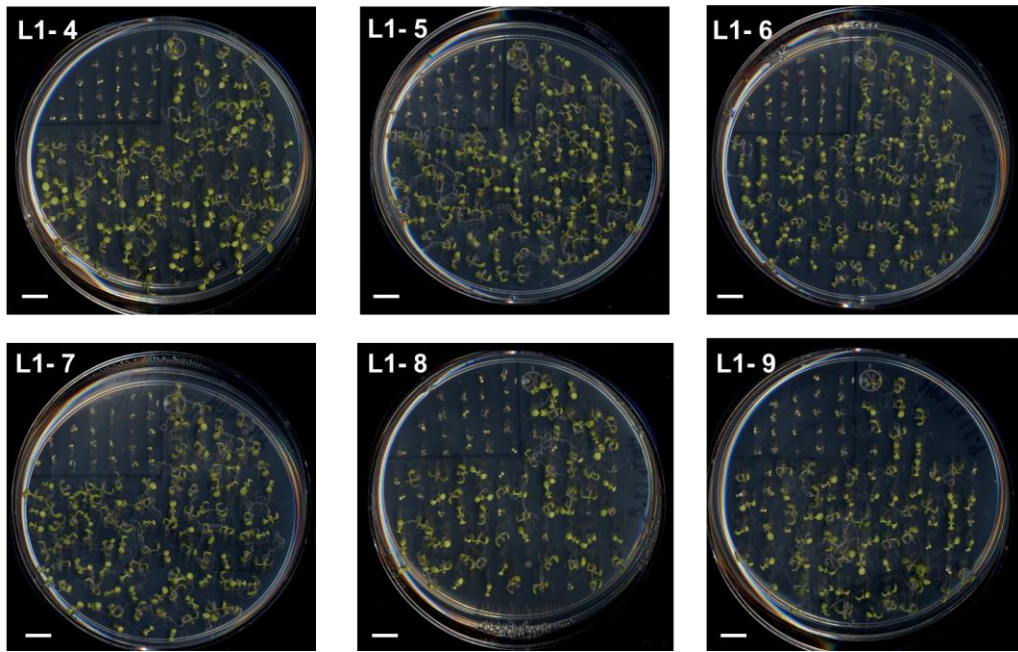
pMDS::LUC Línea 8



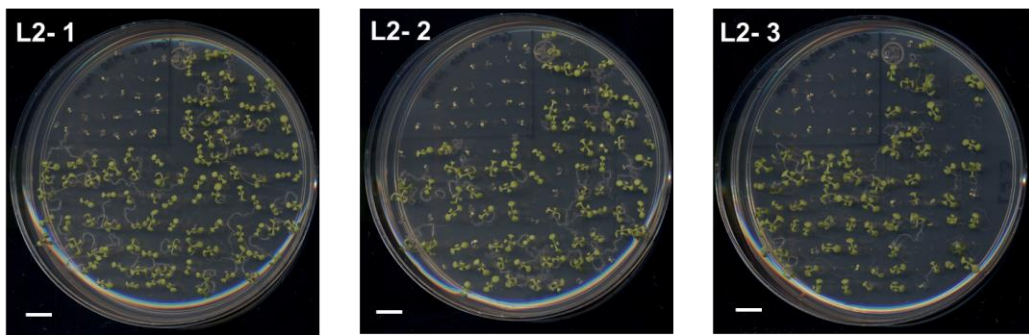
pMDS::LUC Línea 9



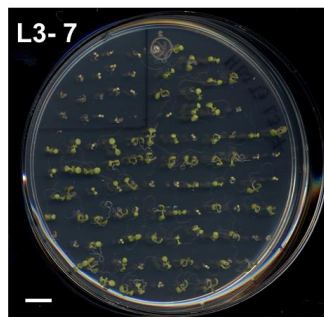
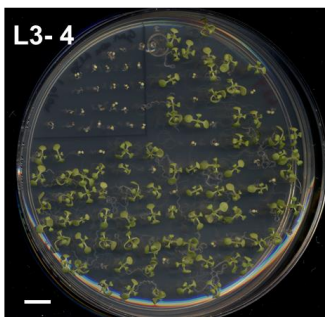
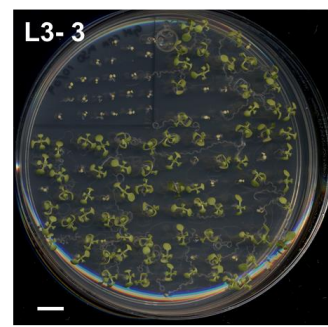
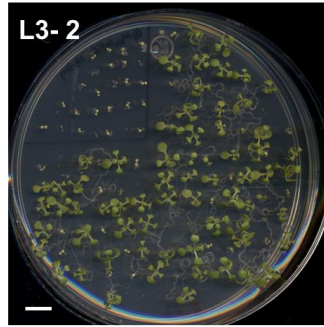
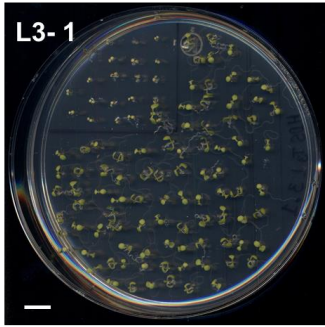
pHDS::LUC Línea 1



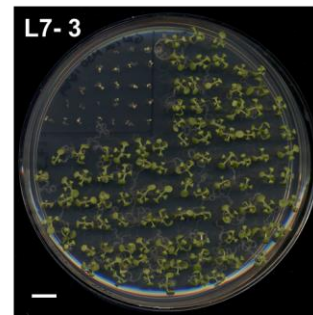
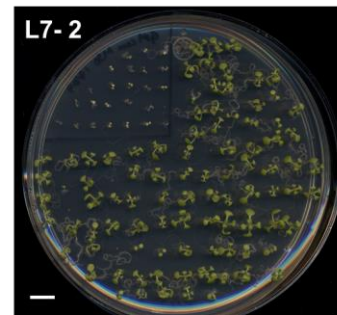
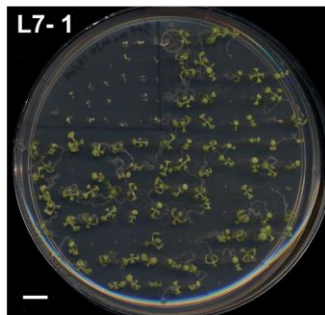
pHDS::LUC Línea 2



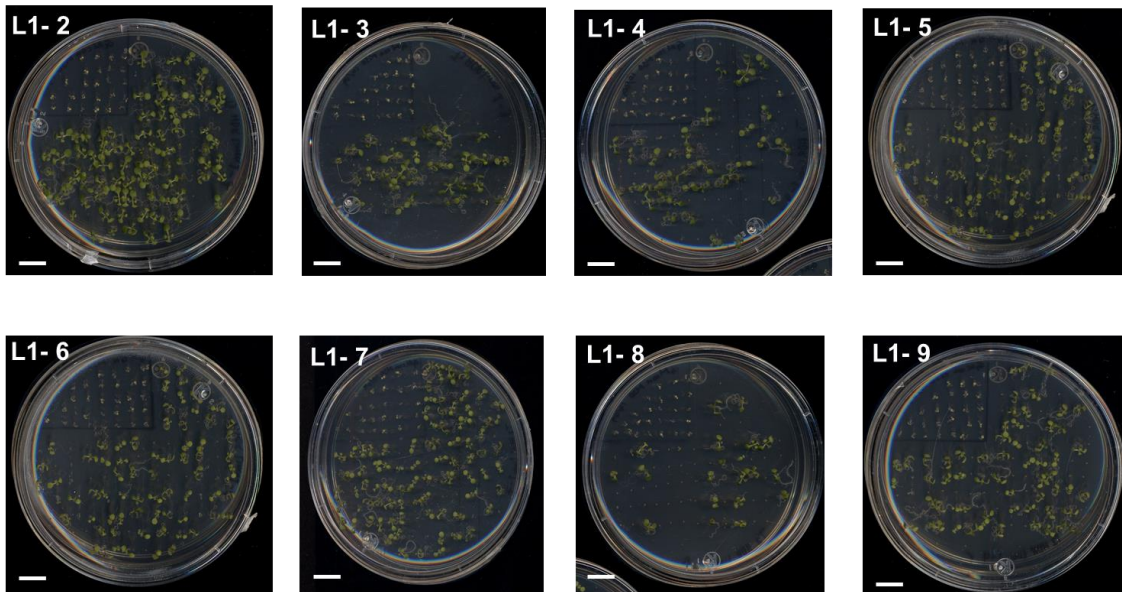
pHDS::LUC Línea 3



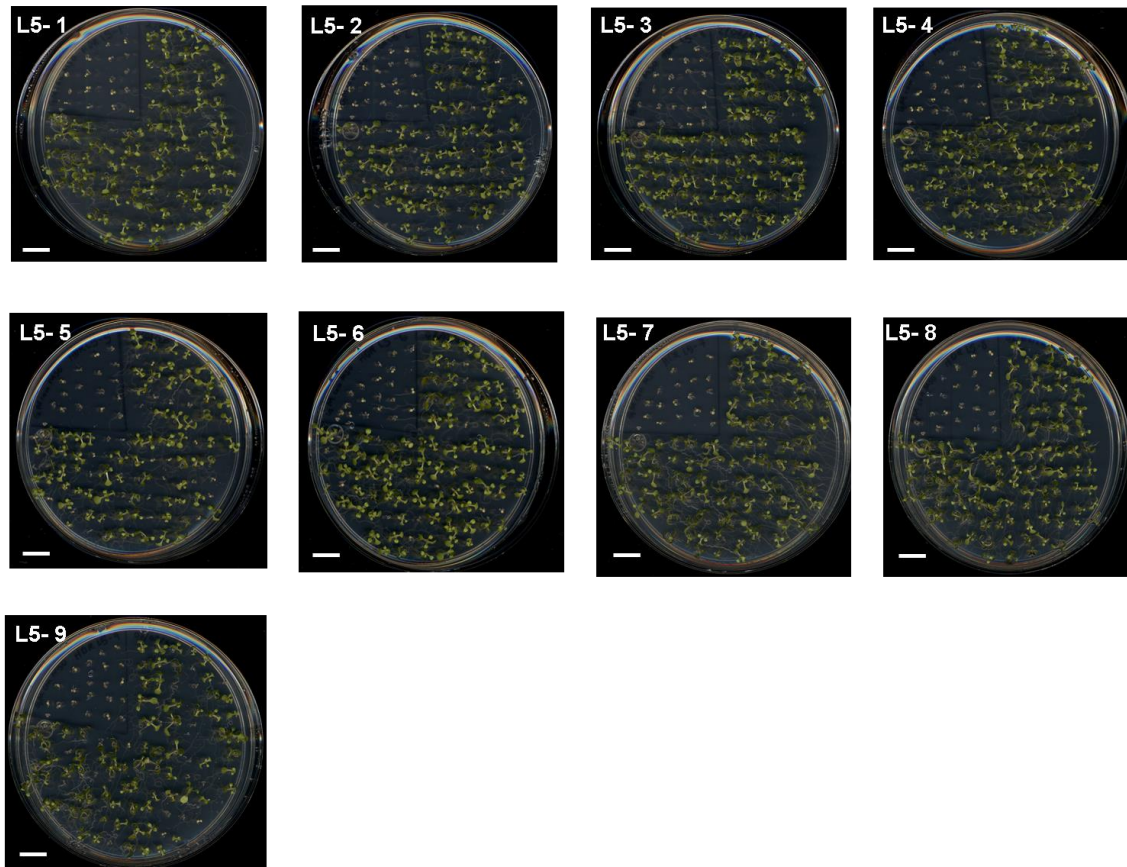
pHDS::LUC Línea 7



pHDR::LUC Línea 1



pHDR::LUC Línea 5



pHDR::LUC Línea 6

