



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Desarrollo de una herramienta para el estudio de
la regulación postranscripcional de las enzimas de
la vía metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) en
Arabidopsis thaliana

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ADRIANA LARA BRIGIDO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. PATRICIA LEÓN MEJÍA

Ciudad Universitaria, CD.MX. 2022





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.

Agradecimientos

A mis padres, por amarme incondicionalmente y el efecto que ha tenido en mi vida.

A mis abuelos, cuyo esfuerzo da frutos en mis logros.

A Félix Bernal, por siempre tener palabras llenas de cariño y apoyo en los momentos difíciles (y no tan difíciles).

A la Dra. Patricia León Mejía por aceptarme en su laboratorio y guiar este trabajo.

A la Dra. Nidia Sánchez León por entrenarme en el laboratorio.

A la Dra. Kenny Alejandra Agreda Laguna, técnica académica asociada C (no. de trabajador 899470) por su diligente colaboración en el proyecto, apoyo técnico y resolución de dudas.

A la Dra. Elizabeth Córdoba Martínez por su constante apoyo técnico y resolución de dudas.

A los miembros del laboratorio por resolver dudas y por los comentarios realizados en favor de este trabajo.

Resumen

La vía MEP es una ruta metabólica que sintetiza los precursores IPP y DMAPP que se utilizan para la síntesis de diversos metabolitos que participan en funciones esenciales metabólicas y desarrollo de la planta, así como respuestas medio ambientales. Muchos de estos metabolitos también son empleados por el humano como fuente de nutrientes, fragancias, colorantes y fármacos. Por lo tanto, la vía MEP es de gran importancia biológica y biotecnológica. Comprender cómo se regula la demanda de IPP y DMAPP de la vía MEP, permitirá entender mejor su papel en la biología de las plantas y la posibilidad de manipularla para una mejora biotecnológica. Esta vía metabólica se regula tanto a nivel transcripcional como a nivel post-transcripcional por diversas señales internas y externas. A pesar del avance que se ha logrado en el estudio de su regulación, aún se requiere mayor conocimiento, particularmente a nivel post-transcripcional. Además, resulta de interés estudiar la regulación de esta vía a mayor detalle y de forma dinámica, para conocer los mecanismos que participan en su regulación tanto transcripcional como post-transcripcional, en respuestas de desarrollo y cambios medio ambientales a los que usualmente están sujetos las plantas. Por lo tanto, con el objetivo de establecer un sistema que nos permita este tipo de análisis de la vía MEP, en este trabajo se generaron una serie de líneas transgénicas que expresan los genes que codifican para las enzimas DXS, DXR y HDR de la vía MEP fusionadas al reportero no invasivo luciferasa. Para este fin, se aislaron y clonaron los genes correspondientes de estas enzimas, incluyendo sus regiones regulatorias, codificantes e intrones. Se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana* y se seleccionaron líneas transgénicas independientes para cada gen. Finalmente, se comprobó la expresión del reportero de luciferasa *in vitro* en las líneas obtenidas. Las líneas transgénicas generadas serán utilizadas en un futuro como una herramienta para estudiar la regulación post-transcripcional de las enzimas de la vía MEP.

Índice

Abreviaturas	VII
1) Introducción	1
a) <u>Isoprenoides</u>	1
i) <u>Relevancia de los isoprenoides</u>	1
ii) <u>Biosíntesis: la vía MEP y MVA</u>	2
b) <u>La vía MEP en plantas</u>	4
i) <u>Localización</u>	4
ii) <u>Función</u>	5
iii) <u>Enzimas limitantes</u>	8
c) <u>Regulación del metabolismo</u>	10
i) <u>Estudio de la regulación génica mediante genes reproteros</u>	13
d) <u>Arabidopsis thaliana como planta modelo de estudio</u>	16
2) Antecedentes directos	17
a) <u>Regulación transcripcional de las enzimas de la vía MEP</u>	17
b) <u>Regulación post-transcripcional de las enzimas de la vía MEP</u>	19
3) Justificación	20
4) Hipótesis	21
5) Objetivos	21
a) Generales	
b) Particulares	
6) Materiales y métodos	22
a) <u>Material vegetal, desinfección y condiciones de crecimiento</u>	23
b) <u>Extracción de ADN genómico</u>	24
c) <u>Diseño de primers</u>	24
d) <u>Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)</u>	25
e) <u>Electroforesis</u>	26
f) <u>Purificación de productos de PCR</u>	26
g) <u>Reacción de recombinación BP y LR</u>	27
h) <u>Transformación de Escherichia coli y Agrobacterium tumefaciens</u>	29
i) <u>Obtención de plásmido a pequeña escala (miniprep)</u>	30

j) <u>Secuenciación de clonas</u>	30
k) <u>Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> por agroinfiltración de primordios florales</u>	31
l) <u>Selección de plantas resistentes a kanamicina</u>	32
m) <u>Selección de plantas con una inserción y homocigotas</u>	32
n) <u>Extracción de proteínas totales</u>	33
o) <u>Cuantificación de proteínas por el método de Bradford</u>	33
p) <u>Ensayo de Luciferasa</u>	34
q) <u>Visualización <i>in vivo</i> de la actividad de Luicferasa</u>	34
7) Resultados	36
a) <u>Aislamiento de los genes que codifican para las enzimas de la vía MEP</u>	36
i) <u>DXR</u>	37
ii) <u>HDR</u>	39
iii) <u>MCT</u>	40
iv) <u>CMK</u>	41
v) <u>MDS</u>	42
vi) <u>HDS</u>	43
b) <u>Generación de construcciones de los genes que codifican para las enzimas de la vía MEP en vectores de expresión fusionadas al reportero de luciferasa</u>	45
i) <u>DXR</u>	47
ii) <u>MCT</u>	49
iii) <u>CMK</u>	51
iv) <u>MDS</u>	52
v) <u>HDS</u>	54
vi) <u>HDR</u>	56
c) <u>Obtención de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con las construcciones generadas.</u>	58
i) <u>DXS</u>	58
ii) <u>DXR</u>	59
iii) <u>HDR</u>	60

d) <u>Comprobación de la expresión de los transgenes a través de la actividad de luciferasa.</u>	62
e) <u>Evaluación una de las líneas transgénicas generadas como herramienta en el estudio de la regulación post-transcripcional de la vía MEP.</u>	64
8) <u>Discusión y perspectivas</u>	66
9) <u>Conclusiones</u>	69
10) <u>Referencias</u>	70
11) <u>Créditos</u>	79
12) <u>Anexos</u>	80

Lista de Abreviaturas

AACT: Tiolasa acetoacetil-CoA

Acetil-CoA: acetil-Coenzima A

ATP: Adenosine triphosphate

B-Gal: B-galactosidasa

BSA: Bovine serum albumine

Cat: Cloranfenicol acetiltransferasa

CCD: Charge-coupled device

CDP-ME: 4-(citosina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol

CMK: CDP-ME kinase

Clb: chloroplast biogenesis

Col-0: Columbia 0

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio

CTP: Citosina 5'-trifosfato

DMAPP: Dimetilalil difosfato

DNA: Deoxiribonucleic acid

DXP: 1-deoxi-D-xilulosa 5-phosphate

DXR: DXP reductoisomerasa

DXS: DXP sintetasa

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

GFP: Green Fluorescent Protein

GUS: β-glucuronidase

HDR: HMBPP reductase

HDS: HMBPP sintase

HMBPP: 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil-difosfato

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA

HMGR: HMG-CoA reductasa

HMGS: HMG sintase

HY5: ELONGATED HYPOCOTHYL 5

IDI: IPP:DMAPP Isomerase

IPP: Isopentenil difosfato

Luc: Luciferase

MCT: CDP-ME sintetasa

MDS: 2-C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate

synthase

MEcPP: 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato

MEP: Metil-eritritol 5- fosfato

MK: Mevalonate kinase

MVA: ácido mevalónico

MVA5PP: mevalonato-5-difosfato

PCR: Polymerase chain reaction

PIFs: PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS

PMK: Phosphomevalonate kinase

PPMD: mevalonato-5-difosfato decarboxilasa

TAIR: The Arabidopsis thaliana Resource

TENS: Tris, EDTA, NaOH, SDS

RNA: Ribonucleic acid

URL: Unidades relativas de luz

UTRs: Untranslated regions

1) Introducción

a) Isoprenoides

i) Relevancia de los isoprenoides

Los isoprenoides, también conocidos como terpenoides, son el grupo funcional y estructuralmente más diverso de productos naturales producidos en todos los organismos vivos, con alrededor de 70,000 miembros identificados hasta el 2016 (Rodríguez-Concepción, 2014; Kwon *et al.*, 2016). Las estructuras de los isoprenoides comprenden diferentes niveles de complejidad (**Figura 1**), desde arreglos lineares hasta estructuras cíclicas intrincadas (Chappell, 1995). Los isoprenoides desempeñan diversas funciones biológicas en todos los reinos de la vida como componentes estructurales, elementos regulatorios, elementos del funcionamiento celular y compuestos de respuestas medio-ambientales bióticas y abióticas (**Figura 1**) (Zhao *et al.*, 2013).

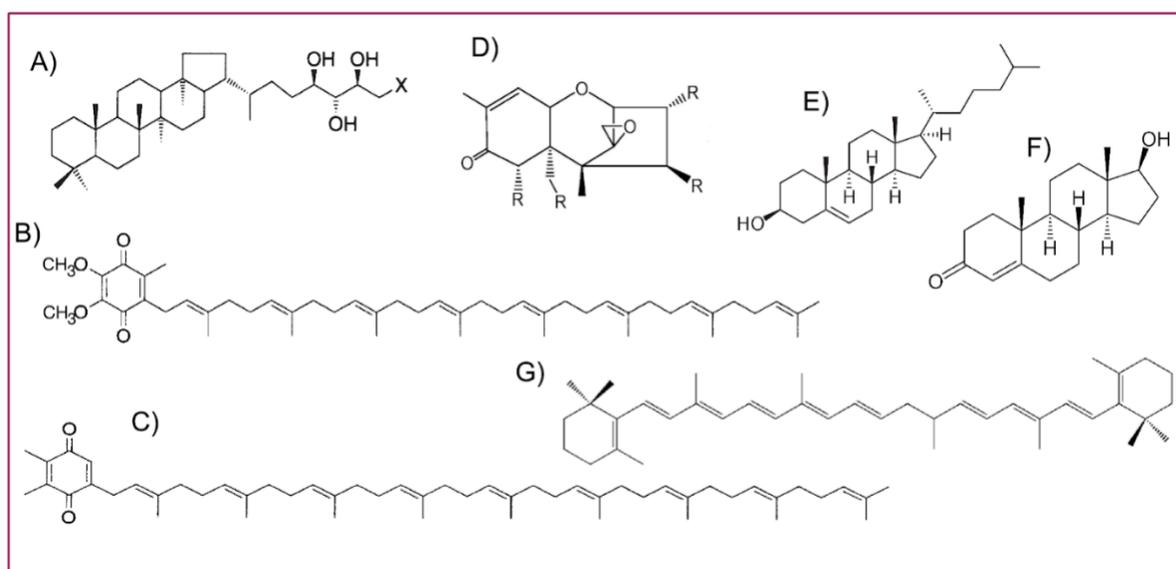


Figura 1. Ejemplos de estructuras y funciones de Isoprenoides. A) Hopanoides. Triterpenoides (grupo de isoprenoides formado por 6 unidades de isoprenoides. Presente en diversas bacterias, líquenes y plantas. Modulan la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares, entre otras funciones biológicas (Belin *et al.*, 2018). **B)** Ubiquinona (coenzimaQ), participa en el acarreo de electrones durante la respiración celular. **C)** Plastoquinona Transportador de electrones en cloroplastos durante la fase luminica de la fotosíntesis (Voet *et al.*, 2013/2016). **D)**Tricoteceno tipo B. Micotoxinas producidas por algunos hongos del orden Hipocreales (McCormick *et al.*, 2011). **E)** Colesterol, componente muy abundante en las membranas plasmática de animales. **F)** Testosterona, hormona esteroidea derivada

del colesterol. Es la principal hormona sexual masculina en animales. **G**) β -caroteno, pigmento accesorio, componentes de todas las plantas verdes y algunas bacterias fotosintetizadoras (Voet *et al.*, 2013/2016).

A pesar de la ubicuidad de los isoprenoides en todos los organismos, su abundancia y diversidad es mayor en las plantas, en las que participan en una amplia gama de procesos biológicos como la fotosíntesis (clorofilas, carotenoides, plastoquinona, tocoferoles y poliquinonas), respiración (ubiquinona), crecimiento y desarrollo (hormonas como citocininas, brasinoesteroides, giberelinas, ácido abscísico). Así como funciones ecológicas de protección contra herbívoros y patógenos, atracción de polinizadores y dispersores de semillas y aloquímicos (Rodríguez-Concepción, 2014). Los isoprenoides al igual que otros metabolitos de plantas, son de interés para el humano comercial como fuente de nutrientes, saborizantes, pigmentos, fragancias y fármacos (Croteau *et al.*, 2000; Bouvier, *et al.*, 2005; Rodríguez-Concepción, 2014).

A pesar de su gran diversidad estructural y funcional, todos los isoprenoides se sintetizan a partir de dos moléculas precursoras de cinco carbonos: el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP). La síntesis de estos dos bloques estructurales universales se da a través de dos vías metabólicas no relacionadas evolutivamente: la vía del ácido mevalónico (MVA) y la del metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP).

ii) Biosíntesis: la vía MEP y MVA

La vía del ácido mevalónico (MVA) emplea como precursores iniciales dos moléculas de acetil coenzima A (acetil-CoA), que se condensan por la tiolasa acetoacetil-CoA (**AACT**), para formar acetoacetil-CoA (**Figura 2.A**). Una segunda condensación con otra molécula de acetil-CoA catalizada, por la HMG sintasa (**HMGS**), forma el producto 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) (Zhao *et al.*, 2013) (**Figura 2.B**). En la siguiente reacción, el HMG-CoA se reduce a mevalonato por la acción de la enzima HMG-CoA reductasa (**HMGR**, **Figura 2.C**), a través de una reacción de dos pasos dependiente de NADPH (Hermmelin *et al.*, 2012). Los pasos siguientes de la vía comprenden dos reacciones de fosforilación, que convierten el mevalonato a mevalonato-5-difosfato (MVA5PP), catalizadas por las enzimas mevalonato cinasa (**MK**, **Figura 2.D**) y fosfomevalonato cinasa (**PMK**) (**Figura 2.E**). Finalmente, el MVA5PP es decarboxilado a IPP por la enzima

mevalonato-5-difosfato decarboxilasa (**PPMD**), en una reacción dependiente de ATP (**Figura 2.F**). La enzima IPP:DMAPP isomerasa (**IDI**) interconvierte IPP en DMAPP (Zhao *et al.*, 2013) (**Figura 2. N**).

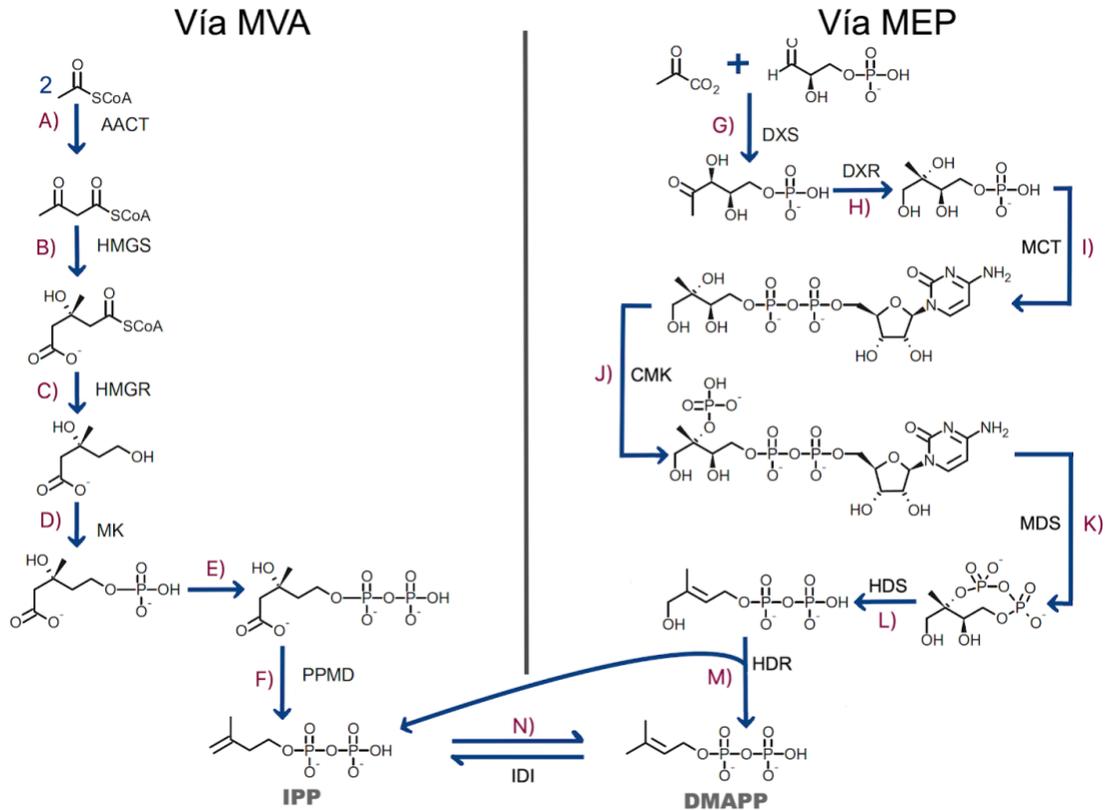


Figura 2. Vía del ácido mevalónico (MVA) y vía del metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP). La vía MVA (A-F) y MEP (G-M) son las dos rutas universales para la síntesis de precursores de isoprenoides, IPP y DMAPP. Modificada de Hermmelin *et al.*, 2012. Para conocer los nombres completos de las enzimas de ambas vías ver **Tabla A.2 y A.3, Anexos**

La segunda vía de síntesis se le conoce como la vía del metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) y consta de siete reacciones enzimáticas. Esta vía inicia con la condensación dependiente de tiamina de los sustratos D-gliceraldehído 3-fosfato y piruvato, para producir el primer intermediario 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP), catalizada por la enzima DXP sintetasa (**DXS, Figura 2.G**). Posteriormente, el reacomodo intramolecular y reducción del DXP por la enzima DXP reductoisomerasa (**DXR**), genera el compuesto 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP, **Figura 2.H**), que es el primer precursor comprometido de la vía (Rodríguez-Concepción et al., 2006). En el tercer paso, la enzima CDP-ME sintetasa (**MCT**) combina el MEP con citidina 5'-trifosfato (CTP), para

producir el intermediario 4-(citosina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME, **Figura 2.I**). En el cuarto paso enzimático, la cinasa dependiente de ATP (**CMK**), fosforila el grupo hidroxilo del carbono 2 del CDP-ME generando el 2-fosfo-4-(citosina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME2P, **Figura 2. J**), que será ciclado por la enzima **MDS** para formar 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (MEcPP)(**Figura 2. K**). Posteriormente, la enzima **HDS** cataliza la apertura del anillo del pirofosfato cíclico y la deshidratación reductiva de MecPP, para formar el último intermediario 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil-difosfato (HMBPP, **Figura 2.L**). Finalmente, la enzima **HDR** (**Figura 2. M**), reduce el HMBPP en una mezcla 5 o 6:1 de IPP:DMAPP (Hemmerlin *et al.*, 2012). Por esta capacidad de HDR, a diferencia de la vía MVA, la enzima IPP:DMAPP isomerasa (**IDI**), no es esencial para la vía MEP (Zhao *et al.*, 2013) y de hecho, aunque está presente en plantas, no está presente en algunas bacterias (Barnejee & Sharkey, 2014).

b) La vía MEP en plantas

i) Localización

La mayoría de los organismos utilizan una sola vía para la síntesis de sus precursores de isoprenoides. En general, las arqueobacterias, y eucariontes utilizan únicamente la vía MVA; mientras que la gran mayoría de las eubacterias, incluidas las cianobacterias utilizan la vía MEP (Hemmerlin *et al.*, 2012; **Figura 3**).

En el caso de los organismos eucariontes fotosintéticos como las plantas y diversas algas rojas y pardas utilizan ambas vías en compartimentos celulares diferentes (**Figura 3**): la vía MVA localizada en el citoplasma, mientras que la MEP en los plastidios (Rohmer, 1999). Se acepta que la vía MVA se incorporó a partir del ancestro de los eucariontes tipo arquea; mientras que la vía MEP se heredó durante el proceso de endosimbiosis que dio origen a los plastidios del ancestro procarionte fotosintético (Sprenger *et al.*, 1997; Lange *et al.*, 2000). En estos organismo, los genes que codifican para las enzimas de la vía MEP están codificados en el núcleo y sus productos proteicos se importan a los plastidios por la presencia de péptidos de tránsito (Hsieh *et al.*, 2008). En contraste, las enzimas de la vía MVA se localizan exclusivamente en el citoplasma donde realizan su función.

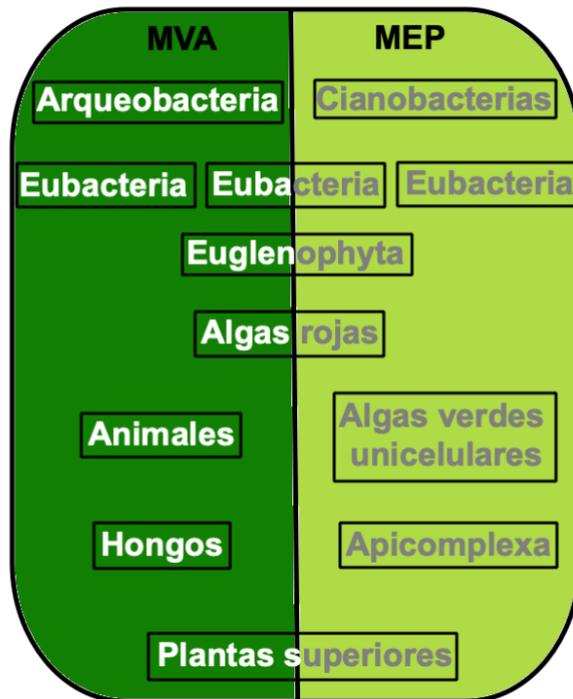


Figura 3. Distribución de las vías de síntesis de isoprenoides en los reinos de la vida. Arqueobacterias, hongos y animales utilizan exclusivamente la vía MVA. Por otro lado, la gran mayoría de eubacterias, cianobacterias, algas verdes unicelulares y protozoarios del phylum Apicomplexa utilizan únicamente la vía MEP. Otros grupos de organismos hacen uso de ambas vías metabólicas: las plantas superiores y algas rojas utilizan ambas vías en diferentes compartimentos celulares, los euglenoides utilizan principalmente la vía MVA con un posible uso en conjunto con la vía MEP (Hemmerlin *et al.*, 2012) y algunas eubacterias tienen presencia parcial de la vía MEP (Rohmer, 1998). Imagen tomada y modificada de Hemmerlin *et al.*, 2012

ii) Función

A pesar de que las plantas poseen las dos rutas metabólicas para la síntesis de IPP y DMAPP, cada una de las vías se especializa en la síntesis de isoprenoides específicos. La vía MEP proporciona los precursores para la síntesis de: hemiterpenos (isopreno y algunas citocininas), monoterpenos (diversos aromas), diterpenos (giberelinas, filoquinonas, tocoferol y cadenas fitol de clorofilas), tetraterpenos (carotenoides y hormonas como ácido abscisico y estringolactonas) y diversos politerpenos como las cadenas laterales de plastoquinona. En contraste la vía MVA se requiere para la producción de sesquiterpenos, triterpenos (fitoesteroles, brasinoesteroides), poliisoprenoides (cadenas laterales de ubiquinonas), dolicoles y grupos prenilo para la

la modificación de proteínas (Rodríguez-Concepción, 2006; Vranova *et al.*, 2013; Rodríguez-Concepción & Boronat, 2015). La retención de ambas vías en compartimentos diferentes permiten la producción eficiente de isoprenoides con funciones de crecimiento y defensa de acuerdo al estado energético y condiciones ambientales, lo que provee diversas ventajas a las plantas como organismos sésiles (Vranova *et al.*, 2013).

En las plantas la independencia funcional de cada vía se demostró con el estudio del bloqueo farmacológico o genético de las enzimas de las vías, en donde se observan fenotipos severos de retraso en el desarrollo, demostrando que la pérdida de cualquiera de las vías no puede ser compensada por la otra (Pulido *et al.*, 2012; Vranova *et al.*, 2012; Rodríguez-Concepción, 2014). No obstante, se ha encontrado un grado limitado de intercambio de los precursores entre ambas vías para la síntesis de algunos isoprenoides (Piel *et al.*, 1998; Nagata *et al.*, 2002; Kasahara *et al.*, 2002; Hemmerlin *et al.*, 2003).

La participación esencial de los productos de la vía MEP en procesos fundamentales para el desarrollo y crecimiento de las plantas se demuestra en los fenotipos que se observan en las mutantes de las enzimas de la vía MEP (**Figura 4**), las cuáles resultan en fenotipos letales en la plántula, con retraso en el desarrollo, albinismo y afectaciones en el desarrollo del cloroplasto. Estos fenotipos, contrastan con los fenotipos de las mutantes de la vía MVA, que en su mayoría tienen retraso en el desarrollo y esterilidad masculina pero no son letales (Vranova *et al.*, 2013). Es importante resaltar que todas las mutantes de la vía MEP ocasionan el arresto en el desarrollo del cloroplasto en un estadio poco desdiferenciado, parecido al de los proplastidios (**Figura 5**), careciendo del aumento característico de membranas internas de los cloroplastos y con membranas internas aisladas y estructuras vesiculares. En conjunto, estas mutantes demuestran la importancia de la vía MEP para procesos fundamentales del desarrollo de las plantas, así como para la diferenciación de los plastidios, organelos distintivos del reino vegetal.

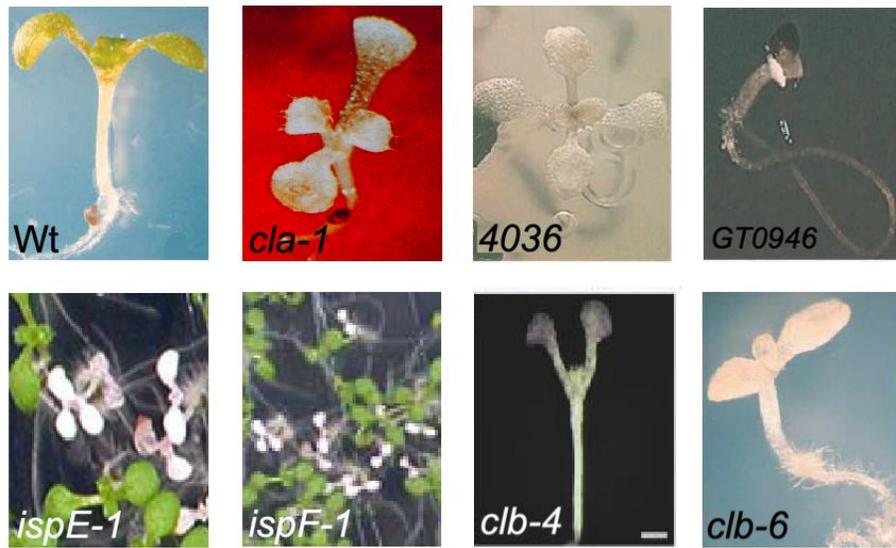


Figura 4. Mutantes de vía MEP. Wt= silvestre; *cla-1*= *dxs* (Mandel *et al.*, 1996); línea 4036= *dxr* (Budziszewski *et al.*, 2001); línea GT0946= *mct* (Budziszewski *et al.*, 2001); *ispE-1*= *cmk* (Hsieh *et al.*, 2008); *ispF-1*= *mds* (Hsieh & Goodman, 2005); *clb-4*= *hds* (Gutiérrez-Nava *et al.*, 2004); *clb-6*= *hdr* (Guevara-García *et al.*, 2005).

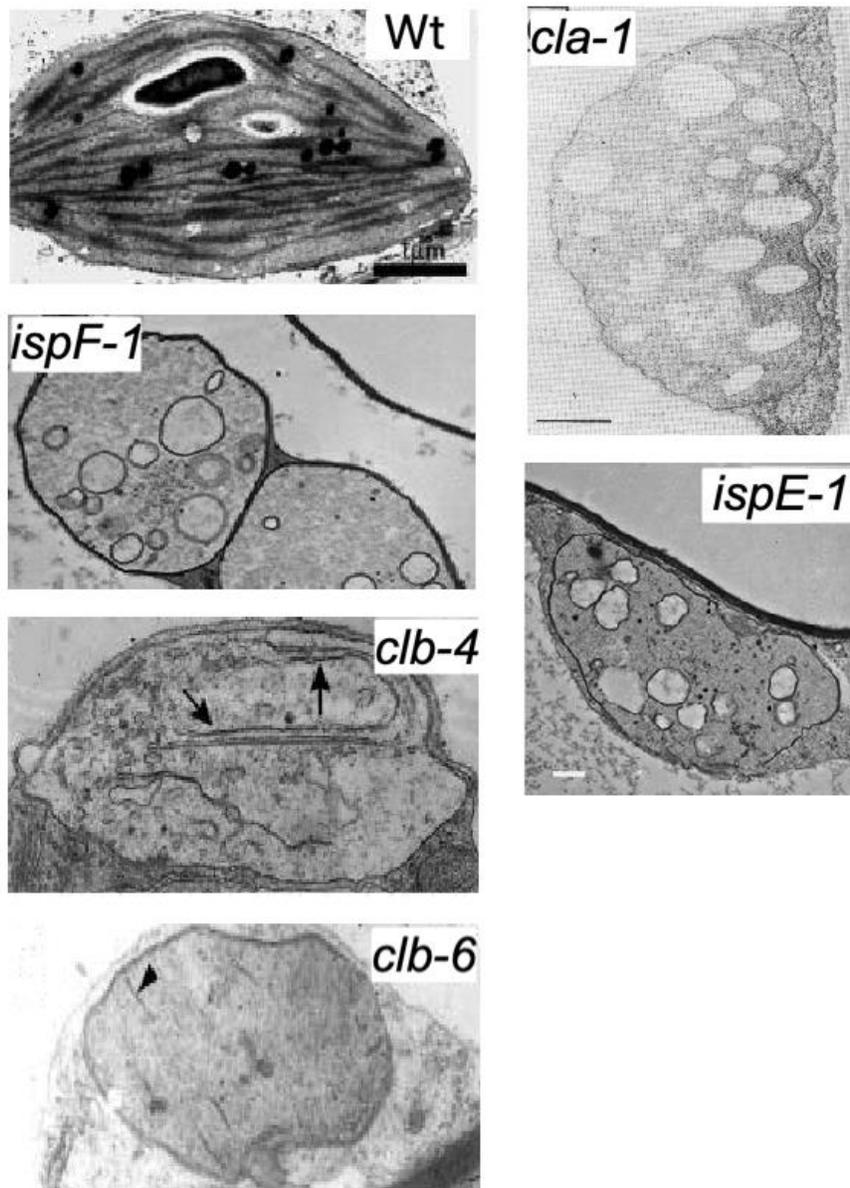


Figura 5. Plastidios de mutantes de la vía MEP. Las mutantes de la vía MEP presentan plastidio con estructuras vesiculares o con algunas membranas internas largas (flechas) y cortas (triángulo), similares a los proplastidios. Wt= silvestre; *cla-1*= *dxs* (Mandel *et al.*, 1996); *ispE-1*= *cmk* (Hsieh *et al.*, 2008); *ispF-1*= *mds* (Hsieh & Goodman, 2005); *clb-4*= *hds* (Gutiérrez-Nava *et al.*, 2004); *clb-6*= *hdr* (Gutiérrez-Nava *et al.*, 2004).

iii) Enzimas limitantes

Diversos estudios en bacterias y plantas han demostrado que DXS, la primera enzima de la vía MEP, es el principal punto de control, funcionando como una enzima limitante

(revisado en Rodríguez-Concepción, 2006; Córdoba *et al.*, 2009, Wright *et al.*, 2014). En diferentes especies se ha observado una correlación en el aumento en la expresión de *DXS* con el aumento de productos isoprenoides derivados de la vía MEP [e.g. *Arabidopsis thaliana* (Estevez *et al.*, 2000), maíz (Water *et al.*, 2000), *Medicago truncatula* (Walter *et al.*, 2002), tomate (Lois *et al.*, 2000), papa (Morris *et al.*, 2006), ginkgo (Gong *et al.*, 2006), demostrando el papel central de *DXS* para la síntesis de isoprenoides plastídicos (Rodríguez-Concepción, 2006). En particular, el trabajo realizado por Estévez y colaboradores (2001) con plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan o inhiben a la *DXS*, demuestran su función limitante. En estas plantas se observó que la acumulación de diferentes isoprenoides plastídicos (clorofilas, tocoferoles, carotenoides, ácido abscísico y giberelinas) correlaciona con los niveles de expresión de *DXS*. Más reciente, el trabajo de Wright y colaboradores (2014) demostró conclusivamente el papel limitante de esta enzima en *Arabidopsis* a través del estudio *in vivo* del flujo de carbono con $^{13}\text{CO}_2$.

Adicionalmente a *DXS*, existen estudios que apoyan un papel co-limitante de *DXR*, la segunda enzima y quien realiza la primera reacción comprometida de la vía. De manera similar a *DXS*, se ha observado en *Arabidopsis thaliana* (Carreto-Paulet *et al.*, 2002), trigo (Walter *et al.*, 2000), *Populus canescens* (Mayrhofer *et al.*, 2005) y *Catharanthus roseus* (Veau *et al.*, 2000) existe una correlación entre los niveles de expresión de la enzima *DXR* con los niveles de productos isoprenoides sintetizados, lo que apoya el papel co-limitante de esta enzima bajo ciertas condiciones. En *Arabidopsis* la sobreexpresión de *DXR* resulta en el aumento de clorofilas y carotenoides, mientras que su disminución ocasiona alteraciones en la pigmentación de la planta (Carreto-Paulet *et al.*, 2006). También la sobreexpresión de *DXR* aumenta la producción de aceites esenciales en menta (Mahmound & Croteau, 2001) y en tabaco aumenta los niveles de clorofila *a/b* y carotenoides (luteína y β -carotenos) (Hasunuma *et al.*, 2008)

Por otro lado, se ha considerado tanto *HDR* como *HDS* con posibles funciones de limitantes; pero este papel varía entre especies de plantas y en diferentes condiciones de crecimiento, por lo que un estudio más detallado es requerido en el futuro (Botella-Pavía *et al.*, 2004; Rodríguez-Concepción, 2006).

c) Regulación del metabolismo

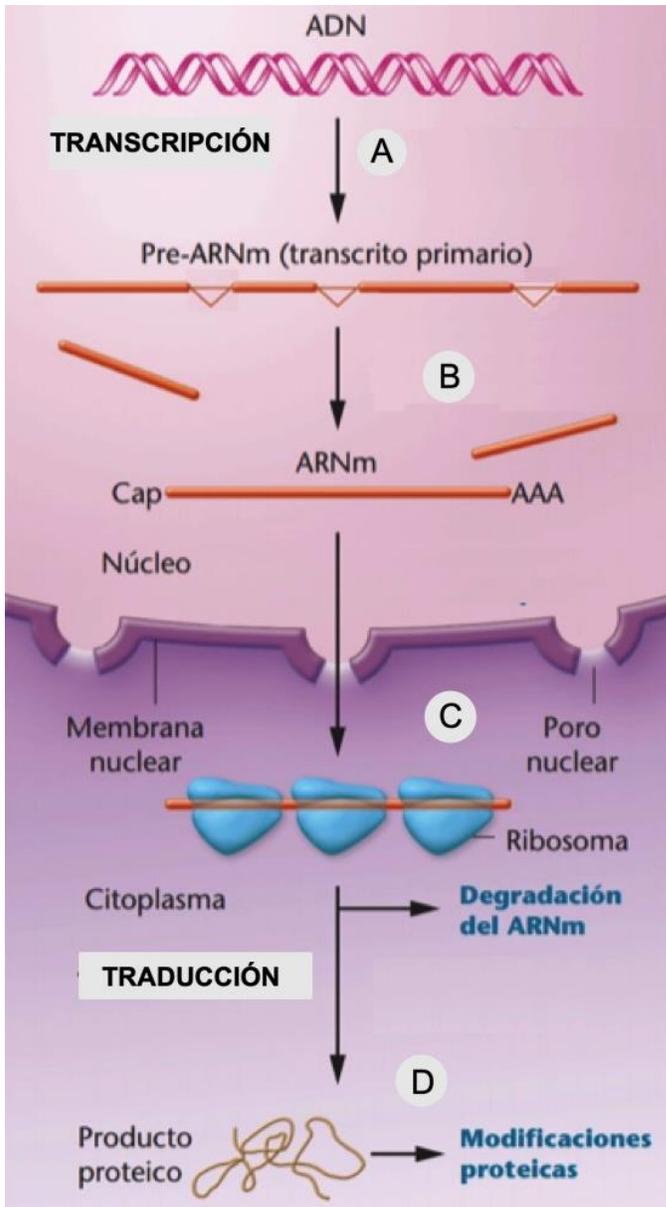
Dada la relevancia de la vía MEP para el desarrollo y funcionamiento de las plantas, es fundamental que esta vía esté regulada por mecanismos precisos y coordinados que permitan adecuar la demanda de IPP y DMAPP a las necesidades del organismo y a las fluctuaciones del medio ambiente. Es por eso que en este trabajo apuntamos al estudio de la regulación de esta vía metabólica.

Para ajustar el metabolismo a las necesidades del organismo y las fluctuaciones del medio ambiente, los organismos eucariontes regulan los genes y enzimas de una vía metabólica a lo largo del proceso de expresión génica (Stenesh, 1998; Klug *et al.*, 2012/2013; Piña-Garza & Martínez-Montes, 2018) (**Figura 6**):

- Transcripcional. Este nivel de regulación determina si un gen es transcrito y con qué frecuencia (Karp, 2010/2011). Para aumentar o inhibir la transcripción de un gen, se requiere la unión de proteínas reguladoras (factores de transcripción) a secuencias específicas del DNA (secuencias reguladoras) localizadas dentro, alrededor o a gran distancia de los genes que regulan. Estas secuencias reguladoras pueden ser promotores, intensificadores y silenciadores, también conocidas como sitios de acción en "*cis*", por localizarse en el mismo cromosoma que el gen que regulan (Klug *et al.*, 2012/2013) (**Figura 6.A**).
- Post-transcripcional: Este tipo de regulación comprende varios procesos que incluye el procesamiento, estabilidad o traducción del RNAm. Después de la transcripción, el transcrito naciente (pre-RNAm) se procesa eliminando los intrones o secuencias no codificantes, se empalman los exones, se añade una caperuza (CAP) en el extremo 5' del RNAm y se sintetiza una cola poli-A en el extremo 3'(Klug *et al.*, 2012/2013)(**Figura 6.B**). Este procesamiento convierte al pre-RNAm en un RNAm maduro que será traducido en un polipéptido. El corte y empalme alternativo de intrones y exones también regula post-transcripcionalmente la expresión génica y provee un mecanismo por el que un solo gen puede codificar dos o más proteínas relacionadas. Otros mecanismos de regulación incluyen la edición del RNAm en donde nucleótidos específicos se intercambian por otros nucleótidos después de que se transcribe el RNA o la interferencia de RNAm por miRNA (Karp, 2010/2011).

El RNA mensajero maduro se exporta del núcleo al citoplasma, donde es traducido y luego degradado (**Figura 6.C**). En este momento, también pueden actuar diferentes procesos regulatorios como una localización específica del RNAm dentro de la célula, su eficiencia de su traducción y/o degradación (vida media). Los mecanismos regulatorios a este nivel suelen operar por medio de interacciones entre RNAm y proteínas del citoplasma, en las cuales suelen participar las regiones 5' y 3' no traducidas (UTR, del inglés *untranslated regions*) (Karp, 2010/2011).

- Post-traducciona. Este nivel de regulación se refiere a la modificación de las proteínas para regular su actividad, así como su estabilidad (**Figura 6.D**). En el primer caso, existen numerosas modificaciones en aminoácidos específicos como fosforilaciones, acetilaciones, glicosilaciones, miristilaciones, ubiquitinaciones, prenilaciones, etc.; las cuales son capaces de cambiar de manera rápida la actividad o la ubicación de muchas enzimas, proteínas receptoras, canales iónicos, factores transcripcionales, entre otras moléculas biológicas (Karp, 2010/2011).



En cuanto a la estabilidad de la proteína, esta es controlada mediante proteasas o complejos, como el proteasoma, que degrada a las proteínas y modulando la acumulación de proteína presente en un momento dado (Audesirk *et al.*, 2017)

Figura 6. Expresión y regulación genética. Mediante la transcripción, un segmento de DNA da lugar al RNA mensajero primario (pre-RNA_m), el cual es procesado para la obtención de RNA maduro que se traducirá. El RNA_m se traduce a una secuencia correspondiente de aminoácidos para formar una proteína. Cada paso de este proceso puede ser regulado, modificando el grado con el cual se puede expresar un gen (Imagen modificada de Klug *et al.*, 2012/2013)

Estos mecanismos determinan los niveles de una enzima en un momento y/o tejido determinado y también ajustando su actividad enzimática. A su vez, cada mecanismo regulatorio actúa en diferentes escalas temporales, por ejemplo, la regulación de la actividad catalítica de las enzimas a través de modificaciones post-traduccionales ocurren y se revierten rápidamente; en contraste, la inducción o inhibición transcripcionales es una respuesta más lenta (Piña-Garza & Martínez-Montes, 2018).

Adicionalmente, las rutas metabólicas pueden regularse a través de su localización en los diferentes compartimentos celulares (Stenesh, 1998), lo que permite una separación por ejemplo de las rutas catabólicas y anabólicas, lo que evita ciclos fútiles e incrementa la eficiencia de las reacciones, previene la libre difusión de metabolitos en el citosol, facilita el encuentro entre enzimas y sustratos (Blanco & Blanco, 2017) y controla el tráfico de sustratos y productos mediante transportadores específicos en las membranas de los organelos (Stenesh, 1998).

i) Estudio de la regulación génica mediante genes reporteros

En las últimas décadas, el avance en el estudio de la regulación de la expresión de genes y proteínas se ha facilitado enormemente con el uso de "genes reporteros", cuyo producto proteico es de fácil detección (Fu & Xiao, 2006). Su uso permite estudiar fácilmente diferentes niveles de regulación de la expresión génica al fusionar el gen reportero con diversas secuencias regulatorias (Herrera-Estrella *et al.*, 1994). De esta manera, se pueden considerar dos principales tipos de fusiones reporteras:

- Fusiones transcripcionales: los elementos necesarios para la transcripción del gen de estudio (e.g., secuencias promotoras, motivos regulatorios) son fusionados al gen reportero, de tal manera que el sitio de unión a ribosoma (inicio de la traducción) pertenece al gen reportero. Este tipo de fusiones provee información usualmente de la regulación o cambios a nivel transcripcional y permiten generar un patrón de expresión génica del gen de estudio (Hernández-Arranz *et al.*, 2014; Boulin *et al.*, 2006, **Figura 7.A**).
- Fusiones traduccionales: son fusiones génicas donde el gen reportero es insertado en fase con la región codificante del gen de interés. Idealmente incluye el locus genómico completo del gen (UTR 5', exones, intrones, UTR 3'). Provee una

representación más fiel del patrón de expresión del gen de interés, tanto de su regulación transcripcional como post-transcripcional. Este tipo de fusiones proveen información acerca de localización subcelular y aspectos temporales de la regulación génica (Boulin *et al.*, 2006) (**Figura 7.B**).

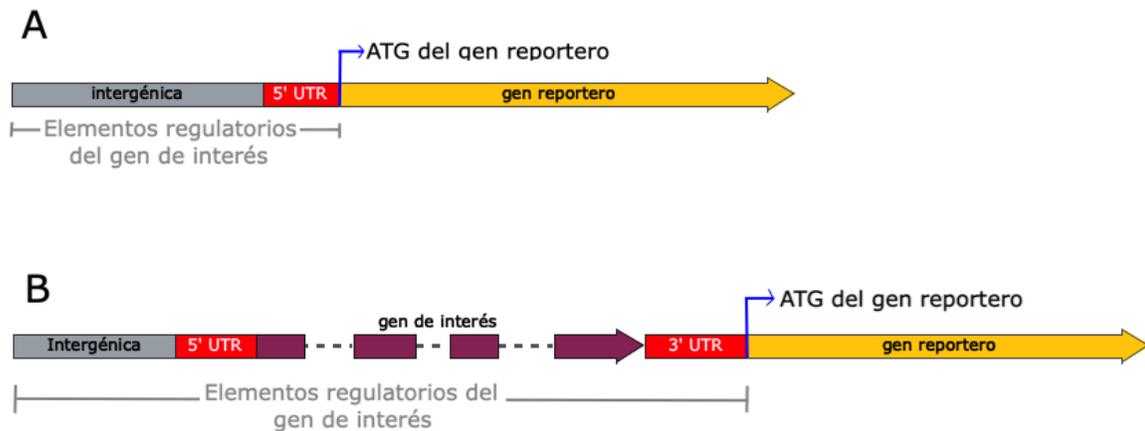


Figura 8. Fusiones reporteras.

Existen diversos genes reporteros y cada uno con características diferentes que se adecuan a los propósitos de investigación y modelos de investigación particulares (**Tabla 1**). En el caso de las plantas los genes reporteros más usados son la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), la β -galactosidasa (β -Gal), proteína verde fosforescente (GFP por sus siglas en inglés), la β -glucuronidasa (GUS) y luciferasa (Luc). En la **Tabla 1** se describen brevemente las características y usos de estos genes reporteros.

Tabla 1. Genes reporteros de amplio uso en plantas

Nombre	Origen	Modo de uso	Ventajas	Desventajas
β-galactosidasa Gen: <i>lacZ</i>	Bacteria: <i>E. coli</i>	Enzima que cataliza la hidrólisis de diferentes β -galactósido, como la lactosa.	-Flexible para el uso en fusiones traduccionales. -Apto para la detección histoquímica (Ziemiencowicz, 2001)	-En plantas existe un alto fondo de actividad β -galactosidasa endógena. (Ziemiencowicz, 2001)
Cloranfenicol acetiltransferasa Gen: <i>cat</i>	Bacteria	CAT cataliza la acetilación de cloranfenicol. Un lisado celular es incubado con acetyl-CoA y cloranfenicol marcado	-Método clásico, con mucha información disponible. -Actividad puede ser detectada a bajas	-En plantas existen acetilasas no específicas que pueden acetilar cloranfenicol

		con [14C]. Las formas acetiladas y no acetiladas poseen diferentes solubilidades en solventes orgánicos y pueden diferenciarse por cromatografía de capa fina (TLC). Posteriormente se realiza una autorradiografía para cuantificación.	concentraciones de cloranfenicol. -Ensayo de fácil realización (Ziemienowicz, 2001)	-En algunas plantas existen inhibidores de CAT (Ziemienowicz, 2001) -Sensibilidad menor a comparación de métodos más contemporáneos.
Green Fluorescent Protein (GFP)	Medusa: <i>Aequorea victoria</i>	Proteína que emite luz verde cuando es excitada con luz azul o ultravioleta.	-No requiere de sustratos ni cofactores. -No es citotóxica	-Difícil cuantificación -Requiere de un tiempo de maduración de la proteína antes de poder producir fluorescencia. En tejidos fotosintéticos presenta interferencia por la autofluorescencia de la clorofila
β-glucuronidasa (GUS) Gen: uidA	Bacteria: <i>E. coli</i>	GUS es una hidrolasa que corta a una gran variedad de α-glucurónidos Existen ensayos espectrométricos, fluorimétricos e histoquímicos los cuales utilizan como sustratos p-nitrofenil-β-D-glucorónido, 4-MUGluc y X-Gluc, respectivamente.	-Fácil cuantificación. -Alta sensibilidad. -Alta especificidad -Localización histoquímica	-A diferencia de Luciferasa, GUS no se puede evaluar <i>in vivo</i> .
Luciferasa	Luciérnaga: <i>Photinus pyralis</i> Gen: <i>luc</i> Bacteria: <i>Vibrio heryeyi</i> . Gen: <i>luxA/luxB</i>	Luciferasa cataliza la reacción entre luciferina, ATP y Mg ²⁺ produciendo oxiluciferina, luz y otros productos. La emisión de luz es proporcional a la cantidad de luciferasa y puede ser detectada fácilmente por un luminómetro.	-Permite estudios tanto en extractos celulares como <i>in vivo</i> . -Sensibilidad es 10 o 1000 veces mayor que con CAT -Menos costoso en tiempo y dinero que CAT	-Uso de luminómetro que es costoso y poco común en laboratorios

d) *Arabidopsis thaliana* una planta modelo

Para el estudio de la regulación génica y el metabolismo, así como muchos otros procesos biológicos de las plantas, se han empleado plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis thaliana (*Arabidopsis*) es una planta angiosperma herbácea de la familia Brassicaceae con amplia distribución en Europa, Asia y Norte América (Sivasubramanian *et al.*, 2015; Meinke *et al.*, 1998, **Figura 8**). A pesar de no tener ningún valor económico, posee diversos atributos que la convierten en un organismo modelo para el estudio fisiológico y bioquímico de plantas (NSF, 2017. <https://www.nsf.gov/pubs/2002/bio0202/model.htm>). Antes del uso de plantas de *Arabidopsis* como modelo, los estudios en torno a la estructura, funcionamiento y regulación de las plantas se realizaban en diferentes especies, principalmente aquellas de interés comercial como maíz (*Zea mays*), tomate (*Solanum lycopersicum*), arroz (*Oryza sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*), petunia (*Petunia hybrida*) y boca de dragón/snapdragon (*Antirrhinum majus*). Sin embargo, no existía un consenso sobre cuál de estas especies era la más apropiada para el estudio de procesos generales y masivos en plantas (Mainke *et al.*, 1998). A pesar de haber sido estudiada en ocasiones previas, no fue hasta 1943 que *Arabidopsis* fue propuesta por Freidrich Laibach como modelo de estudio genético debido a su tamaño reducido, genoma pequeño con pocos cromosomas ($n=5$), ciclo de vida corto, progenie numerosa, facilidad de realizar cruza y factible a mutagénesis (Mayerowitz, 2001). A partir de este momento se detonó el interés en el estudio de esta planta, creándose una colección de ecotipos provenientes de diversas regiones del mundo y la realización de investigación entorno a la generación y obtención de mutantes (Mayerowitz, 2001; Sivasubramanian *et al.*, 2015). Finalmente, en la década de 1980 con los avances en los campos de genética de plantas, fisiología y genética molecular, se generalizó el uso de *Arabidopsis* como planta modelo (Mayerowitz, 2001), impulsado por la estandarización de protocolos para su mutagénesis, la obtención de un mapa genético detallado y el establecimiento de protocolos para su transformación (Mainke *et al.*, 1998). El advenimiento de *Arabidopsis* como planta modelo ocasionó una revolución en el estudio de la biología de plantas, conjuntando el estudio de la genética clásica y genética molecular con el desarrollo, fisiología y patología de plantas.



Figura 8. Estados de desarrollo *Arabidopsis thaliana* silvestre. A) Plántula de 4 días después de la germinación. B) Planta de tres semanas de edad. C) Planta adulta en estado reproductivo de seis semanas.

2) Antecedentes directos

En el capítulo anterior, se recalcó que las regulaciones a distintos niveles (transcripcional, post-transcripcional y post-traduccionales) de las enzimas de una vía metabólica son estratégicas para su función adecuada. El estudio de la regulación de la vía MEP en numerosos trabajos previos ha demostrado que está modulada a nivel transcripcional así como post-transcripcional.

a) Regulación transcripcional de las enzimas de la vía MEP

Se ha documentado que diferentes procesos de desarrollo y señales externas regulan transcripcionalmente los genes de la vía MEP.

En *Arabidopsis*, la expresión de *DXS* (Estévez *et al.*, 2000) y *DXR* (Carretero-Paulet, *et al.*, 2002) está regulada durante el desarrollo de la planta; siendo expresados predominantemente durante el desarrollo temprano en los órganos fotosintéticos. Posteriormente Guevara-García y colaboradores (2005) observaron que los niveles de transcrito de todos los genes de la vía se inducen coordinadamente tres días después de la germinación en *Arabidopsis thaliana*. Otro ejemplo de modulación de la vía ante

estímulos de desarrollo se observa en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) donde la expresión de *DXS* (Lois *et al.*, 2000) y *HDR* (Botella-Pavía *et al.*, 2004) durante la transición del fruto maduro verde a fruto anaranjado.

Otras señales internas que regulan la expresión de los genes de la vía MEP incluyen señales nutricionales como la presencia de sacarosa que provoca la acumulación de los transcritos de varios genes de la vía en plantas crecidas en oscuridad (Hsieh & Goodman, 2005). También, se ha reportado un efecto regulatorio de hormonas vegetales para los genes *DXS*, *DXR* y *HDR*. En células en suspensión de *C. roseus*, la expresión de estos genes se inhibe por auxinas e induce por citocinas y metil-jasmonatos (Oudin *et al.*, 2007). Asimismo, en respuesta al arresto del cloroplasto la transcripción de los genes de la vía MEP se reprime, como se observó la mutante del último gen de la vía, *clb6* (Guevara-García *et al.*, 2005).

También, diversos estudios muestran que señales externas tanto bióticas y abióticas regulan esta vía. Por ejemplo, en gramíneas (trigo, maíz, arroz y cebada) los transcritos de *DXS* y *DXR* se acumulan en raíces durante la micorrización (Walter *et al.*, 2000). De manera similar, los transcritos de *DXS2*, *DXR* y *HDR* en tallos de *P. abies*, aumentan tras la infección con el hongo *Ceratocystis polonica* y por herida mecánica (Phillips *et al.*, 2007). Entre los estímulos abióticos, la luz tiene efectos importantes en la regulación de la vía MEP. Mandel y colaboradores (1996) fueron los primeros en reportar en *Arabidopsis* la regulación por luz de gen *CLA1*, que codifica para la enzima *DXS* y, posteriormente se observó que el transcrito de todos los genes de la vía MEP se acumulan en presencia de luz (Carreto-Paulet *et al.*, 2002; Botella-Pavía *et al.*, 2004; Córdoba *et al.*, 2009; Hsieh & Goodman, 2005). Otro regulador importante de los genes de la vía relacionados con la luz es el ciclo circadiano, en donde la expresión de los genes aumenta coordinadamente antes del amanecer (Córdoba *et al.*, 2009; Hsieh & Goodman, 2005).

A pesar de que diversas señales internas y externas regulan la expresión de la vía, los mecanismos involucrados en dichas regulaciones aún no son del todo claros. Para el caso de la luz recientemente se encontró que los factores transcripcionales ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5) y PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs), regulan la expresión de los genes que codifican para las enzimas limitantes *DXS*, *DXR* y *HDR*. Se confirmó que tanto HY5 induce como PIF1 reprime de forma directa por

mecanismos diferentes la expresión de *DXS* y *DXR*, mientras que la expresión de *HDR* solo es regulada por PIF1. Además se demostró que la regulación que ejercen PIF y HY5 tiene repercusión en la acumulación a nivel de las proteínas *DXS* y *HDR*, pero no para *DXR* (Chenge-Espinosa *et al.*, 2018).

Ya que varios de estos estudios demuestran una regulación coordinada para la mayoría de genes de la vía MEP ante diversos estímulos, se hipotetiza la participación de factores regulatorios comunes, como es el caso de PIF y HY5.

b) Regulación post-transcripcional de las enzimas de la vía MEP

Algunas observaciones han puesto en manifiesto la existencia de mecanismos regulatorios post-transcripcionales para las proteínas de la vía MEP. En *Arabidopsis*, la mutante *clb6*, afectada en gen *HDR*, presenta disminución en el nivel de todos los transcritos de las enzimas de la vía MEP con respecto a plántulas silvestres. Sin embargo, al analizar los niveles de las proteínas correspondientes, se observó que *DXS* se acumula considerablemente, a pesar de los bajos niveles de su transcrito, lo que no se observa con las otras proteínas de la vía (Guevara-García *et al.*, 2005). Esta acumulación para *DXS* también se observa en mutantes de otros genes de la vía MEP, así como en plantas silvestres tratadas con el inhibidor para la enzima *DXR*, fosmidomicina, pero no en otras mutantes albinas no relacionadas a la vía MEP o en plantas silvestres tratadas con el inhibidor de la biosíntesis de carotenoides, neoflorazona. Por lo tanto, se concluyó que esta acumulación se debe a una regulación post-transcripcional como respuesta a la disminución de los productos finales (IPP y DMAPP) ocasionada por el bloqueo de vía (Guevara-García *et al.*, 2005).

De manera semejante, en la mutante resistente a fosmidomicina *rif10* se reportó que los niveles de transcrito de los genes *DXS* y *DXR* son similares al de las plantas silvestres, pero sus proteínas correspondientes se acumulan (Sauret-Güeto *et al.*, 2006). Finalmente, la acumulación de *DXS*, *DXR* y *HDR*, así como el fenotipo de resistencia a fosmidomicina fue también observado en plantas silvestres crecidas en cloranfenicol, un inhibidor de la maquinaria de traducción plástidica. Estos estudios han llevado a proponer que la acumulación de las proteínas es una consecuencia de un defecto en

la actividad de la proteasa de los plastídios, conocida como Clp, involucrada en la degradación de DXS y DXR (Flores *et al.*, 2008).

3) Justificación

Los estudios realizados en torno a la regulación de la vía MEP han demostrado que esta vía está sujeta a múltiples regulaciones tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, bajo distintos estímulos y en muchos casos de manera coordinada. Sin embargo, la mayor parte de esta información está concentrada en las enzimas limitantes, principalmente DXS y el estudio del comportamiento de otros genes y enzimas de esta vía se desconoce. Además, el estudio de la regulación transcripcional predomina, permaneciendo por explorar la regulación post-transcripcional que juega un papel importante en plantas por su condición sésil. Por lo tanto, es relevante estudiar las respuestas regulatorias de manera dinámica tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, de los genes y proteínas de la vía MEP para tener un mejor entendimiento de su participación de la vía en respuesta a diferentes señales. Con este propósito, en el laboratorio de la Dra. Patricia León se decidió obtener líneas transgénicas que expresan construcciones transcripcionales y traduccionales de los genes de la vía MEP con el reportero de luciferasa. En el presente trabajo se elaboraron líneas transgénicas que expresan algunas enzimas de la vía MEP fusionadas a luciferasa para ser empleadas como herramientas en el estudio de su regulación post-transcripcional de forma dinámica.

4) Hipótesis

El estudio de las enzimas de la vía MEP mediante líneas transgénicas que expresen construcciones traduccionales fusionadas a luciferasa, permitirá seguir la regulación dinámica de estas proteínas.

5) Objetivos

a) General

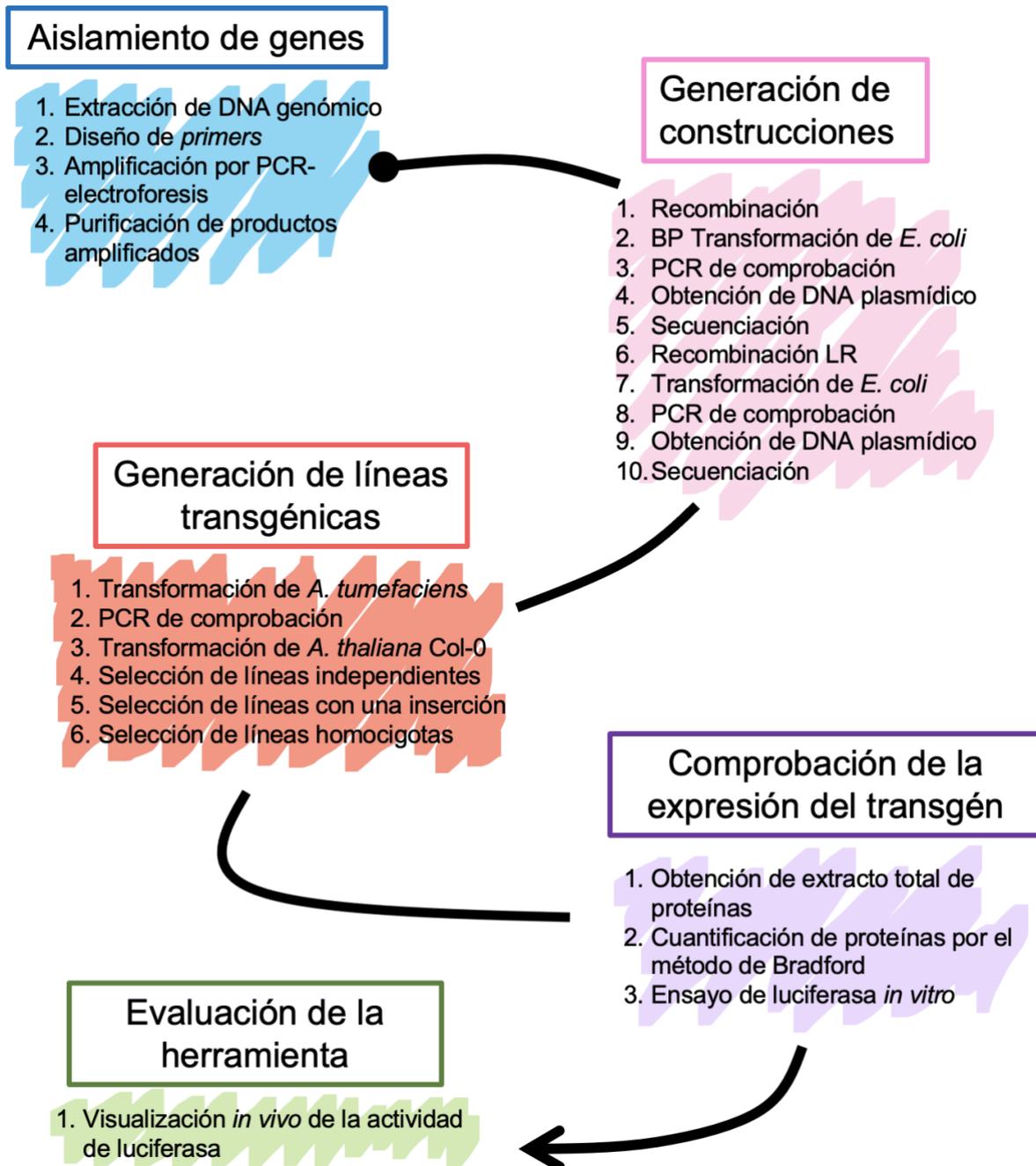
Generar líneas transgénicas como herramientas biológicas que permitan el estudio dinámico *in vivo* de la regulación post-transcripcional de la vía MEP.

b) Particulares

- Aislamiento de los genes de las enzimas de la vía MEP incluyendo sus regiones reguladoras.
- Generar construcciones traduccionales de las enzimas de la vía MEP en vectores de expresión fusionadas al reportero de luciferasa.
- Obtener líneas transgénicas independientes de *Arabidopsis thaliana* con las construcciones generadas.
- Comprobar la expresión del transgen de las construcciones.
- Evaluar una de las líneas transgénicas generadas como herramienta en el estudio de la regulación post-transcripcional de la vía MEP.

6) Materiales y métodos

En la **Figura 9** se desglosa de manera esquemática los diferentes técnicas y métodos empleados para la ejecución de cada uno de los objetivos, los cuales serán descritos con mayor detalle a continuación.



Figur 9. Técnicas y métodos empleados por objetivo para el desarrollo del proyecto

a) Material vegetal, desinfección y condiciones de crecimiento

Para la generación de plantas transgénicas, se emplearon plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0).

Las plantas (silvestres y transgénicas) fueron germinadas *in vitro* en condiciones estériles. Para ello, se siguió el siguiente protocolo que se ejecutó dentro una campana de flujo laminar: Las semillas a desinfectar fueron hidratadas agregando 1 ml de agua destilada estéril por 30 minutos. Posteriormente, se retiró el agua y se agregaron en las siguientes soluciones desinfectantes en el orden y tiempo indicados: etanol al 100% por 1 minuto, hipoclorito de sodio al 20% (CLORALEX®) durante 4 min. y finalmente se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril.

Las semillas desinfectadas, fueron sembradas en placas con medio GM 1X sólido que contienen las sales de Murashige & Skoog, suplementadas con vitaminas de Gamborg (PhytoTechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS., USA), sacarosa 1% (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO., USA), MES 0.05% (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO., USA), fitoagar 0.8% (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO., USA), pH 5.7. Para la selección de plantas transgénicas se usó el antibiótico kanamicina 50µl/50ml. Las semillas se estratificaron a 4°C oscuridad por cuatro días y posteriormente se transfirieron para su germinaron en un cuarto de crecimiento a 25°C condiciones de fotoperiodo largo (16 horas luz /8 horas oscuridad) y una intensidad lumínica de 90 µmol/m²s.

Para la obtención de semillas, las plantas se crecieron en tierra usando un sustrato que contiene peat moss mezcla 3 (Sunshine, Sun Gro Horticulture, Agawam, MA., USA), vermiculita (Sunshine, Sun Gro Horticulture, Agawam, MA., USA), de perlita (Agrolita; Tlalnepantla, Estado de México, México) en proporción 2.25:1.5:1 y 15.8 g de osmocote (Everris, Geldermalsen, The Netherlands). El crecimiento en sustrato se realizó a 22°C en con fotoperiodo de día largo (16 h luz/ 8 h oscuridad) a 90 µmol/m²s de intensidad lumínica.

b) Extracción de DNA genómico

El DNA total se obtuvo a partir de hojas de roseta de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana*, siguiendo el protocolo con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), de Murray & Thompson (1980) que se describe a continuación.

El material vegetal se colectó en nitrógeno líquido (una a dos hojas de roseta) y se trituró hasta obtener un polvo fino. Se agregaron 300 µL de buffer CTAB 2X [2% (p/v) de CTAB, 1.4M NaCl, 100 mM Tris HCl pH 8.0, 20mM EDTA] incubando a 65°C por 30 minutos. Pasado ese tiempo, se dejó enfriar y se agregaron 300 µl de cloroformo agitando vigorosamente. Se centrifugó por 10 minutos a 1,300 rpm. La fase acuosa se transfirió a un tubo y se agregaron 300 µl de 2-Propanol. Se centrifugó por 5 minutos a 10,000 rpm, se decantó la fase acuosa y el pellet se lavó con 500 µl de etanol al 70%. Después se centrifugó brevemente, se secó el pellet y se resuspendió con agua ultrapura (Milli-Q®). La concentración de DNA se cuantificó en un NanoDrop One (ThermoScientific).

c) Diseño de *primers*

Para el aislamiento y amplificación de los genes de interés, se diseñaron pares de *primers* en sentido y antisentido para cada gen. El diseño de los *primers* se basó en la secuencia de cada gen obtenida de la base de datos TAIR (The Arabidopsis Information Resource), cuyos números de identificación se reportan en la **Tabla A1 (Anexos)**. Debido a que para la mayoría de los genes no existe un análisis profundo sobre las regiones regulatorias necesarias para su expresión, se decidió que la región amplificada abarcara la región intergénica 5' (inicio de la secuencia codificante del gen de interés hasta el del gen adyacente), dentro de la cual supusimos que deberían estar contenidos todos los elementos regulatorios necesarios para su expresión. Adicionalmente se incluyó la unidad de transcripción completa (exones e intrones) hasta el codón previo al codón de paro para poder crear una fusión traduccional con el gen de luciferasa (**Figura 10**).

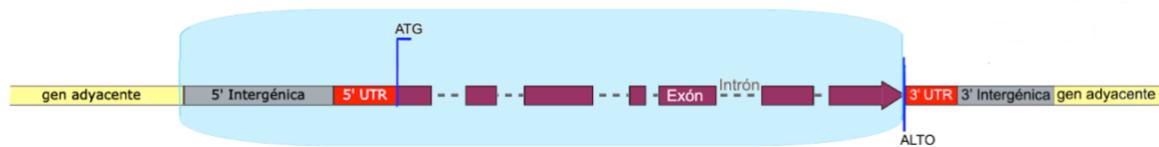


Figura 10. Región de amplificación. Se esquematiza los elementos de un gen [(región intergénica, regiones no traducidas (UTR) 5'/3' y el marco abierto de lectura (o ORF) con intrones y exones] en un contexto cromosómico (con genes adyacentes). Los elementos sombreados en azul son los que se incluyeron en la región de amplificación de cada gen.

Para los *primers* en sentido ("*forward*") se buscaron secuencia entre 20 y 25 pares de bases (pb), que tuvieran un contenido GC aproximadamente del 50%, una temperatura de alineamiento (T_m) entre 50 y 55°C y que iniciaran con un nucleótido de Guanina o Citosina. Posteriormente, utilizando el programa AmplifX se corroboró la probabilidad de formación de dímeros u otras estructuras secundarias. Para los *primers* antisentido ("*reverse*"), se eligieron directamente los 20 a 25 nucleótidos de la secuencia justo río arriba del codón de paro, buscando que mantuvieran una (T_m) similar a la del *primer forward* del gen correspondiente.

Una vez establecida la secuencia de los pares de *primers*, se agregó a cada en sus extremo 5' la secuencia correspondiente a los sitios de recombinación: attB1 para los *primer forward* y attB2 para los *primer reverse* (**Tabla A.3 Anexos**). Los pares de *primers*, se mandaron sintetizar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. En la **Tabla A.3 (Anexos)**, se muestran las secuencias de los *primers* diseñados para la amplificación de cada gen.

d) Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Para el aislamiento de los genes de interés se empleó una reacción de amplificación por PCR a partir de DNA genómico de *Arabidopsis Col-0*, utilizando la enzima DNA polimerasa de alta fidelidad "KAPA HiFi HotStart", mientras que para la verificación de las clonas se empleó la DNA polimerasa de ThermoScientific "Taq DNA Polymerase". En todos los casos se usaron los siguientes reactivos para la realización de la reacción de amplificación por PCR:

- Buffer ----- 5 μ L
 - Thermoscientific 10X: 100mM Tris-HCl (pH 8.8 a 25°C, 500 mM KCl, 0.8% Nonidet P40)
 - KAPPA Hotstart 5X: 10 mM de MgCl₂
- dNTPs (2.5mM)----- 3 μ L
- *Primers* (Fw/Rv)----- 1 μ L
- ADN genómico-----100 ng
- Taq polimerasa ("KAPPA HiFi"i ó "Recombinant" Thermoscientific --- 0.5 μ L
- Agua ultrapura Milli-Q®----- c.b.p 25 μ L

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador "T-100 Thermocycle" (BIORAD) ThermoScientific bajo los parámetros específicos de temperatura y número de ciclos para cada gen (**Tabla A.4, Anexos**).

Para los PCR de colonia se siguió el mismo procedimiento para un PCR convencional con las siguientes modificaciones: A la mezcla de reacción se agregó la Taq polimerasa la cual se alicuotó en volúmenes de 25 μ L en tubos independientes. Inmediatamente, se agregó en cada tubo una muestra de la colonia de interés que, se resuspendió en la mezcla de reacción y se procedió a su amplificación.

e) Electroforesis

A 3-5 μ l de la muestra de interés se le adicionaron de 2 a 3 μ l de buffer de carga [glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0.25% (p/v), cianol xileno FF 0.25% (p/v)]. Las muestras correspondientes se corrieron en geles de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1mM, pH 8), a 100 mM hasta que el marcador llegó al final del gel. Los geles se visualizaron en un fotodocumentador bajo luz UV y se fotografiaron.

f) Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR se purificaron a través de electroforesis para su posterior clonación. Los fragmentos del peso molecular esperado fueron cortados y recuperados

de la agarosa utilizando los kits "Gene DNA recovery" de Zymoclean ó "GeneJet Gel Extraction Kit" de ThermoScientific siguiendo las instrucciones provistas por los fabricante eluyéndolos con agua ultrapura Milli-Q®. La integridad del fragmento purificado se corroboró por electroforesis y su concentración se cuantificó a través de un NanoDrop One (ThermoScientific).

g) Reacción de recombinación BP y LR

Para la generación de las construcciones traduccionales con luciferasa se empleó el sistema Gateway® con la Clonasa II. Este método de clonación está basado en la recombinación sitio-específica que emplea el bacteriofago lambda (λ) para su integración y escisión del genoma de *E.coli*. El evento de recombinación se lleva a cabo mediante la integrasa (Int) del fago lambda y el factor de integración bacterial de *E.coli* (IHF), que actúan sobre secuencias específicas en el ADN del fago y el cromosoma bacteriano, denominadas como sitios *attP* y *attB* respectivamente. Después del evento de recombinación, el profago queda flanqueado por dos sitios att híbridos que se denominan *attL* (*left*, izquierda) y *attR* (*right*, derecha), los cuales participan para la reacción reversa de escisión mediada por Int, IHF, la excisionasa (Xis) y otras proteínas codificadas por el fago (Katzen, 2007). En la **Figura 11**, se esquematiza el proceso del sistema Gateway, en el cual se emplea subtipos de sitios *att* que son específicos entre ellos; es decir, los sitios *attB1* solo recombinan con los sitios *attP1*, de tal manera que se facilita la clonación de cada fragmento de DNA en una sola orientación dentro de un vector. Para llevar a cabo las reacciones de recombinación, el sistema utiliza dos mezclas diferentes de enzimas: la mezcla de BP clonasa recombina los sitios *attB* presentes en el fragmento de DNA a insertar y los sitios *attP* presentes en un vector donador para generar la clona de entrada que consiste en un plásmido donde el fragmento de interés está flanqueado por secuencias *attL*, proceso denominado "reacción BP". Después, la mezcla LR clonasa cataliza la reacción reversa de recombinación entre los sitios *attL* de la clona de entrada y sitios *attR* en un vector destino, produciendo la clona de expresión con sitios *attB* (reacción LR). Durante las reacciones de recombinación no hay síntesis o pérdida de DNA por lo que el marco

de lectura se mantiene permitiendo la precisa transferencia de genes entre la clona de entrada y la clona de expresión (Katzen, 2007; Reece-Hoyes & Walhout, 2018).

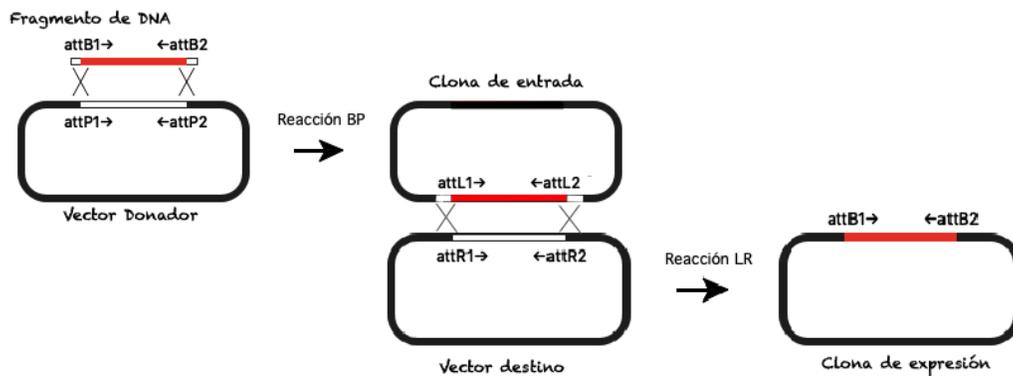


Figura 11. Sistema Gateway.

Para crear los vectores de entrada con los genes amplificados, se realizó la reacción de recombinación BP con la enzima Gateway® BP Clonase® II.

El vector donador usado fue el pDONR™/Zeo(Figura A.1, Anexos), que contiene el gen de resistencia a la zeocina para su selección.

Para realizar la reacción de recombinación, se calculó la concentración necesaria del gen purificado para llevar a cabo la reacción con la siguiente fórmula:

- $ng=(fmol)(N)(660 \text{ fg/fmol})(1 \text{ ng}/10^6 \text{ fg})$ Dónde N es el tamaño de DNA en pares de bases

Posteriormente, se siguió el protocolo indicado en el manual de usuario "Gateway® Technology with Clonase® II":

- Fragmento *attB*-PCR ----- μL calculados
- Vector pDONR™/Zeo (150 ng/ μL)----- 1 μL
- Agua ultrapura Milli-Q®----- c.b.p 8 μL
- Enzima Gateway® BP Clonase® II-----2 μL

Se incubó la reacción toda la noche (~15 hrs) a 25 °C. Después del tiempo de incubación, se agregó 1 μL de Proteinasa K y se incubó por 10 minutos a 37 °C.

Después de generar clones de entrada para cada uno de los genes de interés, se llevó a cabo la reacción de recombinación LR al vector destino. El vector destino usado fue

el pGWB435 que contiene el gen reportero de luciferasa, el gen de resistencia a espectinomycin para su selección en bacterias y el gen de resistencia a kanamicina para su selección en plantas (**Figura A.2, Anexos**). Se siguió el protocolo indicado en el manual de usuario "Gateway® Technology with Clonase® II":

- Clona de entrada-----150 ng
- Vector destino pGWB435 (150 ng/ μ L) -----1 μ L
- Agua ultrapura Milli-Q®----- c.b.p 8 μ L
- Enzima Gateway® LR Clonase® II-----2 μ L

Se incubó la reacción toda la noche (~15 hrs) a 25 °C. Después del tiempo de incubación, se agregó 1 μ L de Proteínasa K por 10 minutos a 37 °C.

h) Transformación de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*

Para la obtención un mayor número de clonas de las reacciones BP y LR, se transformaron células electrocompetentes de la bacteria *E. coli* DH5 α preservadas en glicerol a -70 °C. El protocolo utilizado consistió en:

Trabajando sobre hielo, se agregaron 2 μ l del producto de la recombinación a 200 μ l de células competentes Inmediatamente, el volumen total de la mezcla se transfirió a una celda de electroporación. La electroporación se llevó a cabo en un equipo de electroporación "Mycro-pulser" (Bio-Rad) aplicando un voltaje de 2.5 kV por 5 milisegundos. Posteriormente, se agregó 1 ml de medio LB líquido a la celda, transfiriendo todo el volumen a un tubo de ensayo y se permitió la recuperación de las bacterias por 1 hora a 37 °C con agitación. Posteriormente, 150 μ l y 300 μ l de las bacterias transformadas se sembraron por separado en placas de medio LB sólido en presencia del antibiótico de selección: zeocina 50 μ g/ml (para las transformantes con el vector pDNOR) ó espectinomycin 50 μ g/ml (para el vector pGWB435). Las cajas se incubaron a 37 °C por 16 h para transformante de *E. coli* y 30 °C por 48 h para *A. tumefaciens* hasta observar colonias visibles bien definidas. Las colonias resistentes se transfirieron a otra placa con medio LB con los antibióticos correspondientes.

Para la transformación de *A. tumefaciens* se siguió el mismo procedimiento descrito para *E.coli*, con las siguientes modificaciones: la corriente aplicada fue de 2.2 kV por 5 milisegundos, el tiempo de recuperación después de la electroporación fue de 2 h y las bacterias se crecieron en placa de medio LB con espectinomicina, carbenicilina y rifampicina (50 µg/ ml cada uno); las bacterias se incubaron a 30°C por tres días para obtener las colonias resistentes.

i) Obtención de plásmido a pequeña escala (miniprep)

Para la obtención de DNA plasmídico, se partió de un cultivo de la colonia de interés crecida en 5 ml de medio LB líquido por 16 h a 37°C en presencia de los antibióticos correspondientes dependiendo del tipo de plásmido.

Para la extracción del plásmido se siguió el método con TENS:

Se centrifugaron 1.5 ml del cultivo bacteriano por 2 min a 10,000 rpm y se descartó la mayor parte de medio. La pastilla se resuspendió por completo en el medio restante y se agregaron 300 µl de solución TENS (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1 N NaOH, 0.5% SDS) agitando con Vortex. Se añadieron 150 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.2, agitando por inversión para obtener una mezcla homogénea y esta se centrifugó 10 min a 12,000 rpm para sedimentar los restos celulares y el ADN cromosomal. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo procurando y se agregaron 900 µL de etanol absoluto frío. Se centrifugó por 2 min a 10,000 rpm para precipitar el ADN plasmídico y el RNA; y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se volvió a centrifugar.

Finalmente, la pastilla se secó y se resuspendió en 20-40 µl de agua ultrapura Milli-Q®.

j) Secuenciación de clonas

La secuencia de las clonas de interés, se obtuvo de DNA plasmídico purificado utilizando el kit "High Pure Plasmid Isolation" de Roche Applied Science, siguiendo las instrucciones del proveedor y eluido con agua ultrapura Milli-Q®. El plásmido se cuantificó en NanoDrop One (ThermoScientific).

Se utilizaron 10 picomoles del *primer* de interés para secuenciar, 300 a 1000 ng del plásmido purificado en un volumen final de 16 µL. La secuenciación se realizó en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. En la **Tabla A.5 (Anexos)** se muestran todos los *primers* que se emplearon para secuenciar cada clona de este trabajo.

k) Transformación de *Arabidopsis thaliana* por agroinfiltración de primordios florales

La transformación de plantas se realizó a través del método de infiltración de botones florales (Clough & Bent, 1998). Se transformaron plantas adultas en estado reproductivo, cuando presentaban los primeros brotes florales. Dos días antes de la transformación se retiraron las silicuas preexistentes y las inflorescencias con flores en anthesis, dejando únicamente inflorescencias con botones florales.

Paralelamente se generó un pre-inóculo en 5 mL de medio LB con los antibióticos correspondientes de la cepa de *Agrobacterium* portadora de la construcción de interés y se incubó por 24 horas a 30°C con agitación de 250 rpm.

Con el pre-inóculo se inoculó 1 L de medio LB con los antibióticos correspondientes y se creció durante toda la noche a 30°C con una agitación a 250 rpm. Posteriormente, las bacterias crecidas se centrifugaron a 7,500 rpm por 12 minutos a 20°C.

La pastilla se resuspendió en 1 L medio de agroinfiltración (medio Murashige & Skoog 0.5X, sacarosa 5%) y se agregaron 500 µl del detergente silwet L-77.

Las inflorescencias de las plantas se sumergieron en la suspensión bacteriana y se aplicó vacío por 1 min. Posteriormente, se retiró la planta del medio y se enjuagaron con agua destilada. Las plantas se colocaron horizontalmente sobre una charola cubiertas con un domo de plástico transparente durante un día a 22°C. Al día siguiente, las plantas se levantaron, se retiró el domo y se regaron con agua para continuar con su crecimiento en un cuarto de temperatura controlada a 22°C fotoperiodo largo (16 h luz/ 8 h oscuridad), hasta la obtención de semillas.

Las semillas de las plantas transformadas (T1) se recolectaron y secaron por una semana a temperatura ambiente y en un desecador por cinco días. Finalmente, las semillas se almacenaron a 4°C hasta su uso posterior.

l) Selección de plantas resistentes a kanamicina

Para seleccionar las líneas transformadas independientes T1, se desinfectaron y germinaron *in vitro* aproximadamente 1000 semillas en presencia del antibiótico de selección, siguiendo el procedimiento previamente descrito en la sección 5.1. En este caso, se sembraron en cajas con medio GM sólido usando una solución estéril de agarosa al 0.1% y se estratificaron a 4°C en la oscuridad por cuatro días.

Para cada gen se seleccionaron aproximadamente 10 plántulas que presentaran fenotipo de resistencia a kanamicina: plántulas de color verde con cotiledones y raíces bien desarrollados. Cada una de estas plantas constituye una línea independiente resultado de un evento de transformación. Estas plántulas se transfirieron a medio GM sólido sin antibióticos por dos días y posteriormente fueron trasplantadas a sustrato para obtener semillas de la siguiente generación (T2).

m) Selección de plantas con una inserción y homocigotas

Para la obtención de sublíneas que portan una inserción del transgen en el genoma, se analizó el porcentaje de resistencia a kanamicina en la descendencia de las líneas independientes. Para ello se germinaron aproximadamente 100 semillas T2 de cada línea en placas con medio GM sólido con kanamicina (50µg/ml) y se cuantificó el número de individuos con fenotipos resistentes al antibiótico. Mediante la prueba estadística de χ^2 se determinó aquellas líneas con una proporción de segregación 3:1 del fenotipo resistencia a kanamicina, es decir, 75% de resistencia y 25% de sensibilidad a kanamicina (valor de $p > 0.05$). De las líneas que presentaban la proporción de segregación esperada, se seleccionaron aproximadamente 5 individuos con fenotipo de resistencia, cada una constituyendo una sublínea. Estas fueron transferidas a medio sin antibióticos por dos días y posteriormente trasplantadas a sustrato para obtener la siguiente generación de semillas (T3).

La identificación de los individuos homocigotos para cada línea independiente, se realizó germinando las semillas T3 obtenidas en medio GM sólido adicionado con kanamicina (50 µg/ml). Aquellas que presentaron 100% de resistencia a kanamicina son los individuos homocigotos.

n) Extracción de proteínas totales

Los extractos de proteínas totales de plantas se obtuvieron a partir de plántulas de 12 días después de la germinación crecidas en medio GM con kanamicina (50 µg/ml) de cada una de las líneas de interés. Las plántulas se congelaron en nitrógeno líquido y se pulverizaron usando un mortero. Posteriormente, al polvo del tejido se le agregó en proporción de 1:1 (v/v) de Buffer de extracción de proteínas (Tris-HCl pH 7.5 70 mM, MgCl 1 mM, KCl 25 mM, Na EDTA•2H₂O pH 8 5 mM, Sacarosa 0.25 mM, DDT 7.5 mM, Tritón X-100). El extracto se centrifugó por 10 min a 4°C una velocidad entre 12,000 a 16,000 rpm. Finalmente, el sobrenadante, el cual contiene las proteínas totales, se recuperó y se almacenó a -70°C.

o) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para cuantificar la cantidad de proteínas totales de las muestras se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Primeramente, fue necesario elaborar una curva patrón de proteínas utilizando albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés), utilizando las siguientes concentraciones de proteína:

Cantidad de proteína (µg)	BSA (µL)	H₂O (µL)
1	2.5	797.5
2.5	6.25	793.5
5	12.5	787.5
10	25	775
15	37.5	762.5
20	50	750
Blanco	-	800

A cada dilución proteica se le agregó 200 µL de reactivo de Bradford y posteriormente se cuantificaron en un espectrofotómetro "SmartSpec Plus Spectrophotometer" (Bio-Rad) a 595 nm. Las lecturas para cada dilución de curva patrón se graficaron en relación a su absorbancia. Con estos datos se obtuvo una regresión lineal para todos los puntos de la gráfica y la ecuación de dicha recta ($y=mx+b$).

Para cuantificar la concentración de proteína de las muestras, se usó 1 µL del extracto proteico total que se mezcló con 799 µL de H₂O y 200 µL de reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay). La absorbancia en cada muestra se obtuvo a 595 nm en un espectrofotómetro. La absorbancia de cada una de las muestras se interpolaron en la curva patrón previamente construida, empleando la ecuación de la recta obtenida de la regresión lineal y despejando la concentración (x) y sustituyendo los valores de y con los datos de absorbancia de cada muestra.

p) Ensayo de luciferasa *in vitro*

Para la cuantificación de la actividad de luciferasa se empleó un luminómetro "Monolight 2010" (Analytical Luminescence Laboratory) y el kit "Luciferase Assay System" de Promega siguiendo las especificaciones del proveedor.

En un tubo de luminómetro se agregó 2.5 µL ó 5 µL del extracto de proteínas totales de cada muestra. Posteriormente, se inyectaron 100 µL de "Reactivo para Ensayo de Luciferasa" (Promega) en el tubo de luminómetro y se realizó una medición por diez segundos de la cantidad de luz producida

q) Visualización *in vivo* de la actividad de luciferasa

Se siguió el procedimiento del protocolo "New Luciferin Protocol" (Lazzlo Method) con las modificaciones necesarias para ajustar los volúmenes requeridos.

Se reparó una solución stock 50mM de luciferina (Sal de potasio de Promega) con TRIS-fosfatos 0.1M pH 8.0. A partir de esta solución se preparó una dilución 5mM empleando Tritón X-100 0.01%. Trabajando en condiciones de esterilidad se asperjaron 250 µL de la solución de luciferina 5mM repartida entre 6 plántulas de 4 días de edad.

Las plántulas se visualizaron en una cámara CCD "MicroChemi" (DNR Bioimaging Systems) a los 25 min, 2.5 h, 24h, 48h y 7 días después de la aspersión. Las imágenes generadas fueron analizadas con el software FIJI de ImageJ aplicando el LUT "Green on Fire"

7) Resultados

a) Aislamiento de los genes que codifican para las enzimas de la vía MEP

Previamente al presente proyecto, en el laboratorio ya se había obtenido la construcción de la región regulatoria y codificante del gen *DXS* en el vector destino pGWB435, por lo que en este trabajo nos enfocamos en el aislamiento y generación de las construcciones de los genes restantes de la vía. Como primer paso se diseñaron

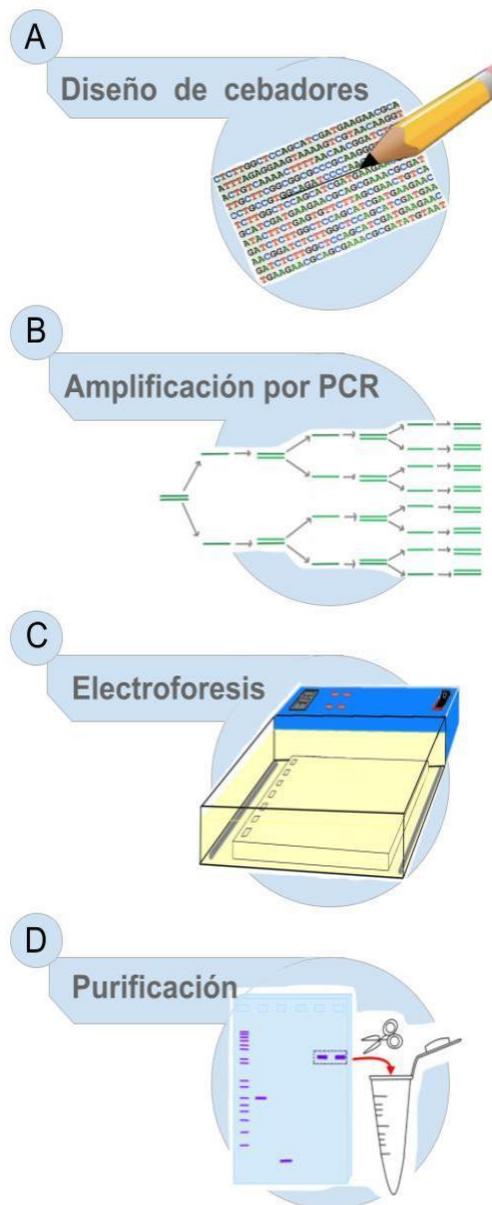


Figura 12. Aislamiento de los genes de la vía MEP. Esquema de los procedimientos realizados para concretar el aislamiento de los genes restantes de la vía MEP: diseño de primers específicos de los genes de la vía MEP (A) para su amplificación (B). Electroforesis del producto de PCR para la corroboración de la amplificación de los genes de interés (C) y su posterior purificación para la obtención del material genético (D).

pares de *primers* en sentido y antisentido para amplificar por PCR cada uno de los genes (**Figura 12. A** y **Figura 12. B**).

El producto de la amplificación de cada uno de los genes se verificó por electroforesis en geles de agarosa para corroborar que el producto obtenido tuviera el tamaño esperado para cada gen (**Figura 12.C**). Los fragmentos amplificados se purificaron y cuantificaron (**Figura 12. D**).

A continuación se describen los resultados obtenidos para cada uno de los genes en orden de su elaboración y no en el orden en los que participan en la vía metabólica.

i) DXR

El gen *DXR* codifica para la segunda enzima de la vía, la DXP reductoisomerasa (**DXR**). Su región intergénica consta 1212 pb, la región UTR 5' de 132 pb y contiene un marco abierto de lectura de 2930 pb conteniendo 13 exones (**Figura 13**). En esta figura también se muestra la posición de los *primers* empleados para su amplificación: ***DXR FdGW*** y ***DXR RvGW***, los cuales amplifican un fragmento de 4275 pb.

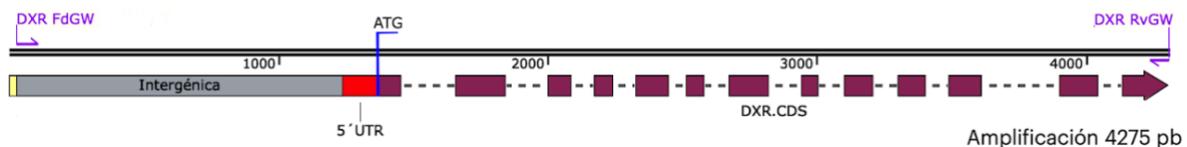
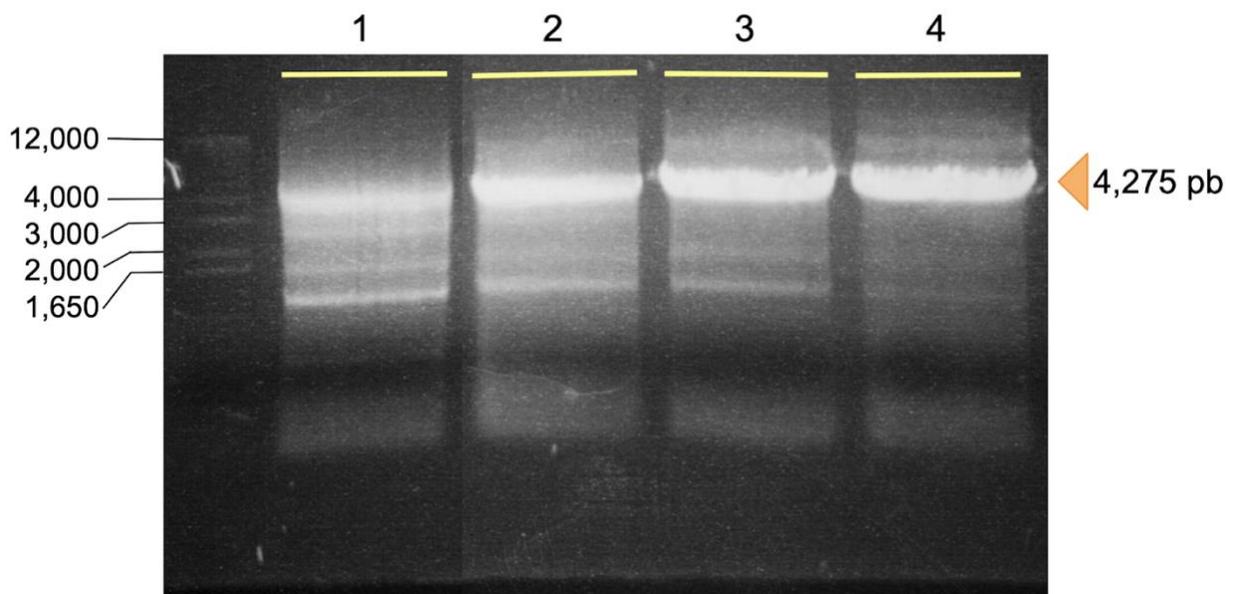


Figura 13. Gen *DXR*.

Para estandarizar las condiciones de amplificación con los *primers* diseñados (oligómeros de ~60 nucleótidos), se realizó una amplificación por PCR utilizando un gradiente de temperaturas de alineamiento con el objetivo de encontrar aquella condición que amplificara el producto de interés con el menor número de amplificaciones inespecíficas.

En este caso se usaron cuatro diferentes temperaturas de alineamiento: 55°C, 56.9°C, 61.1°C y 63°C. Como se puede observar en la Figura 16, los productos de amplificación en todas las temperaturas probadas generaron un fragmento mayoritario del tamaño esperado, aunque en todas ellas se observaron bandas inespecíficas de menor tamaño pero con menor intensidad. No obstante, tanto a 61.1°C como a 63°C amplificaron el fragmento de interés de forma más abundante que con las temperaturas más bajas y con menor número de inespecificidades (**Figura 14**), por lo que se procedió a purificar las bandas correspondientes en estas temperaturas. Después de su purificación se verificó la integridad del fragmento tras el proceso de purificación a través de una electroforesis observándose nuevamente un fragmento del peso molecular esperado (datos no mostrados).

Figura 14. Amplificación de DXR. Se muestran los resultados de la amplificación bajo cuatro temperaturas de alineamiento: 1, 55°C; 2, 56.9°C; 3, 61.1°C; 4, 63°C. La banda correspondiente a la



amplificación de DXR se indica con una flecha naranja. El carril del extremo izquierdo contiene el marcador de peso molecular de referencia, cada banda corresponde al peso indicado en pares de base (pb).

ii) HDR

El gen *HDR* codifica para la última enzima de la vía, la HMBPP reductasa (**HDR**). Este gen posee una región intergénica de 771 pb, una región UTR 5' de 106 pb y un marco abierto de lectura de 2355 pb conteniendo 10 exones (**Figura 15**). Por lo tanto, el producto esperado para este caso, con los *primers* *HDR Fwd GWprot* y *HDR revGWprot*, es un fragmento de 3233pb.



Figura 15. Gen HDR.

Debido a que la amplificación de *DXR* sin bandas inespecíficas se obtuvo a partir de 61°C de temperatura de alineamiento, para la amplificación de *HDR* se decidió probar las temperaturas de alineamiento de 60°C y 64°C (**Figura 16**). Se cortaron directamente del gel de agarosa las dos bandas observadas y se purificaron. Se corroboró la integridad del fragmento y el peso molecular esperado a través de electroforesis de una fracción del producto purificado (datos no mostrados).

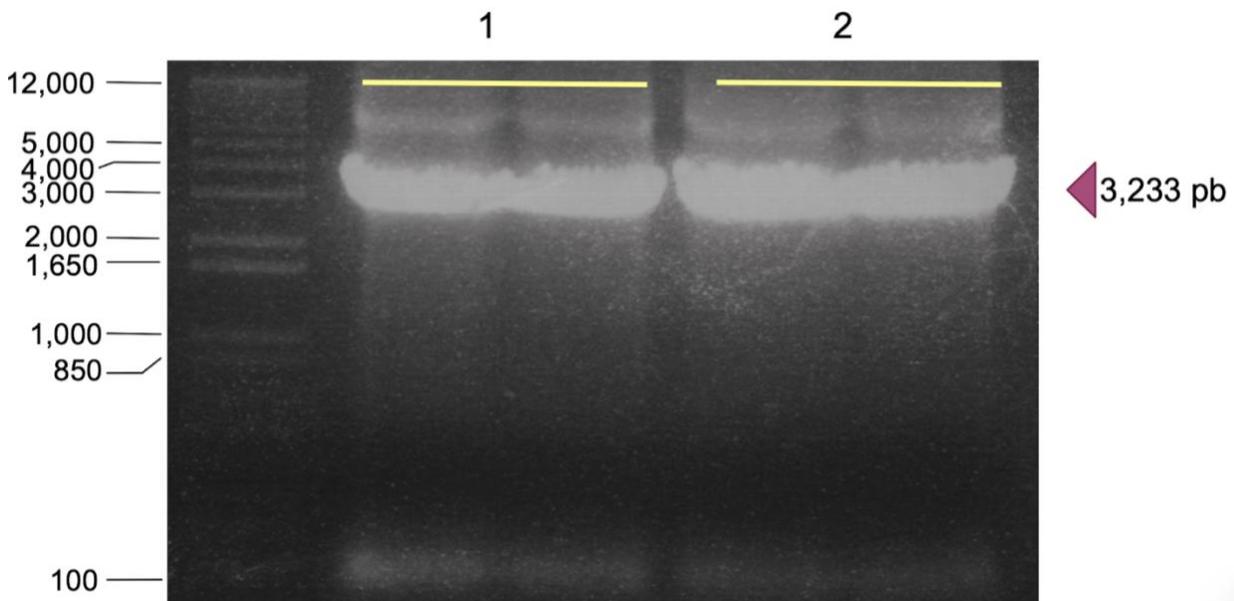


Figura 16. Amplificación de HDR. Se muestran los resultados de la amplificación bajo dos temperaturas de alineamiento: 1, 60°C; 2, 64°C. La banda correspondiente a la amplificación de HDR se indica con una flecha violeta. El carril del extremo izquierdo contiene el marcador de peso molecular de referencia, cada banda corresponde al peso indicado en pares de base (pb).

iii) MCT

El gen *MCT* codifica para la tercera enzima de la vía, la MEP-cistidiltransferasa (**MCT**). De manera interesante, este gen contiene una región intergénica predicha de sólo 8 pb, una región 5' UTR de 133 pb y un marco abierto de lectura de 2065 pb que incluye 12 exones (**Figura 17**). Debido a que la región intergénica es inusualmente pequeña, se decidió incluir una región más grande hacia el 5', en el caso de que los elementos regulatorios para la transcripción pudieran encontrarse sobrelapados con el gen río arriba. Por lo tanto, se decidió tomar 945 pb de la secuencia río arriba de *MCT*; lo que incluye tanto el extremo 5' UTR, como parte de la región codificante y una porción del último intrón del extremo UTR 3' del gen contiguo (AT2G02510, que codifica para la proteína "NADH dehidrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3-A). Por lo tanto, el par de *primers* utilizados ésta amplificación fueron ***MCT.Fwd GW*** y ***pMCTrvB2*** los cuales dan un fragmento de 3143 pb (**Figura 17**).

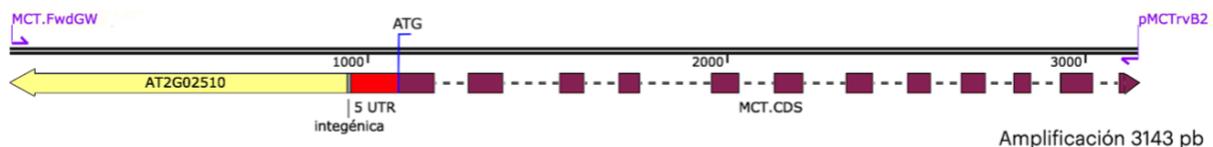


Figura 17. Gen MCT

Para la optimización de la amplificación de *MCT*, también se realizó un gradiente de temperaturas de alineamiento de 60 y 65°C. Se observó que en las dos temperaturas probadas amplificaron bandas abundantes del tamaño esperado, pero también se obtuvieron bandas inespecíficas pero de tamaños muy pequeños. Las bandas del peso molecular esperado fueron purificadas (**Figura 18**).

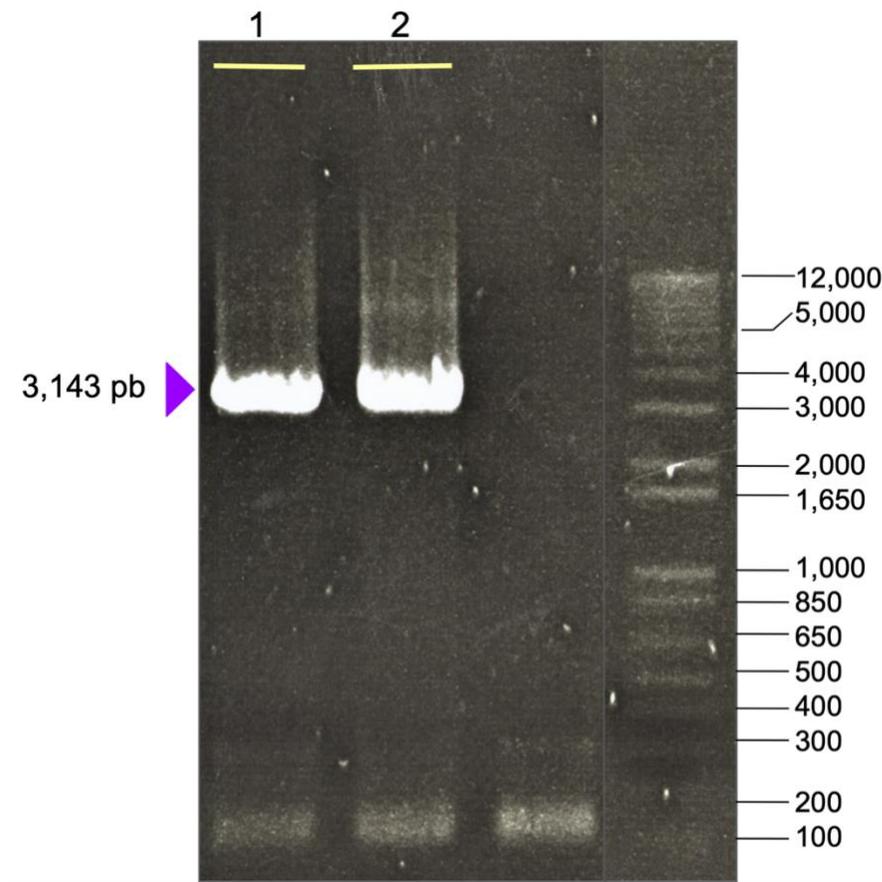


Figura 18. Amplificación de MCT. Se muestran los resultados de la amplificación bajo dos temperaturas de alineamiento: 1, 60°C; 2, 65°C; 3, control negativo. La banda correspondiente a la amplificación de MCT se indica con una flecha morada. El carril del extremo derecho contiene el marcador de peso molecular de referencia, cada banda corresponde al peso indicado en pares de base (pb).

iv) CMK

El gen *CMK* codifica para la cuarta enzima de la vía, CDP-ME cinasa (**CMK**) y contiene una región intergénica de 2227 pb, una región UTR 5' de 61 pb y un marco abierto de lectura de 2398 pb, conteniendo 11 exones. Este gen posee una región intergénica larga que se incluyó casi en su totalidad, como se observa en la posición del *primer* en sentido *pCMKfwB1* (**Figura 19**), por lo que para este gen el fragmento amplificado fue de 4524 pb.

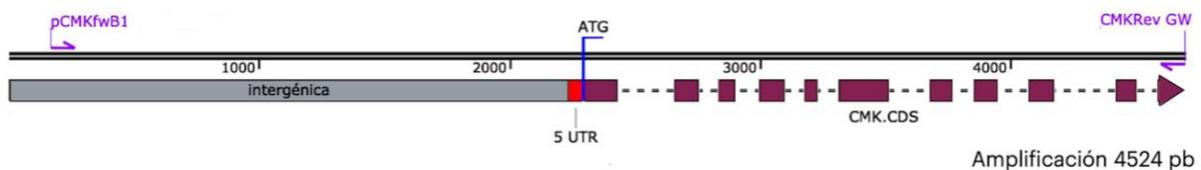


Figura 19. Gen *CMK*

Ya que en todas las amplificaciones de los genes previos se observó que a partir de 60° C de temperatura de alineamiento se reduce el número de bandas inespecíficas, para este gen ya no se realizó un gradiente de temperaturas de alineamiento y se amplificó directamente a 60° C. Como se muestra en la **Figura 20**, bajo estas condiciones se obtuvo una banda del tamaño esperado y sólo con tenues bandas inespecíficas de muy bajo peso molecular. Por lo tanto, se procedió a purificar el producto directamente del gel.

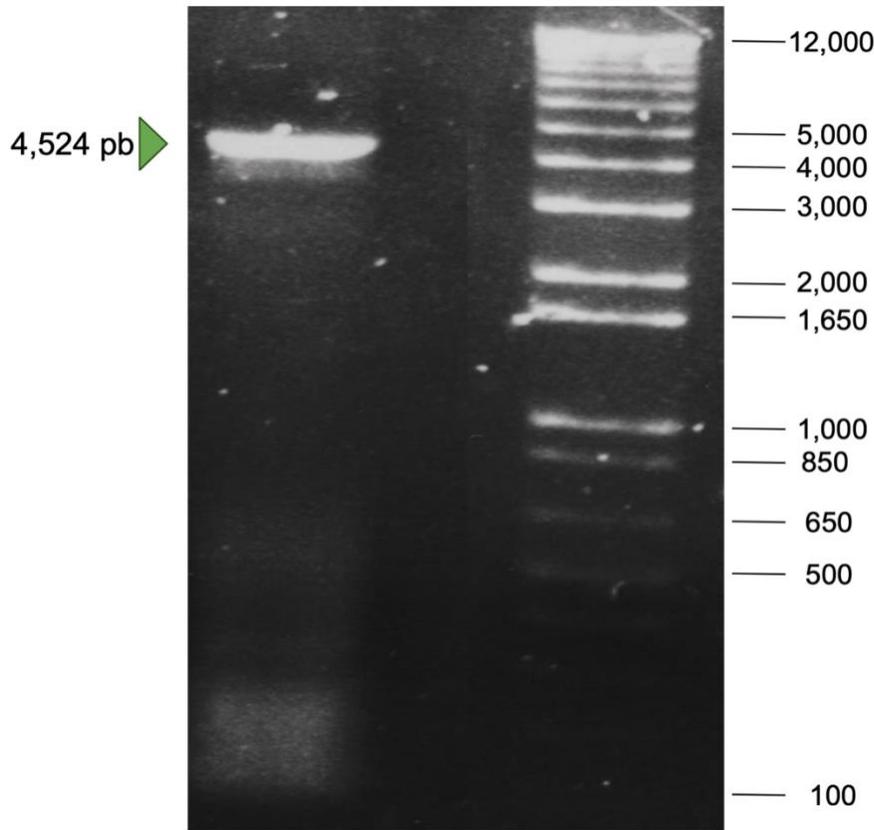


Figura 20. Amplificación de CMK. Se muestran los resultados de la amplificación de CMK a 60 °C de temperatura de alineamiento. La banda correspondiente a la amplificación de CMK se indica con una flecha verde. El carril del extremo derecho contiene el marcador de peso molecular de referencia, cada banda corresponde al peso indicado en pares de base (pb).

v) MDS

El gen *MDS* codifica para la quinta enzima de la vía, la CDP-ME2P sintasa (**MDS**). De manera similar que para el gen de *MCT* anteriormente descrito, *MDS* contiene una región intergénica de sólo 108 pb y una región UTR 5' de 48 pb. Su marco abierto de lectura es de 1411 pb conteniendo 3 exones. En este caso se decidió adicionar 135 pb de la secuencia del gen río arriba; los cuales comprenden una porción del extremo UTR 5' del gen AT1G63980 contiguo que codifica para una proteína desconocida con

posible función de unión a DNA (UniProt.org). Por lo tanto, utilizando los *primers* ***MDSFdGW*** y ***MDSRvGW*** se amplificó un fragmento de 1702 pb (**Figura 21**).

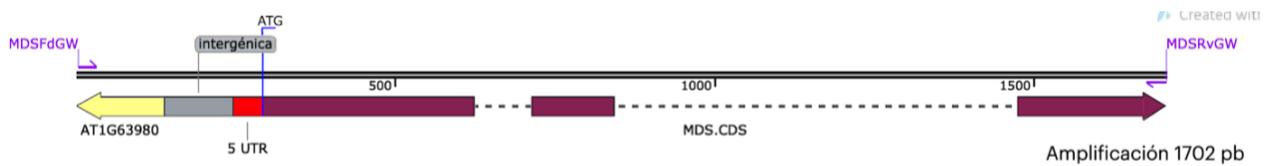


Figura 21. Gen *MDS*

Para la amplificación de este fragmento se empleó una temperatura inicial de alineamiento de 60 °C. El análisis del producto de la PCR mostró una banda del tamaño esperado y con solo algunas inespecificidades muy tenues de bajo peso molecular (**Figura 22**), por lo tanto, se purificó el producto de la amplificación y verificó la integridad del fragmento por electroforesis.

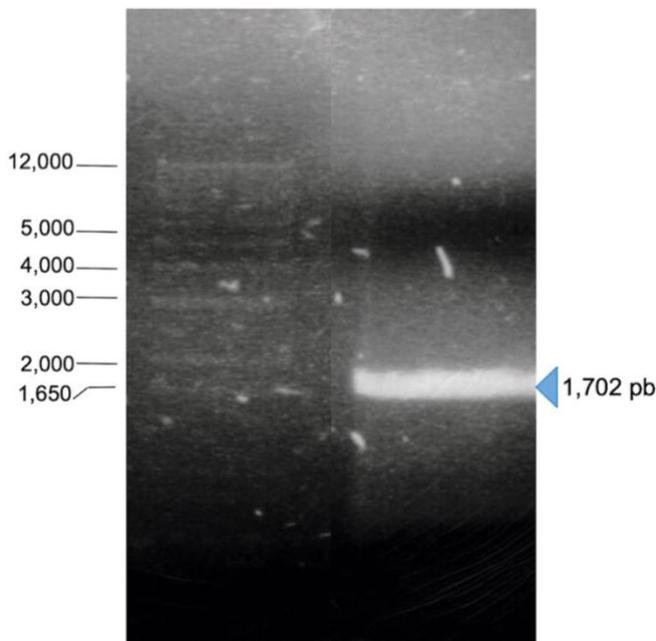


Figura 22. Amplificación de MDS. Se muestran los resultados de la amplificación de MCT a 60°C de temperatura de alineamiento. La banda correspondiente a la amplificación de MDS se indica con una flecha azul. El carril del extremo izquierdo contiene el marcador de peso molecular de referencia, cada banda corresponde al peso indicado en pares de base (pb).

vi) HDS

El gen *HDS* codifica para la penúltima enzima de la vía, la HMBPP sintasa (**HDS**). Este gen consta de una región intergénica de 115 pb, una región UTR 5' de 294 pb interrumpida por un intrón de 268 pb. Su marco abierto de lectura comprende 3825 pb conteniendo 19 exones. En este caso el *primer* en sentido ***HDSFdGW*** se

posiciona en la región 3' UTR del gen AT5G60590, un gen de función desconocida con dominio YrdC-like (UniProt.org) y en conjunto con el *primer* antisentido **HDSRvGW** amplifica un fragmento de 4604 pb, siendo el más grande de todo los genes de la vía (**Figura 23**).

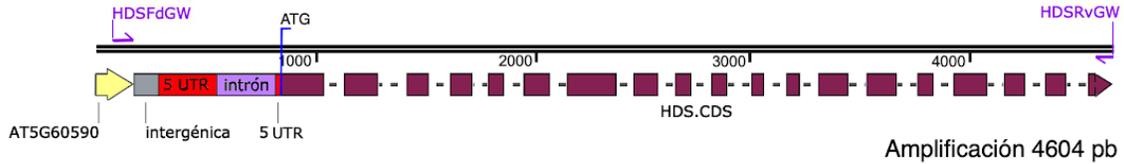


Figura 23. Gen HDS

Anteriormente, en el laboratorio ya se habían tratado de amplificar y clonar este gen, pero sin éxito, por lo que retomé la tarea de volverlo a amplificar.

Para tal motivo se usó una temperatura de alineamiento de 60°C, obteniendo un fragmento del tamaño esperado y con pocas inespecificidades como se muestra en la **Figura 24**, por lo que se procedió a su purificación y verificación en un gel de agarosa 1%, corroborándose el tamaño esperado.

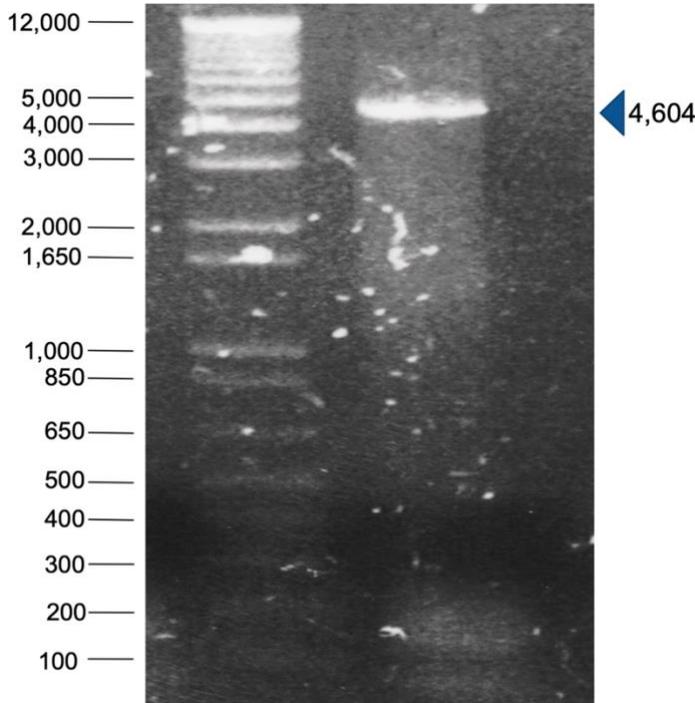


Figura 24. Amplificación de HDS. Se muestran los resultados de la amplificación de HDS a 60°C de temperatura de alineamiento. La banda correspondiente a la amplificación de HDS se indica con una flecha azul oscuro. El carril del extremo izquierdo contiene el marcador de peso molecular de referencia, cada banda corresponde al peso indicado en pares de base (pb).

En conclusión, siguiendo esta estrategia, fue posible amplificar cada uno de los productos génicos de interés.

b) Generación de construcciones de los genes que codifican para las enzimas de la vía MEP en vectores de expresión fusionadas al reportero de luciferasa.

A partir de los fragmentos purificados de cada uno de los genes de la vía, se prosiguió a realizar la reacción de recombinación BP del sistema Gateway® para crear la clona de entrada (**Figura 25. A**). Para verificar la presencia del gen de interés (inserto) en la clona de entrada, esta se introdujo en bacterias *E. coli* DH5α (**Figura 25.B**) y las colonias resultantes fueron analizadas por PCR y electroforésis probando la presencia de una región específica del gen de interés (**Figura 25.C** y **Figura 25.D**). De la colonia portadora del inserto de interés se purificó el DNA plasmídico y se secuenció para corroborar la ausencia de mutaciones en el inserto que hayan ocurrido durante la amplificación (**Figura 25.E** y **Figura 26**). Debido a que la mayoría de nuestros fragmentos son de alto peso molecular (**Tabla A.3, Anexos**), su secuenciación requirió emplear diferentes *primers* que permitieron cubrir todo el inserto de cada una de nuestras clonas (**Figura 26**). En la **Tabla A.5 (Anexos)** se muestran los datos de los *primers* empleados para la corroboración de las clonas y la secuenciación.

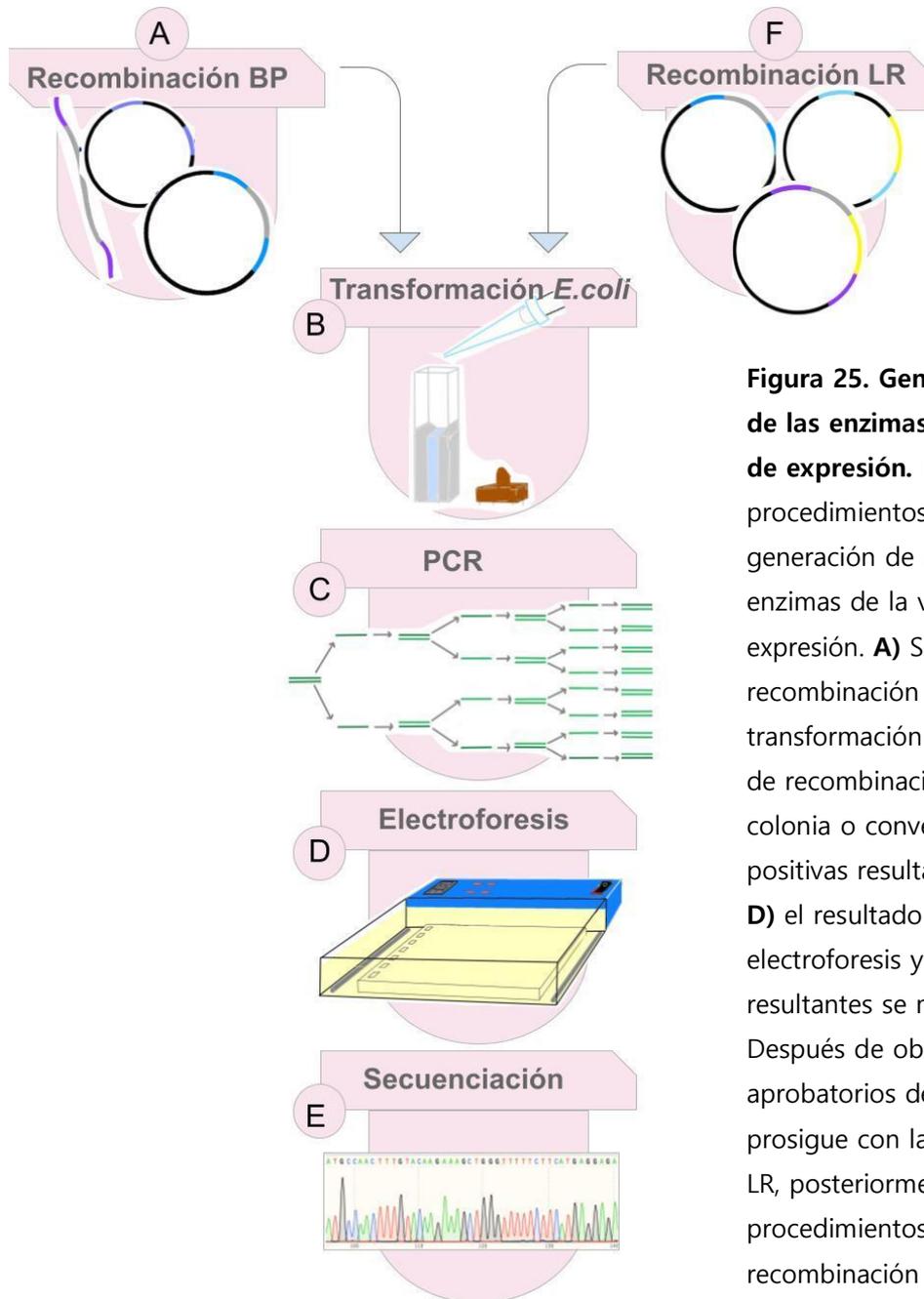


Figura 25. Generación de construcciones de las enzimas de la vía MEP en vectores de expresión. Esquema de los procedimientos realizados para la generación de construcciones de las enzimas de la vía MEP en vectores de expresión. **A)** Se inicia con la reacción de recombinación BP, **B)** se prosigue con la transformación de bacterias con el producto de recombinación, **C)** se realiza PCR de colonia o convencional de las colonias positivas resultantes de la transformación, **D)** el resultado de PCR se visualiza por electroforesis y una de las clonas positivas resultantes se mandaron a secuenciar. **E)** Después de obtener los resultados aprobatorios de la secuenciación, se prosigue con la reacción de recombinación LR, posteriormente, se realizan los mismo procedimientos que para la reacción de recombinación BP.

Una vez confirmada la secuencia correcta para cada gen, las clonas de entrada se transfirieron mediante reacción de recombinação LR al vector destino (pGWB435) que tiene al gen reportero de luciferasa (**Figura A.2, Anexos**) y así obtener la clona de expresión (**Figura 25. E**). Esta clona también se verificó que contuviera el inserto de interés mediante los mismos procedimientos de transformación de *E. coli* y una PCR

que amplificara un fragmento del gen de interés fusionado al gen de luciferasa. De la colonia portadora del inserto de interés se purificó el DNA plasmídico y se secuenció para verificar que el inserto estuviera en fase (fusión traduccional) con el gen de luciferasa por secuencia (**Figura 26**).

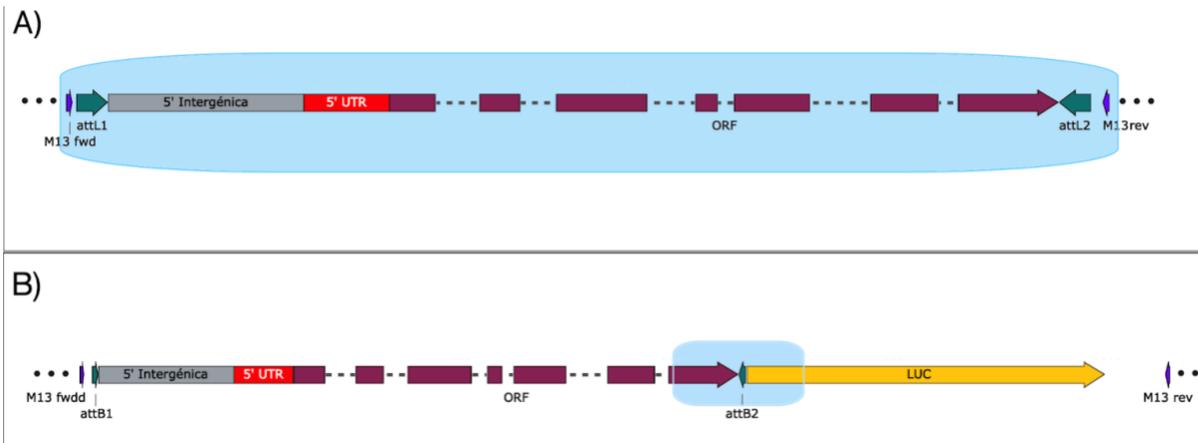


Figura 26. Secuenciación de clonas. Esquema de la región (sombra color azul) analizada en la clona de entrada (A) y la clona de expresión (B).

A continuación se presentan los resultados de la clonación para cada uno de los genes obtenidos.

i) DXR

Para corroborar la presencia de la clona en el vector de entrada se analizaron 10 colonias por PCR con los pares de *primers* **DXR 521 qPCR-R** y **5'dxr** que amplifican un fragmento de 375 pb. Como control positivo se utilizó DNA genómico y como control negativo una reacción que contenía todos los reactivos pero sin DNA plasmídico. Como se aprecia en la **Figura 27** de las 10 colonias analizadas únicamente la colonia 4 amplificó una banda del tamaño esperado. De ella se extrajo ADN plasmídico para corroborar por secuenciación.

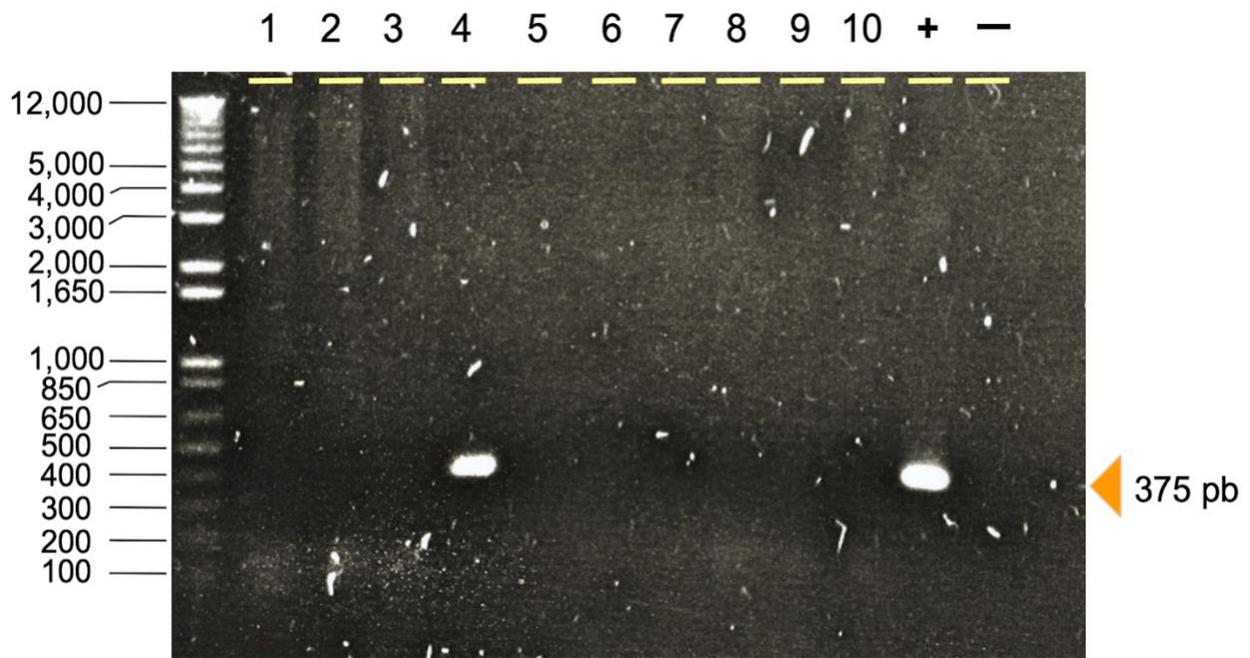


Figura 27. Comprobación del inserto DXR en la clona de entrada. Se muestran los resultados del PCR de colonia realizado para comprobar la presencia de DXR en la clona de entrada. Cada carril enumerado representa el resultado de la prueba de una colonia. El control positivo (+) incluye DNA genómico de planta de *Arabidopsis silvestre* y el control negativo (-) se realizó con todos los reactivos de la reacción (Ver materiales y Métodos 8.2.3-Reacción en cadena de la polimerasa) sin el material genético. La banda del peso molecular esperado se indica con una flecha naranja. El carril del extremo izquierdo contiene el marcador de peso molecular de referencia, cada banda corresponde al peso indicado en pares de base (pb).

Para secuenciar el fragmento completo se utilizaron los *primers* ***DXRprof***, ***5' dxr***, ***DXR 521 qPCR-R***, ***DXRfw2758*** y ***M13Rv*** (Figura 28), con la que se corroboró que el inserto no contenía mutaciones (datos no mostrados) y se procedió a realizar la reacción de recombinación LR para generar la fusión traduccional.

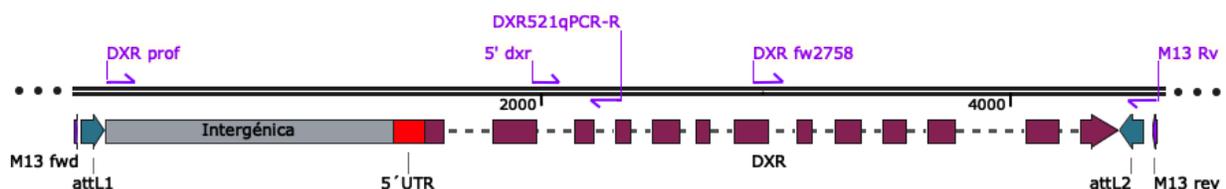


Figura 28. Secuenciación de *DXR* en pDNOR.

De la recombinación LR en el vector destino, se analizaron 11 colonias resistentes al antibiótico de selección por PCR para la presencia del fragmento de interés (**Figura 29**). Para el PCR se utilizaron los *primers* ***DXRfw2758*** y ***LucRev***, que amplifican un fragmento de 1900 pb. Se corroboró que las colonias 3, 7 y 11 tuvieron una amplificación del peso molecular esperado.

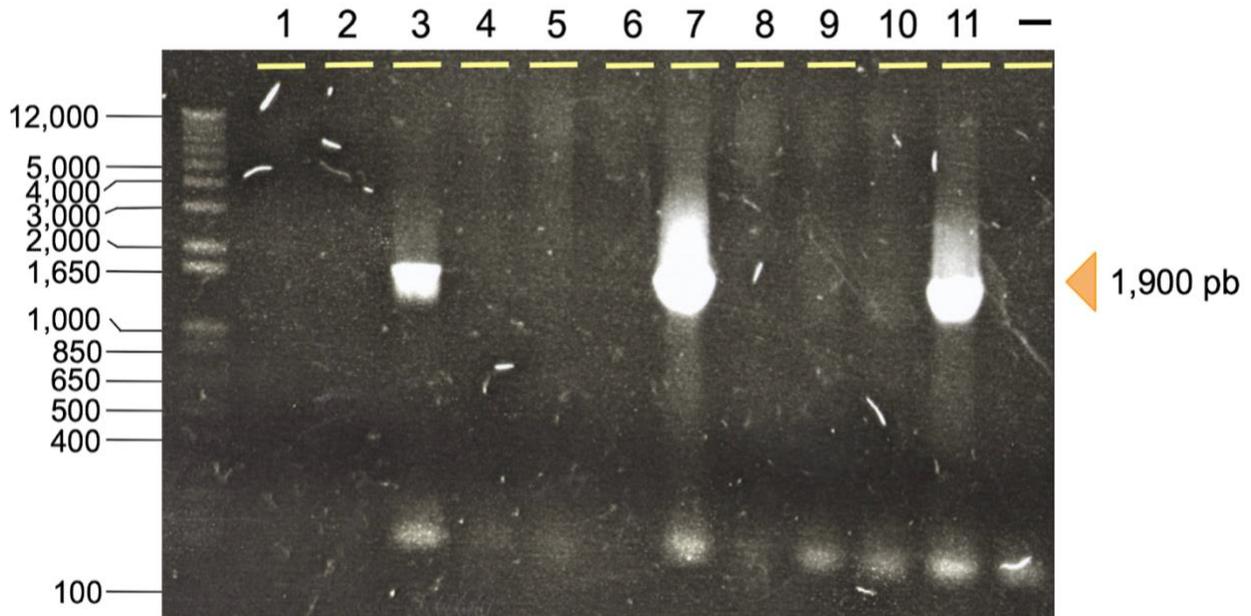


Figura 29. Comprobación del inserto DXR en la clona de expresión. Se muestran los resultados del PCR de colonia realizado para comprobar la presencia de DXR en la clona de expresión. Cada carril enumerado representa el resultado de la prueba de una colonia. La banda del peso molecular esperado se indica con una flecha naranja. El carril del extremo izquierdo contiene el marcador de peso molecular de referencia, cada banda corresponde al peso indicado en pares de base (pb).

Se eligió la colonia #11 para su secuencia con el *primer* ***LucRev*** con la que se corroboró que el gen *DXR* se encuentra en fase con el gen de luciferasa, obteniendo la clona deseada para este gen.

ii) MCT

Para *MCT* se analizaron por PCR colonia 6 colonias para la presencia del fragmento MCT en el vector de entrada, utilizando los pares de *primers* ***espárrago*** y ***MCTRv exon7***, que amplifican un fragmento de 822 pb. Como se muestra en la **Figura 30**, las colonias 4 y 6 amplificaron el fragmento del tamaño esperado; cabe mencionar que

en este análisis no se observó amplificación en el control positivo, probablemente por un error metodológico. A pesar de esto, se seleccionó y purificó el plásmido de la colonia 4 y se secuenció con los *primers* **M13fw**, **M13rv** y **espárrago**. Desafortunadamente, debido a la pandemia de COVID-19, solo se pudo corroborar parte de la secuencia de esta clona, correspondiente a los extremos 5' y 3' del gen (**Figura 31**). Por lo tanto, aún queda pendiente finalizar la corroboración de la secuencia así como su clonación en el vector destino.

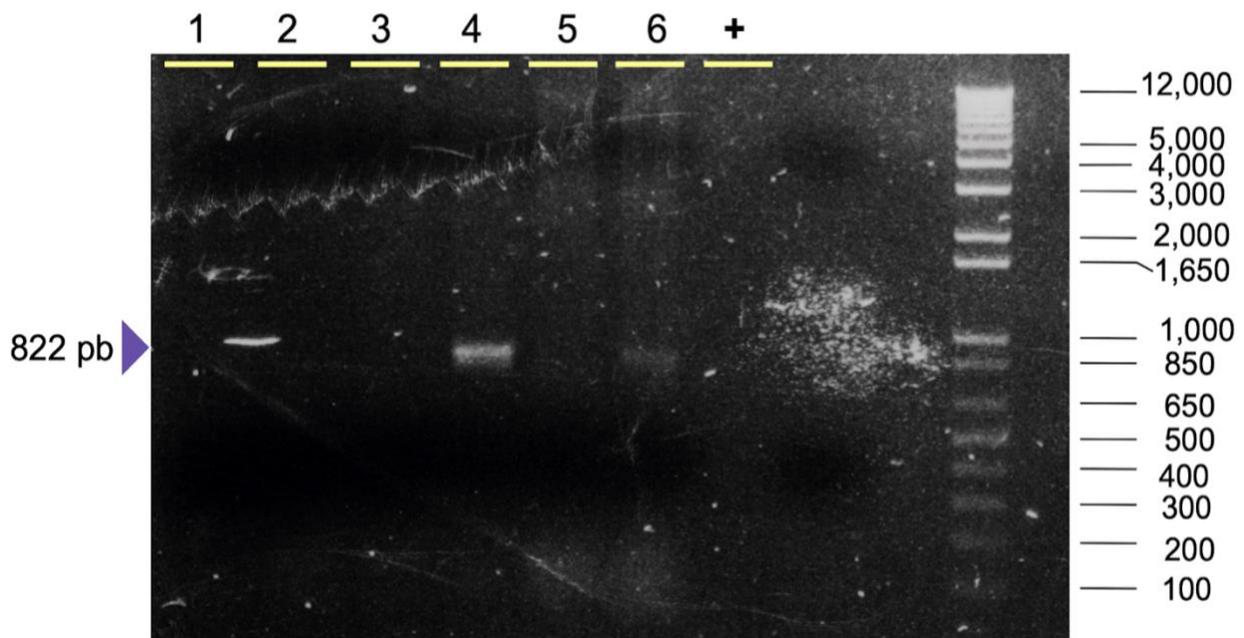


Figura 30. Comprobación del inserto MCT en la clona de entrada. Se muestran los resultados del PCR de colonia realizado para comprobar la presencia de MCT en la clona de entrada. Cada carril representa el producto de una colonia independiente. El control positivo (+) incluye DNA genómico de *Arabidopsis*. La banda del peso molecular esperado se indica con una flecha morada. El carril del extremo derecho contiene el marcador de peso molecular de referencia, cada banda corresponde al peso indicado en pares de base (pb).

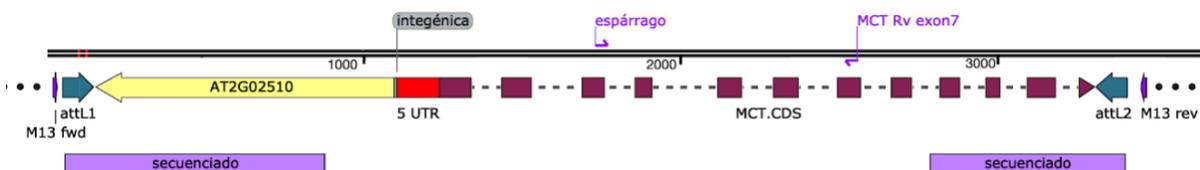


Figura 31. MCT en vector de donador. Se esquematiza el gen MCT insertado en el vector de donador. Se muestran los *primers* que se emplearon para el PCR de colonia, así como las regiones ya secuenciadas

iii)CMK

Para el caso de la clonación del gen *CMK*, se analizaron 6 colonias por PCR tanto convencional como de colonia, empleando los *primers mango* y *CMKexon8*, que producen un producto de amplificación de 1642 pb. Sin embargo, con ambas estrategias, no se obtuvo amplificación para ninguna de las colonias analizadas. Debido a que en ambas ocasiones el control positivo de DNA genómico tampoco dió amplificación, se concluyó que existía un problema técnico y que posiblemente se debía al *primer CMKexon8*. Por lo tanto, se cambió dicho *primers* por el *M13Rv*, esperando un fragmento de 2588 pb. Sin embargo, aún con este cambio tampoco hubo amplificación por lo que se diseñó un nuevo *primer (CMKfw5)* el cual amplificaría un fragmento de 1,111pb en combinación con el *M13Rv (Figura 32)*. Con este nuevo par de *primers* se reanalizaron las colonias inicialmente obtenidas pero sólo se obtuvo una amplificación tenue de un tamaño diferente al esperado (aproximadamente ~1650 pb; **Figura 33**). Estos resultados pueden explicarse en un escenario donde no se generó la clona de entrada con el inserto y el *primer CMKfw5'* se haya hibridado en alguna región del vector donador, dando como resultado la amplificación del fragmento inespecífico observado. Cuando se analiza por alineación, la secuencia del *primer CMKfw5'* y la secuencia del vector donador, se obtiene que existen dos sitios de 9 pb de posible hibridación del *primer* (datos no mostrados) y al estimar los tamaños de amplificación de estos sitios en conjunto con el *primer M13Rv* se obtiene un fragmento aproximadamente del tamaño observado en la **Figura 33** confirmando que ninguna de las clonas obtenidas y analizadas contiene el inserto deseado y por lo tanto, la clonación de CMK en la clona de entrada aún queda pendiente.

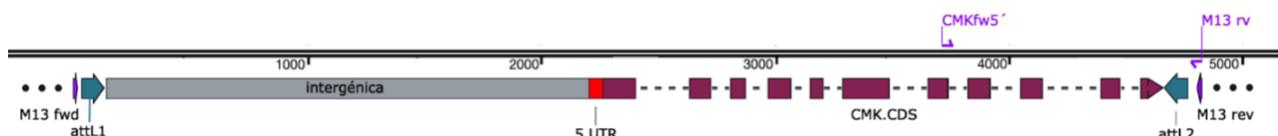


Figura 32. CMK en vector donador. Se esquematiza el gen CMK insertado en el vector de entrada. Se muestran *los primers* que se emplearon para el PCR de colonia.

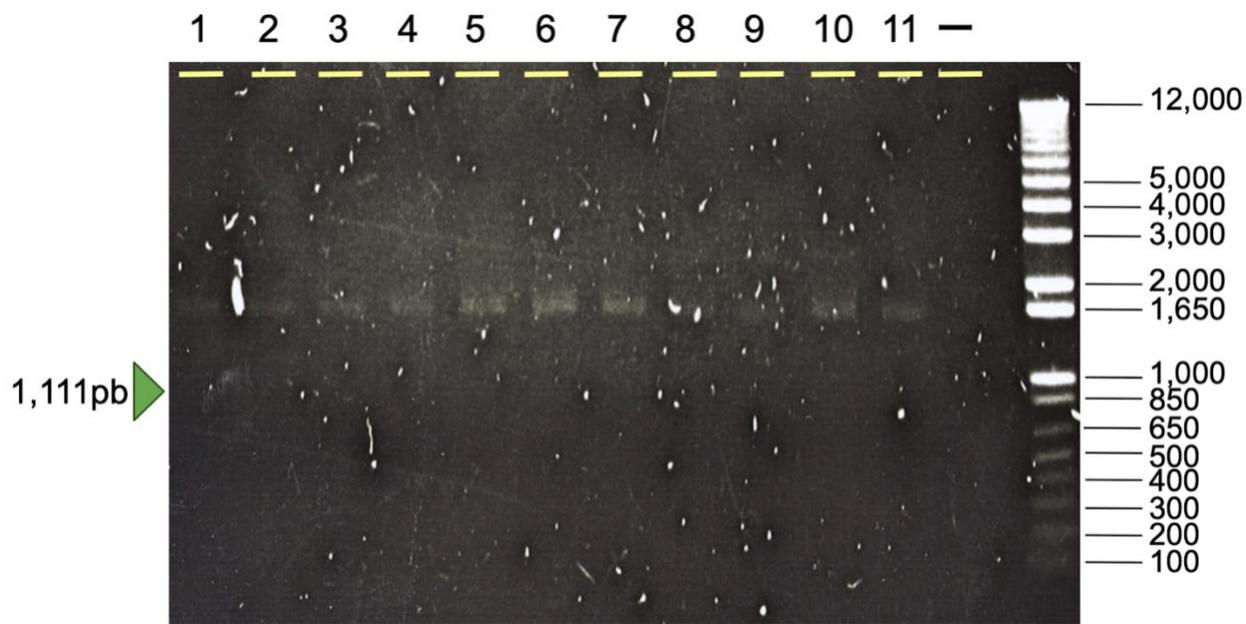


Figura 33. PCR de CMK. Se muestran los resultados del PCR realizado para comprobar la presencia de CMK en la clona de entrada con *los primers* CMKfw5 y M13Rv que amplifican 1111pb . Cada carril enumerado representa el resultado de la prueba de una colonia. La banda del peso molecular esperado se indica con una flecha verde. El carril del extremo derecho contiene el marcador de peso molecular de referencia, cada banda corresponde al peso indicado en pares de base (pb).

iv) MDS

Para el caso de MDS se analizaron por PCR de colonia 6 colonias obtenidas de la transformación con el producto de la recombinación BP, usando los *primers* **M13Fw** y **M13Rv**, que amplifican un fragmento de 1994 pb (**Figura 34**). Como se muestra en la **Figura 35**, 5 de las 6 colonias analizadas amplificaron un fragmento del peso molecular esperado. Se eligió la colonia 3 para su posterior secuenciación con los *primers* **M13fw** y **M13rv** (**Figura 34**) y de la secuencia resultante se corroboró que no existía mutaciones en esta clona.

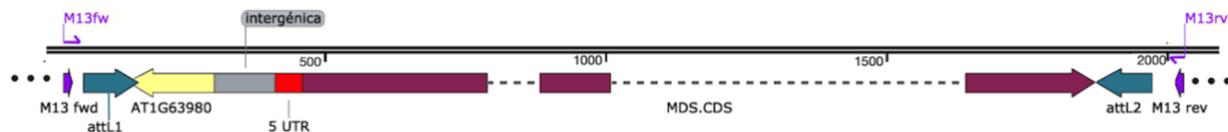


Figura 34. MDS en vector donador. Se esquematiza el gen MDS insertado en el vector de entrada. Se muestran *los primers* que se emplearon para el PCR de colonia y la secuenciación

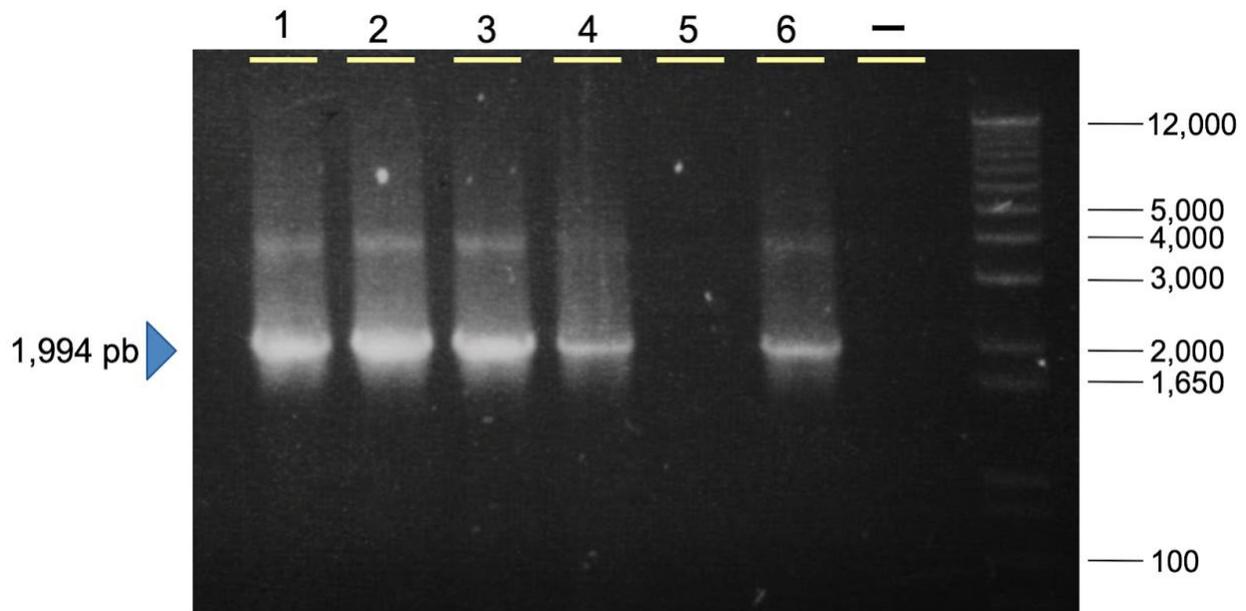


Figura 35. Comprobación del inserto MDS en la clona de entrada. Se muestran los resultados del PCR de colonia realizado para comprobar la presencia de MDS en la clona de entrada. Cada carril enumerado representa el resultado de la prueba de una colonia. La banda del peso molecular esperado se indica con una flecha azul. El carril del extremo derecho contiene el marcador de peso molecular de referencia, cada banda corresponde al peso indicado en pares de base (pb).

Por lo tanto, se prosiguió con la reacción de recombinación LR, con la que se obtuvieron 6 colonias que fueron analizadas por PCR. Una de ellas se mandó a secuenciar con el *primer LucRev* (resultados no mostrados). A partir de la secuencia se detectó un cambio de una base al principio del inserto que venía desde la clona de entrada y que, para nuestra sorpresa se encontraba en el penúltimo codón de la secuencia correspondiente al *primer* 3' utilizado para la amplificación inicial del gen. Por lo tanto, verificamos por secuenciación otras clonas provenientes de la recombinación inicial BP y encontramos que una de ellas poseía la secuencia correcta. A pesar de que el cambio en la secuencia generaba una mutación silenciosa (AAG=Lys por AAA=Lys), se volvió a realizar la reacción LR con la clona con la secuencia silvestre. De esta segunda reacción se obtuvieron 6 colonias que fueron analizadas por PCR con los *primers* *5'ispF* y *LucRev*, que amplifican un fragmento de 1653 pb. Cuatro colonias amplificaron la banda del tamaño esperado más una segunda banda inespecífica de menor tamaño (**Figura 36**). Debido a que el tamaño de la banda inespecífica era cercano a la banda de interés, se repitió el PCR realizando un gradiente de

temperaturas de alineamiento (55, 57.7 60.6 °C). Sin embargo, aún con la temperatura más alta no se logró eliminar la banda adicional (resultados no mostrados), por lo que se decidió proseguir a la secuenciación de la clona número 6 usando el *primer LucRev*. El resultado de la secuenciación comprobó que el gen *MDS* insertado en la clona de expresión se encuentra en fase con el gen de luciferasa.

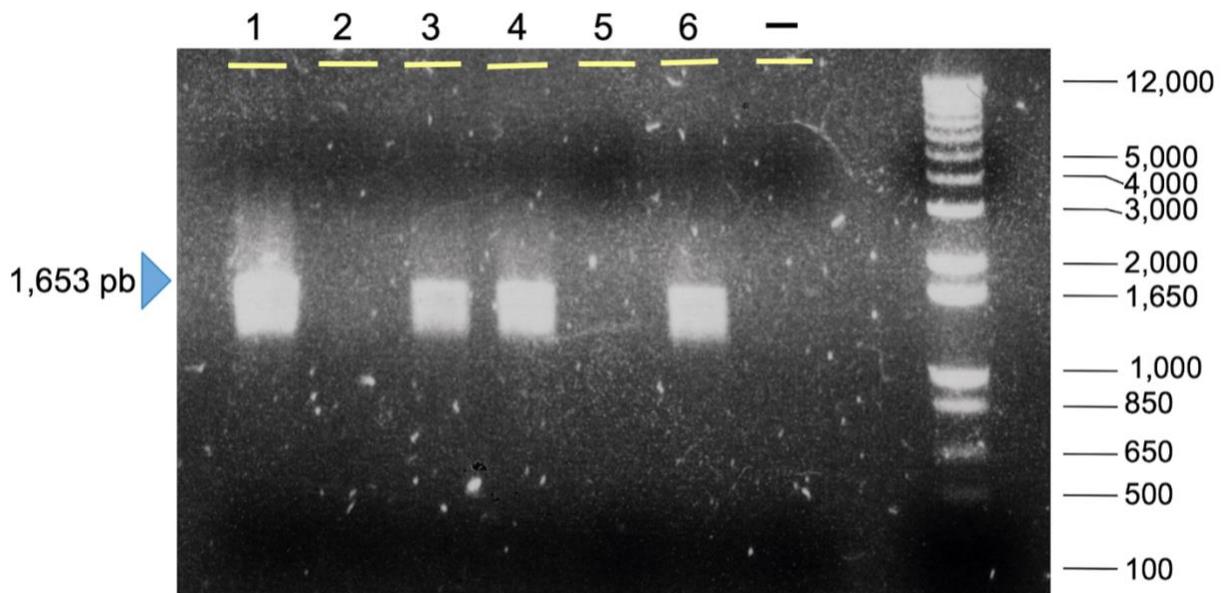


Figura 36. Comprobación del inserto MDS en la clona de expresión. Se muestran los resultados del PCR para comprobar la presencia de MDS en la clona de expresión. Cada carril enumerado representa el resultado de la prueba de una colonia. La banda del peso molecular esperado se indica con una flecha azul. El carril del extremo derecho contiene el marcador de peso molecular de referencia, cada banda corresponde al peso indicado en pares de base (pb).

v) HDS

Durante el tiempo de realización de este proyecto, la clonación del gen *HDS* presentó muchas complicaciones y no se logró obtener. A pesar de que la amplificación del gen a partir de DNA genómico se realizó sin inconvenientes, la purificación del fragmento y la transformación de *E. coli* DH5 α con el producto de la reacción BP dio siempre bajos rendimientos. Además, ninguna de las colonias obtenidas amplificaron el fragmento de interés, aunque se analizaron por PCR en varias ocasiones usando diferentes pares y combinaciones de *primers*: *M13Fw* y *Exon3Rv*, *Exon6fw* y

Exon14R y **IspG5'** y **Exon3Rv**. Ante esta situación, se analizó la posibilidad de que las colonias seleccionadas tuvieran el vector vacío, para ello se utilizaron los *primers* **M13Fw** y **M13Rv** que amplifican todo el fragmento amplificado que incluye a *HDS*. De esta manera si dichas clonas de entrada contenían el inserto deseado, amplificarían un fragmento de 4896 pb; mientras que, si se encontraban vacías (sin *HDS*) sería de 2507 pb. Como control positivo de la reacción de PCR se utilizó la clona de entrada de MDS, que genera un fragmento de amplificación de 1994 pb con los cebadores **M13**. En la **Figura 37** se observa que las dos colonias analizadas amplificaron bandas de distintos pesos moleculares al esperado, de aproximadamente de 2500 pb la de mayor abundancia y que no corresponde al peso deseado; mientras que el control positivo amplificó la banda del peso esperado. Obtuvimos amplificación de bandas de distintos pesos moleculares en el negativo, las cuales no pudieron resolverse aún después de haber repetido el PCR.

Por lo tanto este análisis demuestran que ninguna de las clonas contenían el fragmento de interés por lo que no pudo obtenerse la clonación de *HDS* en pDNOR en los intentos realizados en el presente trabajo.

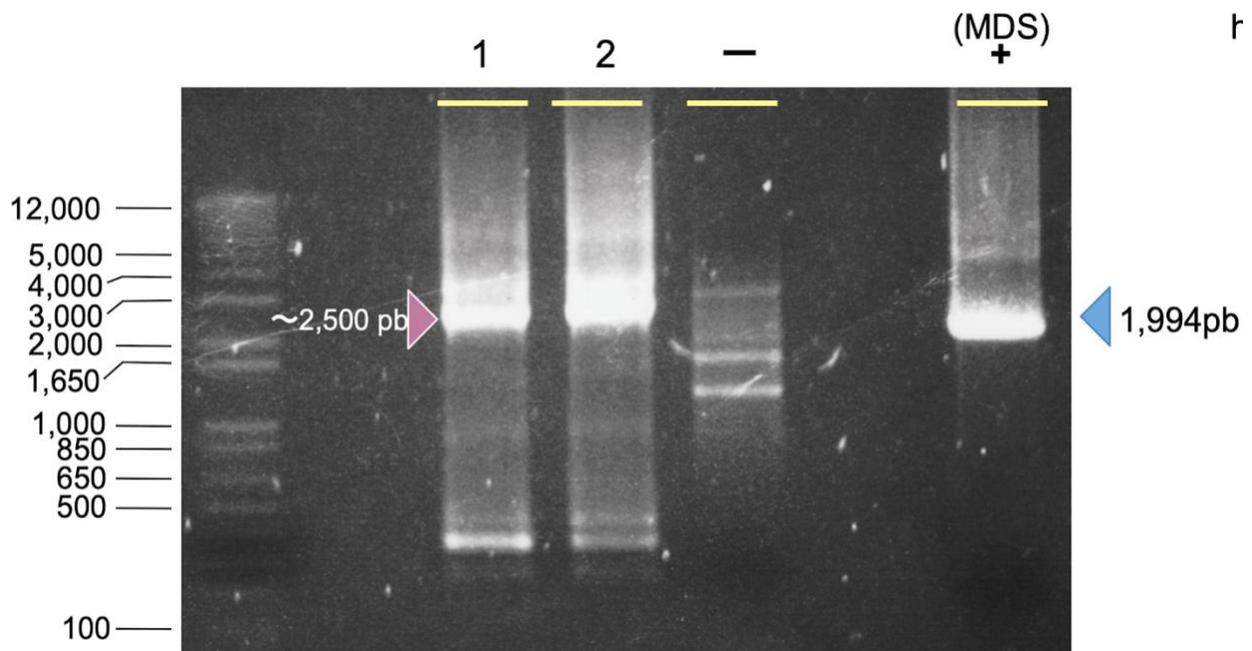


Figura 37. Comprobación del inserto HDS en la clona de expresión. Se muestran los resultados del PCR para comprobar si las colonias obtenidas de la transformación con el producto de la reacción BP contiene la clona de entrada con *HDS*. Cada carril enumerado representa el resultado de la prueba de

enumerado representa el resultado de la prueba de una colonia. El control positivo (+) se realizó con DNA genómico de planta de *Arabidopsis silvestre*. La banda correspondiente a la amplificación esperada se marca con una flecha morada. El carril del extremo izquierdo contiene el marcador de peso molecular de referencia, cada banda corresponde al peso indicado en pares de base (pb).

Posteriormente se realizó la recombinación LR y de la cual se obtuvieron 11 colonias que fueron analizadas por PCR empleando el par de *primers HDR650-QPCR-F* y *LucRev*, que amplifican un fragmento de 1800 pb. En la **Figura 40** se observa el gel de agarosa donde la colonia 1 amplificó la banda del peso esperado. Esta colonia se seleccionó y la clona correspondiente secuenciada empleando el *primer LucRev*, con lo cual se verificó que el gen *HDR* insertado en la clona de expresión se encuentra en fase con el gen de luciferasa.

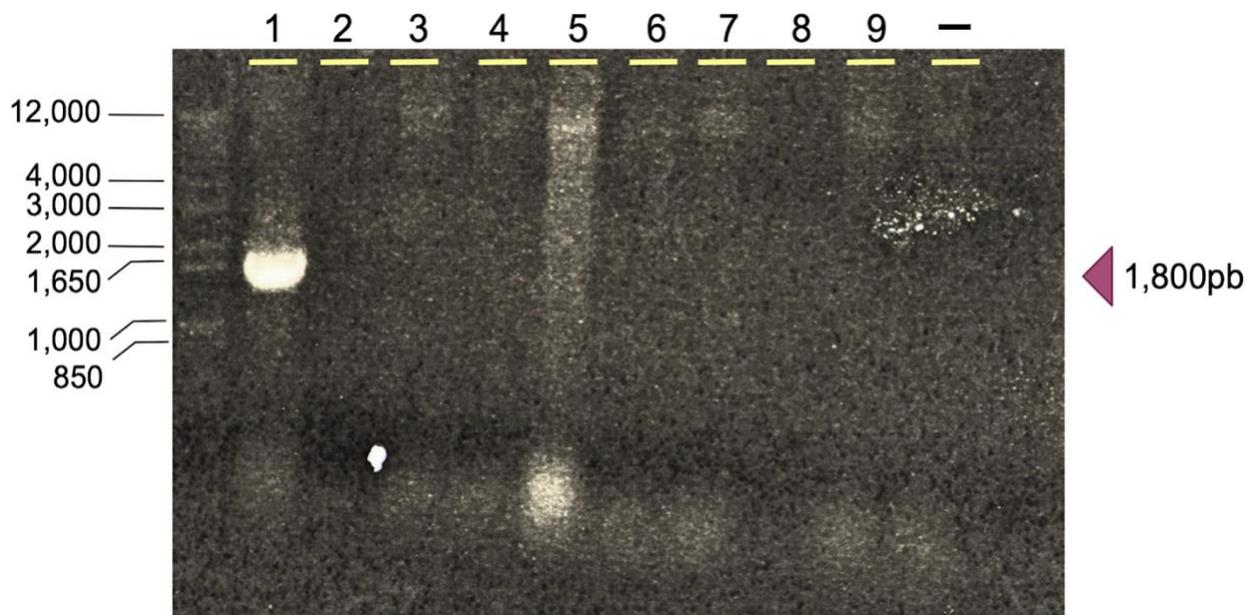


Figura 40. Comprobación del inserto HDR en la clona de expresión. Se muestran los resultados del PCR realizado para comprobar la presencia de HDR en la clona de expresión. Cada carril enumerado representa el resultado de la prueba de una colonia. La banda del peso molecular esperado se indica con una flecha morada. El carril del extremo izquierdo contiene el marcador de peso molecular de referencia, cada banda corresponde al peso indicado en pares de base (pb).

c) Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* con las construcciones generadas

Una vez que se obtuvieron las clonas de expresión para los diferentes genes, se procedió a generar plantas transgénicas a partir de cada una de las construcciones elaboradas siguiendo protocolo que se esquematiza en la **Figura 41**. En breve, plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* Col-0 se transformaron con un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* portando cada una de las clonas de expresión de interés (**Figura 41.A**). Posteriormente a lo largo de tres generaciones se seleccionaron las semillas mediante la evaluación del fenotipo de resistencia para la obtención de líneas independientes (**Figura 41.B**), sublíneas con una inserción (**Figura 41.C**) y sublíneas homocigotas (**Figura 41.D**).

A continuación se describen los resultados para cada paso del procedimiento general de los genes realizados *DXS*, *DXR* y *HDR*. Para ver los datos completos por gen, de cada línea, ver las **Tabla A.6; A.7 y A.8, Anexos**.

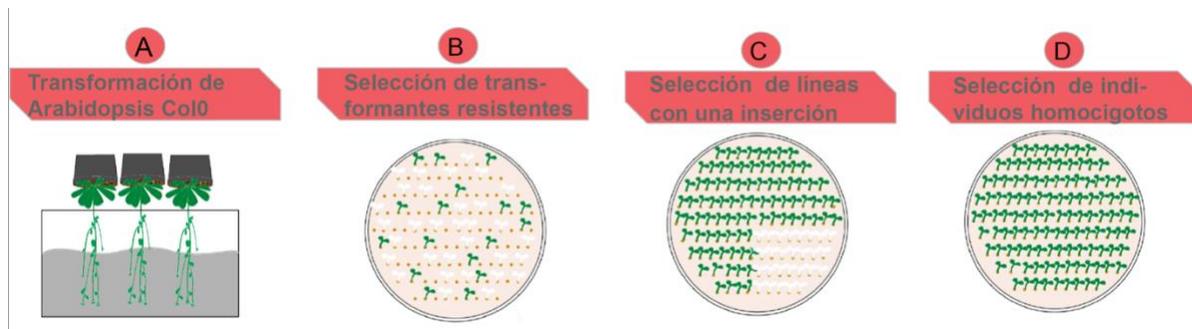


Figura 41. Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* con las construcciones generadas. Esquema de los procedimientos realizados para la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan las fusiones traduccionales de las enzimas de la vía MEP con luciferasa.

i) DXS

Se obtuvieron 13 líneas transgénicas independientes, nueve de ellas se analizaron para conocer su número de inserciones. En base a su segregación 7 líneas independientes se ajustaron a una inserción (**Tabla 3**), por lo que se obtuvo las semillas

de cada uno de estos individuos (sublíneas T3). El análisis de la resistencia a kanamicina de las semillas T3 permitió seleccionar las sublíneas L1.9 y L8.4 como homocigotas (**Tabla 3**).

Tabla 3. Registro y seguimiento de líneas independientes de *DXS*.

⊖ = Sin datos, **P** = datos pendientes, ✓ = afirmación, **X** = negación

Línea	Análisis de segregación			Sublíneas	Sublíneas homocigotas	
	Evaluidas	Una inserción	Valor p		Evaluidas	Sublíneas homocigotas
L1	✓	✓	0.06	8	✓	1 (L1.9)
L2	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
L3	✓	✓	0.9	5	P	P
L4	✓	X	0.02	-	P	P
L5	✓	✓	0.6	1	P	P
L6	✓	✓	0.6	5	P	P
L7	✓	✓	0.9	2	P	P
L8	✓	✓	0.3	8	✓	1 (L8.4)
L9	✓	✓	0.7	7	✓	X
L10	✓	X	3.9412x10 ⁻⁶⁶	-	-	-
L11	P	P	P	P	P	P
L12	P	P	P	P	P	P
L13	P	P	P	P	P	P

ii) DXR

Para este gen se obtuvieron 15 líneas transgénicas independientes y diez de estas fueron analizadas para el número de inserciones (**Tabla 4**). De estas, la segregación de 7 líneas se ajustó a una inserción. Finalmente se obtuvieron plantas homocigotas para 4 líneas independientes (**Tabla 4; Tabla A.6**, Anexos).

Tabla 4. Registro y seguimiento de líneas independientes de *DXR*

☐ = Sin datos, **P** = datos pendientes, ✓ = afirmación, **X** = negación

Línea	Análisis de segregación				Sublíneas homocigas	
	Evaluated	Una inserción	Valor p	Sublíneas	Evaluated	Homocigotas
L1 ^P		-	-	-		
L2	✓	✓	0.7	7	✓	2(L2.1/2)
L3	✓	✓	0.3	7	✓	X
L4	✓	✓	0.4	7	✓	3(L4.2/3/4)
L5	✓	X	0.004	-		
L6	✓	✓	0.1	8	✓	X
L7	✓	X	0.003	-		
L8	✓	✓	0.7	7	✓	1 (L8.4)
L9	✓	✓	0.3	7	✓	2(L9.1/3)
L10	✓	✓	0.3	6	✓	X
L11	✓	X	0.01	-		
L12 ^P		-	-	-		
L13 ^P		-	-	-		
L14 ^P		-	-	-		
L15 ^P		-	-	-		

iii) HDR

Se obtuvieron 5 líneas independientes, pero sólo 2 de ellas se ajustó a una segregación esperada para una sola inserción. Hasta el momento se obtuvo plantas homocigotas de la línea 1 posee (**Tabla 5; Tabla A.7, Anexos**)

Tabla 5. Registro y seguimiento de líneas independientes de HDR

⊖ = Sin datos, P = datos pendientes, ✓ = afirmación, ✗ = negación

Línea	Análisis de segregación				Sublíneas homocigotas	
	Evalúadas	Una inserción	Valor p	Sublíneas	Evalúadas	Homocigotas
HDR L1	✓	✓	0.3	6	✓	3(L1.1/5/6)
HDR L2	✓	✓	0.9	6	✓	✗
HDR L3	✓	✗	2.25075X10 ⁻⁵	-	-	-
HDR L4	✓	✗	0.000007	-	-	-
HDR L5	✓	✗	0.06	-	-	-

El objetivo inicial de este proyecto fue generar líneas transgénicas con fusiones de todas las enzimas de la vía MEP con el gen reportero de luciferasa. No obstante, debido a las limitaciones de tiempo y restricciones de trabajo derivadas de la pandemia de COVID-19, durante esta tesis no fue posible generar las líneas transgénicas para todos los genes. No obstante, como se muestra en el capítulo anterior, se generó la clona de expresión del gen *MDS*; la clona de entrada de *MCT* y se amplificaron los genes *CMK* y *HDS* lo que representa un avance importante para el objetivo general del proyecto (**Figura 42**).

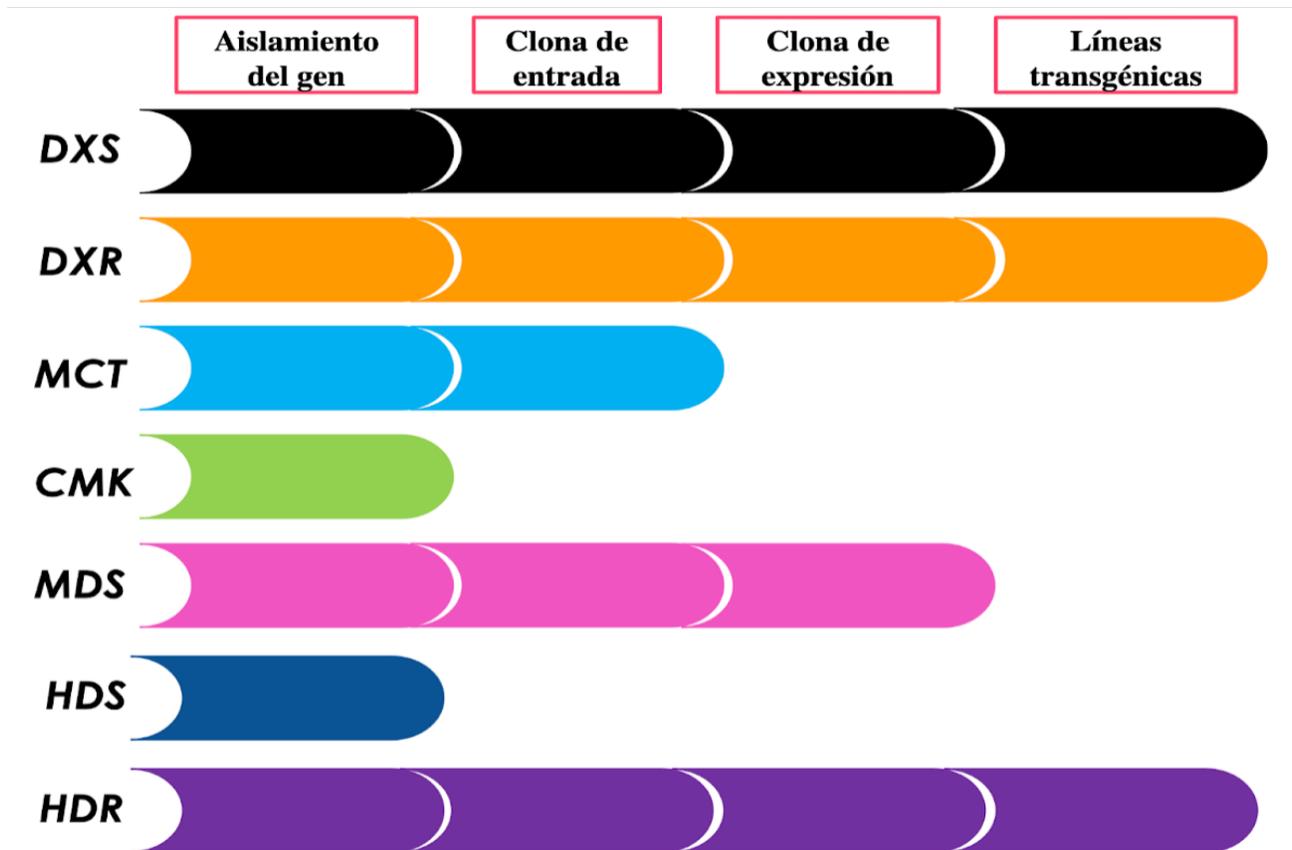


Figura 42. Avance por etapas en la generación de líneas transgénicas de las enzimas de la vía MEP que expresan fusiones traduccionales con luciferasa.

d) Comprobación de la expresión de los transgenes a través de la actividad de luciferasa

Con el propósito de corroborar si las líneas transgénicas seleccionadas expresan la construcción, se realizó un análisis preliminar de la actividad de esta enzima en algunas de las líneas con una inserción disponibles en ese momento. Se analizaron 3 líneas para *DXS* y *DXR* y 2 líneas para *HDR*. De cada una de estas líneas se obtuvo extracto de proteínas totales de plántulas de 12 días de edad (**Figura 43.A**). Se cuantificó la proteína total de los extractos proteicos a través del método de Bradford (**Figura 43.B; Tabla A.9, Anexos**). El extracto proteico de cada línea fueron utilizados para cuantificar la actividad de luciferasa por ensayo *in vitro* (**Figura 43.C**).

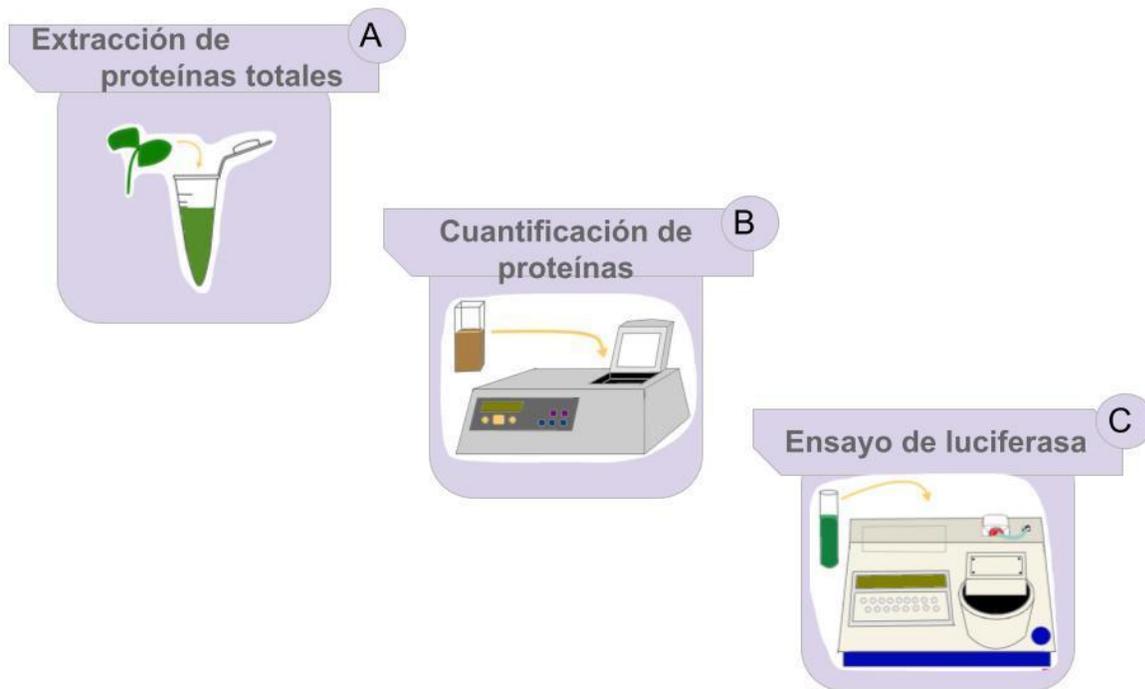
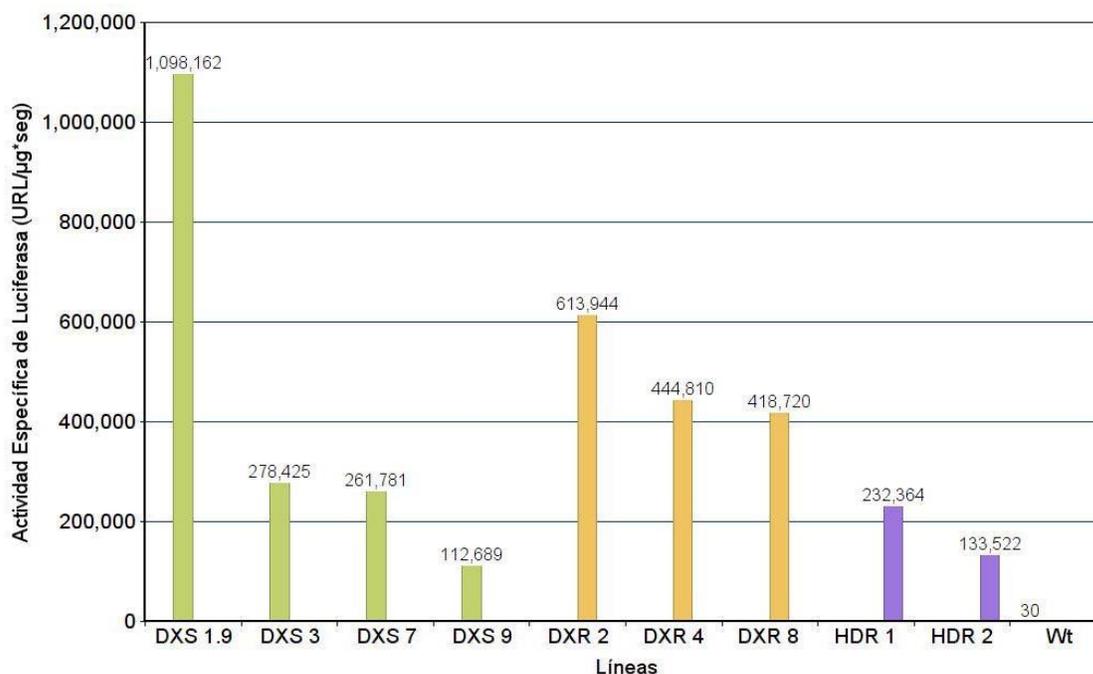


Figura 43. Comprobación de la expresión de transgenes por ensayo de luciferasa. Esquema de los procedimientos realizados para comprobar la expresión de los transgenes en las líneas transgénicas seleccionadas. Las líneas a evaluar se crecieron *in vitro* y se extrajeron las proteínas totales (A), el extracto de proteínas se cuantificó en espectrofotómetro por el método de Bradford (B). En un luminómetro, se analizó la actividad de luciferasa en los mismos extractos proteicos (C).

Las Unidades Relativas de Luz (URL) obtenidas para cada construcción se emplearon para calcular la actividad específica de luciferasa ($\text{URL}/\mu\text{g}\cdot\text{seg}$) de proteína (**Tablas A.9, A.10 y A.11; Anexos**). Las actividades específicas de cada una de las líneas analizadas se muestran en la **Gráfica 1**. Se observó que todas las líneas analizadas presentan actividad de luciferasa, en contraste con el control negativo correspondiente a un extracto de proteínas totales de plántulas silvestres de *A. thaliana* silvestre. Se puede apreciar que los niveles de actividad de las líneas independientes de un mismo gen es similar, excepto para el caso de la línea DXS 1.9 que presentó la mayor actividad específica. Este resultado puede deberse a que DXS 1.9 es la única línea homocigota o bien a que el sitio de inserción de esta línea da niveles más altos de expresión. Estas posibilidades se analizarán una vez que se obtengan las líneas homocigotas de cada gen. De esta manera, se demostró que la expresión de los transgenes y el reportero Luc se está llevando a cabo.



Gráfica 1. Actividad específica de Luciferasa en sublíneas independientes.

e) Evaluación de una de las líneas transgénicas como herramientas para el estudio dinámico de la regulación post-transcripcional de la vía MEP

Para evaluar el potencial de las líneas transgénicas como herramientas para el estudio dinámico de la regulación post-transcripcional de la vía MEP, se analizó de manera preliminar la actividad de luciferasa *in vivo*. Dado que la vía MEP es esencial durante el desarrollo temprano de *Arabidopsis* (Mandel *et al.*, 1996; Roodriguez-Concepción, 2006; Vranova *et al.*, 2013) y se conoce el patrón de expresión del gen *DXS* durante este fase de crecimiento (Estevez *et al.*, 2001, Carrtero-Paulet *et al.*, 2002) se decidió evaluar en una línea homocigota de *DXS*, la actividad *in vivo* de luciferasa durante los primeros 10 DDE. Para ello, se asperjaron tres plántulas de 4 DDE de la línea homocigota *DXS 1.9* con luciferina y se visualizaron en una cámara de alta sensibilidad 25 min, 2.5h, 24h, 48h y 7 días después de la aspersion. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento con plántulas silvestres Col-0.

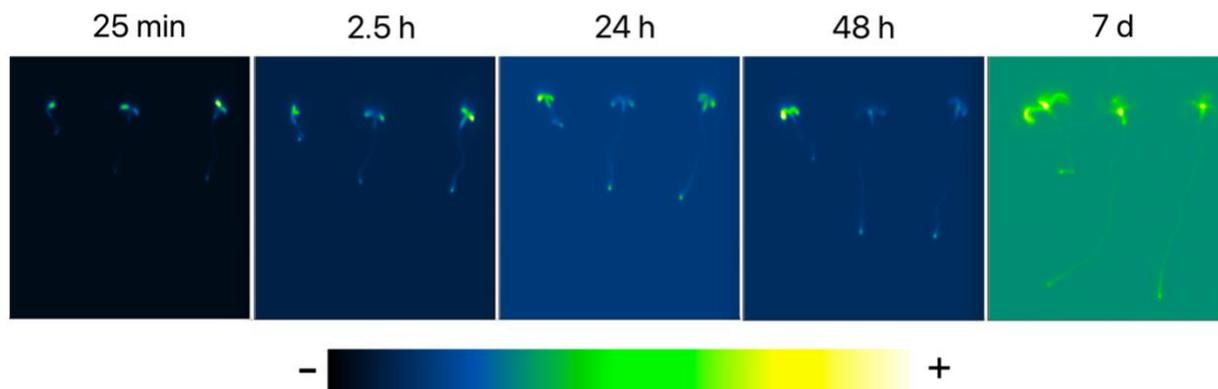


Figura 44. Actividad in vivo de luciferasa en plantas transgénicas de DXS. Plantulas de DXS 1.9 visualizadas 25 min (4DDE), 2.5 h, 48 h y 7 días (11 DDE) después de ser asperjadas con luciferina. La escala representa la referencia del color (LUT: Green Fire Blue) asignado de acuerdo a la intensidad luminica detectada.

La **Figura 44** muestra que hay señal luminosa en todas las plántulas transgénicas, 25 minutos después de haber suministrado luciferina, mientras que esto no se observó en plántulas silvestres en ninguno de los tiempos analizados (**Figura A.3, Anexos**). A los 25 min la señal de mayor intensidad proviene de los cotiledones, dos horas después aparece señal baja en el ápice de la raíz e hipocotilos. A partir de este momento, uno de los individuos que presenta retraso en el desarrollo se comienza a comportar diferente ya que mantiene un patrón de señal similar al estado de 2.5h, mientras que los individuos restantes que mantiene un desarrollo normal disminuyen la señal en los cotiledones a las 24 y 48 h y aparece señal nuevamente a los 7 días en la zona del meristemo apical y en la zona de elongación de la raíz.

8) Discusión y Perspectivas

Para aproximarnos al estudio dinámico de la regulación post-transcripcional de la vía MEP, en el presente trabajo se acopló en *Arabidopsis thaliana* la expresión de las diferentes enzimas de la vía MEP, con la proteína reportera luciferasa de *Photinus pyralis* (F-Luc). Como parte esencial de este objetivo se generaron construcciones traduccionales, mediante el sistema Gateway®. El uso de este sistema requirió aislar las regiones de interés de cada gen empleando *primers* específicos adicionados con los sitios de recombinación cuya longitud (~55 pb, Tabla A.3) inusualmente grande (en comparación con los *primers* que se utilizan para PCRs convencionales) requirió un ajuste a las temperaturas de alineamiento (T_m) para obtener una cantidad suficiente y específica del fragmento deseado. Como se muestra en la sección 7.A, fueron necesarias T_m s mayores a 60° C para la obtención fragmentos abundantes y específicos. Este comportamiento concuerda con la teoría general de PCR en la cual se establece que la T_m de los cebadores al DNA templado depende proporcionalmente de la longitud de los cebadores y su porcentaje de GCs (Wu *et al.*, 1991; Rychlik *et al.*, 1990). Siguiendo esta estrategia, en este trabajo se logró amplificar el gen más grande de todos los de la vía, *HDS*, el cual no se había podido aislar en ocasiones anteriores.

Debido a todos los elementos génicos que fueron incluidos para cada construcción, los fragmentos de DNA generados para la mayoría de genes fueron grandes (> 3000 pb), lo que conllevó a algunas complicaciones técnicas para concretar la reacción BP de los genes *HDS* y *CMK*. En ambos casos se recuperaron algunas colonias presuntamente resistentes al antibiótico, pero ninguna de ellas contenía la clona de entrada (**Figura 37**, *CMK*; **Figura 41**, *HDS*), es decir, el gen de interés no se recombinó en el vector donador. Esta situación resulta sorprendente ya que el sistema Gateway está diseñado para evitar la recuperación de vectores que no han recombinado, pues llevan un gen letal. Probablemente estas colonias resultaron de bacterias no transformadas y crecieron por un error técnico en el suministro de la concentración apropiada del antibiótico de selección. Alternativamente, es posible que la dificultad de generar las clonas de entrada de estos genes se deba al tamaño del inserto (4604 pb para *HDS* y 4524 pb para *CMK*) ya que el sistema Gateway® baja su eficiencia con fragmentos de 5 Kb (Invitrogen, User guide). Por lo tanto para obtener

dichas clonas en el futuro proponemos emplear una mayor concentración de producto amplificado de PCR, con la idea de aumentar la probabilidades de la recombinación (Esposito *et al.*, 2009). Otra posible explicación es la existencia de alguna secuencia dentro de los genes que interfiriera con el proceso de recombinación.

La segunda fase del proyecto consistió en la obtención de líneas transgénicas y su evaluación como herramientas para el estudio de la regulación post-transcripcional. Primeramente, se comprobó la expresión de las construcciones en las líneas transgénicas a través de la cuantificación de la actividad de luciferasa *in vitro*. A través de este ensayo se confirmó, por un lado, que la región intergénica seleccionada y los elementos génicos incorporados a la construcción permiten la transcripción y traducción de los genes analizados (*DXS*, *DXR* y *HDR*) en plántulas de 10 días de edad y por otro lado, que la fusión con las diferentes proteínas de la vía MEP no interfiere con la actividad catalítica de luciferasa. Como era esperado, los niveles de expresión varían entre las líneas independientes de cada gen (**Gráfica 1**), debido al método de transformación con *Agrobacterium*, el cual genera inserciones aleatorias en el genoma de la planta. Consecuentemente, el sitio de inserción de la construcción en cada línea es diferente y por lo tanto, su expresión está influenciada por el contexto genómico en el que se encuentre (Peach & Velten, 1991; Mannerlöf & Tening, 1997; Gelvin, 2003). Por ello, es necesario generar al menos tres líneas independientes que permitan identificar que los cambios de expresión que puedan ser observados dependen de la regulación de las señales incluidas en la construcción y no debido al sitio de inserción de la construcción (Cazonelli & Velten, 2006). Esta limitante ocasiona que la generación del material biológico deseado sea un proceso laborioso y tardado. En el presente trabajo sólo se lograron generar líneas transgénicas homocigotas para los genes de *DXS*, *DXR* y *HDR*, pero se avanzó en la obtención de la clonas de MCT y MDS, lo que representa una contribución importante para el objetivo general de este proyecto.

Posteriormente, y debido a las limitaciones del tiempo ocasionadas por la pandemia del covid, solo fue posible observar de manera preeliminar la actividad *in vivo* de luciferasa en una línea homocigota de *DXS* (**Figura 44**). En primera instancia, se observa que hay detección de la actividad de luciferasa desde los 25 min después de haber sido asperjadas. Sin embargo 2.5 h después, el patrón se hace más evidente, detectandose también en el ápice de la raíz. Posiblemente, la observación a los 25 min

es un tiempo corto para que el sustrato alcance a permear todos los tejidos de la planta. Por otro lado, los resultados obtenidos mostraron un patrón de expresión concreto de la actividad de luciferasa, el cual concuerda con estudios previos realizados por western blot, en los cuales DXS se acumulan a partir de los tres días de edad y esta se mantiene a lo largo del desarrollo temprano siendo predominantemente acumulada en tejidos jóvenes (Estévez *et al.*, 2000; Guevara-García *et al.*, 2005). Adicionalmente, nosotros detectamos actividad de luciferasa en el ápice de la raíz en plántulas de 4 días 2.5 horas después de haber sido asperjadas y bajos niveles de actividad en el resto de la raíz a partir de los 11 días de edad. Es razonable considerar que este patrón de expresión no había sido detectado anteriormente debido a que los bajos niveles de expresión del ápice se diluían al analizar la raíz completa. Estos resultados destacan la fidelidad de F-Luc para reflejar el patrón de acumulación de la proteína así como su alta sensibilidad (Luehrsen & Walbot, 1993).

Otro aspecto a resaltar de estos resultados es el potencial de las líneas para detectar eventos regulatorios de tipo post-transcripcional, ya que el estudio de la expresión de *DXS* con GUS abarcando la misma longitud de la región regulatoria que nuestras construcciones (Carretero-Paulet *et al.*, 2002), mostró que este se expresa en todos los tejidos de una plántula de 6 días. La diferencia en el patrón observado con construcciones transcripcionales y post-transcripcionales sugieren la posibilidad de que la expresión de *DXS* se da en todos los tejidos pero por algún mecanismo post-transcripcional únicamente se traduce en el ápice de la raíz.

Diversos estudios han explotado las características no invasivas de F-Luc para estudiar procesos biológicos dinámicos como la regulación mediada por el ciclo circadiano en plantas (Millar *et al.*, 1992; Welsh *et al.*, 2005; Hall & Brown, 2007), respuestas a estrés (Chinnusamy *et al.*, 2002; Christmann *et al.*, 2005) e interacciones de proteínas (Chen *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011; Gehl *et al.*, 2011). Además, con el uso de F-Luc se han logrado estudiar diferentes eventos regulatorios a nivel post-transcripcional como la influencia de los diversos elementos génicos en la estabilidad o eficiencia de traducción de un mensajero de RNA (Galilie *et al.*, 1991), la identificación de eventos regulatorios post-traduccionales (Kim *et al.*, 2019), así como la detección de sitios blanco de silenciamiento de genes por sRNA o miRNA (Hellens *et al.*, 2005; Cazonelli *et al.*, 2006; Birch *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014). Estos trabajos y los resultados

presentados en este proyecto, demuestran que F-Luc es un reportero muy prometedor para el estudio de la expresión dinámica a nivel post-transcripcional y, por lo tanto, las líneas transgénicas generadas con este reportero permitirán el análisis dinámico de la regulación post-transcripcional de cada una de las enzimas de la vía MEP.

Una vez que se generen todas las líneas homocigotas de cada construcción, se podrá analizar la respuesta tanto espacial como temporal de cada una de las enzimas de la vía MEP ante condiciones apropiadas de crecimiento y condiciones de estrés. De esta manera se obtendrá un nuevo panorama de la participación específica de cada enzima ante diferentes condiciones con posibilidad de detectar nuevas enzimas limitantes o esenciales. Una vez que se haya estudiado los patrones de expresión de las enzimas, las líneas podrán ser mutagenizadas para encontrar mutantes que alteren el patrón normal de luciferasa y así detectar proteínas que participen en la regulación de la vía. Asimismo, las líneas pueden contribuir a determinar las condiciones en las que se induce mayor síntesis de IPP y DMAPP para la síntesis de isoprenoides de interés biotecnológico.

9) Conclusiones

- Se logró aislar las regiones regulatorias de todos los genes de la vía MEP.
- Se generaron las construcciones traduccionales fusionadas al reportero luciferasa.
- Se generaron líneas transgénicas con las construcciones de DXS, DXR y HDR y se corroboró su expresión mediante la cuantificación de actividad luciferasa.
- Se mostró que la actividad de luciferasa in vivo refleja los niveles de acumulación espacial y temporal de las proteínas correspondientes.
- En conjunto se logró generar una serie de plantas transgénicas que pueden ser empleadas como herramientas para el estudio dinámico de la regulación post-transcripcional de la vía MEP.

10)Referencias

- Audesirk, T., Audesirk, G. & Byers, B.E. (2017). *Biología. La vida en la Tierra con Fisiología*, 10a edición (Trad. V, Campos). México: Pearson Education
- Barnerjee, A., & Sharkey, T. D. (2014). Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation. *Natural product reports*, 31(8), 1043-1055.
- Belin, B. J., Busset, N., Giraud, E., Molinaro, A., Silipo, A., & Newman, D. K. (2018). Hopanoid lipids: from membranes to plant–bacteria interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 304.
- Birch, R. G., Shen, B., Sawyer, B. J., Huttner, E., Tucker, W. Q., & Betzner, A. S. (2010). Evaluation and application of a luciferase fusion system for rapid in vivo analysis of RNAi targets and constructs in plants. *Plant biotechnology journal*, 8(4), 465-475.
- Blanco, A. & Blanco G. (2017). Chapter 13: Metabolism. En *Medical Biochemistry*. USA: Academic Press
- 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.
- Boulin, T., Etchberger, J. F., & Hobert, O. (2006). Reporter gene fusions. In *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology [Internet]*. WormBook. (Boulin *et al.*, 2006)
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Budziszewski, G. J., Lewis, S. P., Glover, L. W., Reineke, J., Jones, G., Ziemnik, L. S., ... & Levin, J. Z. (2001). Arabidopsis genes essential for seedling viability: isolation of insertional mutants and molecular cloning. *Genetics*, 159(4), 1765-1778.
- 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.
- Carretero-Paulet, L., Cairo, 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), 683-695.
- Cazzonelli, C. I., & Velten, J. (2006). An in vivo, luciferase-based, Agrobacterium-infiltration assay system: implications for post-transcriptional gene silencing. *Planta*, 224(3), 582-597.
- Chappell, J. (1995). Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annual review of plant biology*, 46(1), 521-547.

- Chen, H., Zou, Y., Shang, Y., Lin, H., Wang, Y., Cai, R., ... & Zhou, J. M. (2008). Firefly luciferase complementation imaging assay for protein-protein interactions in plants. *Plant physiology*, 146(2), 368-376.
- 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 (HY 5)/phytochrome-interacting factors (PIF s) transcription factors modulating key limiting steps. *The Plant Journal*, 96(4), 828-841.
- Chinnusamy V, Stevenson B, Lee BH, Zhu JK (2002) Screening for gene regulation mutants by bioluminescence imaging. *Science Signaling STKE* 2002, PL10
- Christmann A, Hoffmann T, Teplova I, Grill E, Muller A (2005) Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed Arabidopsis. *Plant Physiology* 137, 209-219
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The plant journal*, 16(6), 735-743.
- 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.
- De Luna-Valdez, L., Chenge-Espinosa, M., Hernández-Muñoz, A., Cordoba, E., López-Leal, G., Castillo-Ramírez, S., & León, P. (2021). Reassessing the evolution of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase family suggests a possible novel function for the DXS class 3 proteins. *Plant Science*, 110960.
- De Ruijter, N. C. A., Verhees, J., Van Leeuwen, W., & Van Der Krol, A. R. (2003). Evaluation and comparison of the GUS, LUC and GFP reporter system for gene expression studies in plants. *Plant Biology*, 5(2), 103-115. <https://doi.org/10.1055/s-2003-40722>
- Esposito, D., Garvey, L. A., & Chakiath, C. S. (2009). Gateway cloning for protein expression. In *High Throughput Protein Expression and Purification* (pp. 31-54). Humana Press. DOI: 10.1007/978-1-59745-196-3_3
- Estévez, J. M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., & León, P. (2001). 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *The Journal of biological chemistry*, 276(25), 22901–22909.
- Estévez, J. M., Cantero, A., Romero, C., Kawaide, H., Jiménez, L. F., Kuzuyama, T., ... & León, 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), 95-104.
- 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. *The Plant Cell*, 20(5), 1303-1315.

- Fu, Y., & Xiao, W. (2006). Study of transcriptional regulation using a reporter gene assay. In *Yeast Protocol* (pp. 257-264). *Humana Press*, Totowa, NJ.
- Gallie, D. R. (1993). Posttranscriptional regulation of gene expression in plants. *Annual review of plant biology*, 44(1), 77-105.
- Gehl, C., Kaufholdt, D., Hamisch, D., Bikker, R., Kudla, J., Mendel, R. R., & Hänsch, R. (2011). Quantitative analysis of dynamic protein-protein interactions in planta by a floated-leaf luciferase complementation imaging (FLuCI) assay using binary Gateway vectors. *The Plant Journal*, 67(3), 542-553.
- Gelvin, S. B. (2003). Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(1), 16-37.
- Guevara-García, A., San Román, C., Arroyo, A., Cortés, M. E., de la Luz Gutiérrez-Nava, M., & León, P. (2005). Characterization of the Arabidopsis clb6 mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *The Plant Cell*, 17(2), 628-643.
- Gutiérrez-Nava, M., 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.
- Gong, Y. F., Liao, Z. H., Guo, B. H., Sun, X. F., & Tang, K. X. (2006). Molecular cloning and expression profile analysis of Ginkgo biloba DXS gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Planta medica*, 72(04), 329-335.
- Hall, A., & Brown, P. (2007). Monitoring circadian rhythms in Arabidopsis thaliana using luciferase reporter genes. In *Circadian rhythms* (pp. 143-152). Humana Press.
- Hasunuma, T., Takeno, S., Hayashi, S., Sendai, M., Bamba, T., Yoshimura, S., ... & Miyake, C. (2008). Overexpression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase gene in chloroplast contributes to increment of isoprenoid production. *Journal of bioscience and bioengineering*, 105(5), 518-526. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(40), 10034-10039.
- Hellens, R. P., Allan, A. C., Friel, E. N., Bolitho, K., Grafton, K., Templeton, M. D., ... & Laing, W. A. (2005). Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant methods*, 1(1), 1-14.
- 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?. *Progress in lipid research*, 51(2), 95-148.
- Hemmerlin, A., Hoeffler, J. F., Meyer, O., Tritsch, D., Kagan, I. A., Grosdemange-Billiard, C., ... & Bach, T. J. (2003). Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 26666-26676.

- Hernández-Arranz, S., Rosa, R. L., Moreno, R., Sevilla, E., Yuste, L., & Rojo, F. (2014). Protocols on regulation of gene expression. In *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*(pp. 29-50). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Herrera-Estrella, L., León, P., Olsson, O., & Teeri, H. T. (1994). Reporter genes for plants. In *Plant Molecular Biology Manual*(pp. 139-170). Springer, Dordrecht.
- 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.
- Hsieh MH, Goodman HM. 2005. The *Arabidopsis* *ispH* homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant Physiology* *138*, 641–653.
- Karp, G. (2011). *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos*, 6ta edición (Trad. M.Araiza). México: McGrawHill. (Obra original publicada en 2010)
- Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert opinion on drug discovery*, *2*(4), 571-589.
- Kim, Y. J., & Somers, D. E. (2019). Luciferase-based screen for post-translational control factors in the regulation of the pseudo-response regulator PRR7. *Frontiers in plant science*, *10*, 667.
- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A & Palladin, M.A. (2013) *Conceptos de genética*, 10a edición (Trad. S.L. Vuelapluma). Madrid, España: Pearson Education. (Obra original publicada en 2012)
- Kwon, M., Kwon, E. J., & Ro, D. K. (2016). cis-Prenyltransferase and polymer analysis from a natural rubber perspective. In *Methods in enzymology* (Vol. 576, pp. 121-145). Academic Press.
- 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*, *97*(24), 13172-13177.
- Li, J. F., Bush, J., Xiong, Y., Li, L., & McCormack, M. (2011). Large-scale protein-protein interaction analysis in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts by split firefly luciferase complementation. *PLoS one*, *6*(11), e27364.
- Liu, Q., Wang, F., & Axtell, M. J. (2014). Analysis of complementarity requirements for plant microRNA targeting using a *Nicotiana benthamiana* quantitative transient assay. *The Plant Cell*, *26*(2), 741-753.
- 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. *The Plant Journal*, *22*(6), 503-513.
- ZLuehrsen, K. R., & Walbot, V. (1993). Firefly luciferase as a reporter for plant gene expression studies. *Promega notes*, *44*, 24-29.
- Mandel, M. A., Feldmann, K. A., Herrera-Estrella, L., Rocha-Sosa, M., & León, P. (1996). *CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *The Plant*

- Journal*, 9(5), 649-658. Metallo, C. M., & Vander Heiden, M. G. (2013). Understanding metabolic regulation and its influence on cell physiology. *Molecular cell*, 49(3), 388-398.
- Mannerlöf, M., & Tenning, P. (1997). Variability of gene expression in transgenic tobacco. *Euphytica*, 98(1), 133-139.
 - Mahmoud, S. S., & Croteau, R. B. (2001). Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8915-8920.
 - Mayrhofer, S., Teuber, M., Zimmer, I., Louis, S., Fischbach, R. J., & Schnitzler, J. P. (2005). Diurnal and seasonal variation of isoprene biosynthesis-related genes in grey poplar leaves. *Plant Physiology*, 139(1), 474-484.
 - McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins (Basel)*. 2011;3(7):802-814. doi:10.3390/toxins3070802
 - Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., & Koornneef, M. (1998). Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389), 662-682.
 - Meyerowitz, E. M. (2001). Prehistory and history of Arabidopsis research. *Plant physiology*, 125(1), 15-19.
 - Millar, A. J., Short, S. R., Chua, N. H., & Kay, S. A. (1992a). A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *The Plant Cell*, 4(9), 1075-1087.
 - Meyerowitz, E. M. (2001). Prehistory and history of Arabidopsis research. *Plant physiology*, 125(1), 15-19.
 - Morris, W. L., Ducreux, L. J., Hedden, P., Millam, S., & Taylor, M. A. (2006). Overexpression of a bacterial 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene in potato tubers perturbs the isoprenoid metabolic network: implications for the control of the tuber life cycle. *Journal of Experimental Botany*, 57(12), 3007-3018.
 - Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, 8(19), 4321-4326.
 - Nagata, N., Suzuki, M., Yoshida, S., & Muranaka, T. (2002). Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in Arabidopsis lacking the non-mevalonate pathway. *Planta*, 216(2), 345-350.
 - Nelson, D. & Cox, M.M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry* (5th edition). New York, USA: W.H. Freeman and company.
 - Oudin, A., Mahroug, S., Courdavault, V., Hervouet, N., Zelwer, C., Rodríguez-Concepción, M., ... & Burlat, V. (2007). Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus*. *Plant molecular biology*, 65(1-2), 13-30.
 - Peach, C., & Velten, J. (1991). Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant molecular biology*, 17(1), 49-60.

- Phillips, M. A., Walter, M. H., Ralph, S. G., Dabrowska, P., Luck, K., Urós, E. M., ... & 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.
- Piel, J., Donath, J., Bandemer, K., & Boland, W. (1998). Mevalonate-independent biosynthesis of terpenoid volatiles in plants: induced and constitutive emission of volatiles. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(18), 2478-2481.
- Piña-Garza, E & Martínez-Montes, F. (2018). Capítulo 17: Introducción al metabolismo. En Martínez-Montes F., Pardo-Vázquez JP. & Riveros-Rosas, H. (eds.), *Bioquímica de Laguna y Piña* (8va edición). México: Editorial El Manual Moderno & UNAM.
- Pulido, P., Perello, C., & Rodríguez-Concepcion, M. (2012). New insights into plant isoprenoid metabolism. *Molecular plant*, 5(5), 964-967.
- Reece-Hoyes JS, Walhout AJM. Gateway Recombinational Cloning. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(1):pdb.top094912. Published 2018 Jan 2.
- Rodríguez-Concepción, M. (2006). Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochemistry Reviews*, 5(1), 1-15.
- Rodríguez-Concepción, M. (2014). Plant isoprenoids: a general overview. In *Plant Isoprenoids* (pp. 1-5). Humana Press, New York, NY.
- Rodríguez-Concepción, M., & Boronat, A. (2015). Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 17-22.
- Rohmer M. (1998). Isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent route, a novel target for antibacterial drugs?. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques*, 50, 135–154.
- Rohmer, M. (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural product reports*, 16(5), 565-574
- Rychlik, W. J. S. W., Spencer, W. J., & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic acids research*, 18(21), 6409-6412.
- Saiki, R. K. (1989). The design and optimization of the PCR. In *PCR technology* (pp. 7-16). Palgrave Macmillan, London.
- Sauret-Güeto, S., Botella-Pavía, P., Flores-Pérez, Ú., Martínez-García, J. F., San Román, C., León, P., & Rodríguez-Concepción, M. (2006). Plastid cues posttranscriptionally regulate the accumulation of key enzymes of the methylerythritol phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141(1), 75-84
- Sivasubramanian, R., Mukhi, N., Kaur, J. (2015). *Arabidopsis thaliana: A Model for Plant Research*. In: Bahadur, B., Venkat Rajam, M., Sahijram, L., Krishnamurthy, K. (eds) *Plant Biology and Biotechnology*. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_1
- Sprenger, G. A., Schörken, U., Wiegert, T., Grolle, S., De Graaf, A. A., Taylor, S. V., ... & Sahn, 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*, 94(24), 12857-12862.
- Stenesh, J. (1998). *Biochemistry*. USA: Springer.
 - Van Leeuwen, W., Hagendoorn, M. J., Ruttink, T., Van Poecke, R., Van Der Plas, L. H., & 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.
 - Veau, B., Courtois, M., Oudin, A., Chénieux, J. C., Rideau, M., & Clastre, M. (2000). Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1517(1), 159-163.
 - Velten, J., Pogson, B., & Cazzonelli, C. I. (2008). Luciferase as a reporter of gene activity in plants. *Transgenic Plant J*, 2, 1-13.
 - Voet, D., Voet, J. & Pratt, A.W. (2016). *Fundamentos de bioquímica: La vida a nivel molecular* (Ubaldo Patrone, Silvia Castelo, Andréa Méndez y Emilia Mas trads.) (4ta edición). México: Editorial Médica Panamericana. (Obra original publicada en 2013)
 - Vranová, E., Coman, D., & Gruissem, W. (2012). Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Molecular plant*, 5(2), 318-333.
 - Vranová, E., Coman, D., & Gruissem, W. (2013). Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annual review of plant biology*, 64, 665-700.
 - 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. *The Plant Journal*, 21(6), 571-578.
 - Walter, M. H., Hans, J., & Strack, D. (2002). Two distantly related genes encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *The Plant Journal*, 31(3), 243-254.
 - Welsh, D. K., Imaizumi, T., & Kay, S. A. (2005). Real-time reporting of circadian-regulated gene expression by luciferase imaging in plants and mammalian cells. In *Methods in enzymology* (Vol. 393, pp. 269-288). Academic Press.
 - Wright, L. P., Rohwer, J. M., Ghirardo, A., Hammerbacher, A., Ortiz-Alcaide, M., Raguschke, B., ... & Phillips, M. A. (2014). Deoxyxylulose 5-phosphate synthase controls flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 165(4), 1488-1504.
 - Wu, D. Y., UGOZZOLI, L., PAL, B. K., Qian, J. I. N., & WALLACE, R. B. (1991). The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and cell biology*, 10(3), 233-238.
 - Zhao, L., Chang, W. C., Xiao, Y., Liu, H. W., & Liu, P. (2013). Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Annual review of biochemistry*, 82, 497.
 - Ziemienowicz, A. (2001). Plant selectable markers and reporter genes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 23(3), 363-374.

11)Créditos

- Las visualizaciones de las secuencias génicas, los mapas de genes y mapas de plásmidos se realizaron con el software de SnapGene Viewer 5.2.4.
- La creación de algunas imágenes y ediciones se realizaron con el software PaintX
- Las verificaciones de *primers* se realizaron con el software AmplifX

12)Anexos

Tabla A.1. Nombres y genes de las enzimas de la vía MEP

Enzima (nombre en inglés)	Gen	Gene ID
1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	<i>DXR</i>	At5g62790
2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase	<i>MCT</i>	At2g02500
4-(Cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase	<i>CMK</i>	At2g26930
2-C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	<i>MDS</i>	At1g63970
4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase	<i>HDS</i>	At5g60600
4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	<i>HDR</i>	At4g34350

Tabla A.2. Nombres de las enzimas de la vía MVA

Enzima (nombre en inglés)	Acrónimo
AcAc-CoA thiolase	AACT
HMG-CoA synthase	HMGS
HMG-CoA reductase	HMGR
MK, mevalonate kinase	MK

Phosphomevalonate kinase	PMK
Diphospho-mevalonate decarboxylase	PPMD

Tabla A.3. Datos de *primers* empleados para la amplificación de los genes de la vía MEP.

Gene	Nombre	Secuencia	Longitud (nt)	Tamaño de Amplificación (pb)
<i>DXR</i>	DXR FwdGWprom	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGG AAT TGG AGA GAT GGC TAC ACC	54	4274
	DXR revGWprot	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TGC ATG AAC TGG CCT AGC ACC A	52	
<i>MCT</i>	MCT FwdGW	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGA AAG CCG TAA CCA TAA ACA TGT GAC C	58	3143
	pMCTrvB2	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TGA GTC CTC GCT CAA GAT TCT C	52	
<i>CMK</i>	pCMKfwB1	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CCC TTC TAG TCC TTT TCT TCT GTG CC	57	4524
	CMK RevGW	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTG GAA ATC CAT GCG AGA TTC GG	53	
<i>MDS</i>	MDS FdGW	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGG CGA TTG AAT GGA GAC AAT GCG	54	1702
	MDS RvGW	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TTT CTT CAT GAG GAG AAT AAC AGT GTG AGC	60	
<i>HDS</i>	HDS FdGW	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGC TCC ATT TGG AAA TTA AAC TTT G	55	4604
	HDS RvGW	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT CTC ATC AGC CAC GGG CGG GT	50	

<i>HDR</i>	HDR FwdGWprom	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CTT GGT AAC AGT TGA CTT GAT CTT GG	56	3233
	HDR RevGWprot	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC AGC CAG CTG CAA TAA CTC TTC AC	53	

Tabla A.4. Parámetros de amplificación de los genes de la vía MEP

	Desnaturalización global		Desnaturalización		Alineamiento		Extensión		Extensión final	
	Temp (°C)	Tiempo (min)	Temp (°C)	Tiempo (min)	Temp (°C)	Tiempo (min)	Temp (°C)	Tiempo (min)	Temp (°C)	Tiempo (min)
<i>DXR</i>	95	03:00	95	00:30	55 a 63	00:30	72	02:20	12	∞
<i>MCT</i>	95	03:00	98	00:20	60/65	00:15	72	01:40	18	∞
<i>CMK</i>	95	03:00	98	00:20	60	00:15	72	02:45	18	∞
<i>MDS</i>	95	03:00	95	00:30	60	0:30	72	01:00	12	∞
<i>HDS</i>	95	03:00	98	00:20	60	00:15	72	02:45	10	∞
<i>HDR</i>	95	03:00	95	00:30	60.2/63.8	00:30	72	01:50	12	∞

Tabla A.5. Datos de los *primers* empleados en este trabajo

Gen	Nombre	Secuencia	Longitud
Comunes	<i>M13fw</i>	GTAAAACGACGGCCAGT	17
	<i>M13rv</i>	GTCATAGCTGTTTCCTG	17

	<i>LucRev</i>	CCGTTTCGGTTGGCAGAAGCTATG	23
DXR	<i>DXR 521 qPCR-R</i>	cagTTCAGTGGTAGTATCATAAGCA	24
	<i>5'dxr</i>	GGATCTACTGGTTCTATTGGC	21
	<i>DXRprof,</i>	GAATTGGAGAGATGGCTACACC	22
	<i>DXRfw2758</i>	CTTCCGCTTGCCAACAAAC	19
MCT	<i>espárrago</i>	CTTTTAGCTGGAGGTCAAGGC	21
	<i>MCTRv exon7</i>	TCTGCCCCGACCATTGGTGAATAC	23
CMK	<i>mango</i>	ATGGCAACGGCTTCTCCTCCATT	24
	<i>CMKexon8</i>	CAGCAATGGTGTGTCTCAAAGC	22
	<i>CMKfw5</i>	CCCGAGAAGCATGTTCCACTGC	22
MDS	<i>5'ispF</i>	cggcaATGGCTACTTCTTCTAC	22
HDS	<i>Exon3Rv</i>	AACTGTTCAAGGGAAGAAAGAGGC	24
	<i>Exon6fw</i>	GCGTATTGGGACAAATCATGGA	22
	<i>Exon14R</i>	GAGCCTTACGAGGAGCTTGA	19
	<i>ispG5'</i>	CCATGGTTCTTGTCAACCTC	20
HDR	<i>HDRpro-Fw</i>	TTGGTAACAGTTGACTTGATCTTGG	25
	<i>HDR650QPCR-F,</i>	AAGATGATGTGGTTATCCTTCTG	24
	<i>HDRrvExon1</i>	CATGAATCGAGAGTACACC	19
	<i>HDRrv2</i>	TGAAGAGACGATTGCAACTGC	21

Tabla A.6. Registro y seguimiento de sublíneas independientes de *DXS*.

⊖=Datos perdidos por muerte de la línea, **P**= datos pendientes, ✓= afirmación,
X=negación

DXS			
Línea	Sublíneas	Seleccionadas	Homocigotas
L1	L1.1	✓	×
	L1.2	✓	×
	L1.4	✓	×
	L1.5	✓	×
	L1.7	✓	×
	L1.8	✓	×
	L1.9	✓	✓
	L1.10	✓	×
L3	L3.1	P	P
	L3.2	⊖	⊖
	L3.3	⊖	⊖
	L3.4	⊖	⊖
	L3.5	P	P
	L3.6	⊖	⊖
	L3.7	⊖	⊖
L5	L5.1	P	P
	L5.2	⊖	⊖
	L5.3	⊖	⊖

	L5.4	⊘	⊘
	L5.5	⊘	⊘
	L5.6	⊘	⊘
	L5.7	⊘	⊘
L6	L6.1	⊘	⊘
	L6.2	Ⓜ	Ⓜ
	L6.3	⊘	⊘
	L6.4	⊘	⊘
	L6.5	Ⓜ	Ⓜ
	L6.6	Ⓜ	Ⓜ
L7	L7.1	⊘	⊘
	L7.2	⊘	⊘
	L7.3	Ⓜ	Ⓜ
	L7.4	⊘	⊘
	L7.5	⊘	⊘
	L7.6	Ⓜ	Ⓜ
L8	L8.1	Ⓜ	Ⓜ
	L8.2	Ⓜ	Ⓜ
	L8.3	Ⓜ	Ⓜ
	L8.4	✓	✓
	L8.5	✓	×

	L8.6	✓	×
	L8.7	✓	×
	L8.8	✓	×
L9	L9.1	✓	×
	L9.2	Ⓟ	Ⓟ
	L9.3	✓	×
	L9.4	✓	×
	L9.5	✓	×
	L9.6	Ⓟ	Ⓟ
	L9.7	✓	×
	L9.8	⊖	⊖

Tabla A.7. Registro y seguimiento de sublíneas independientes de *DXR*.

⊖=Datos perdidos por muerte de la línea, Ⓟ= datos pendientes, ✓= afirmación, ×=negación

DXR			
Línea	Sublíneas	Seleccionadas	Homocigotas
L2	L2.1	✓	✓
	L2.2	✓	✓
	L2.3	✓	×
	L2.4	✓	×
	L2.5	Ⓟ	Ⓟ

	L2.6	P	P
	L2.7	P	P
L3	L3.1	P	P
	L3.2	✓	×
	L3.3	✓	×
	L3.4	✓	×
	L3.5	✓	×
	L3.6	P	P
	L3.7	P	P
L4	L4.1	✓	×
	L4.2	✓	✓
	L4.3	✓	✓
	L4.4	✓	✓
	L4.5	P	P
	L4.6	P	P
	L4.7	P	P
L6	L6.1	✓	×
	L6.2	✓	×
	L6.3	✓	×
	L6.4	✓	×
	L6.5	P	P
	L6.6	P	P

	L6.7	P	P
	L6.8	P	P
L8	L8.1	✓	×
	L8.2	✓	×
	L8.3	✓	×
	L8.4	✓	✓
	L8.5	P	P
	L8.6	P	P
	L8.7	P	P
L9	L9.1	✓	✓
	L9.2	P	P
	L9.3	✓	✓
	L9.4	✓	×
	L9.5	P	P
	L9.6	⊙	⊙
	L9.7	✓	×
L10	L10.1	✓	×
	L10.2	✓	×
	L10.3	✓	×
	L10.4	✓	×
	L10.5	P	P
	L10.6	P	P

Tabla A.8. Registro y seguimiento de sublíneas independientes de HDR.

⊙=Datos perdidos por muerte de la línea, **P**= datos pendientes, ✓= afirmación, **X**=negación

HDR			
Línea	Sublíneas	Seleccionadas	Homocigotas
L1	L1.1	✓	✓
	L1.2	✓	×
	L1.3	✓	×
	L1.4	✓	×
	L1.5	✓	✓
	L1.6	✓	✓
	L1.7	⊙	⊙
L2	L2.1	✓	×
	L2.2	✓	×
	L2.3	✓	×
	L2.4	✓	×
	L2.5	✓	×
	L2.6	✓	×
	L2.7	⊙	⊙

Tabla A.9. Datos de cuantificación de proteínas totales de extractos proteicos de plantas transgénicas expresoras de fusiones traduccionales de DXS, DXR y HDR con luciferasa

Datos curva patrón		Muestras		
Concentración de BSA (ug/mL)	Abs (595 nm)	Nombre	Abs (595 nm)	Concentración de proteína (µg/mL)
0	0	Wt	0,295	5,2
1	0,076	DXS 3	0,401	7,5
2,5	0,169	DXS 7	0,391	7,3
5	0,336	DXS 9	0,443	8,4
10	0,604	DXS L1.9	0,441	8,4
15	0,787	DXR 2	0,355	6,5
20	0,882	DXR 4	0,327	5,9
		DXR 8	0,458	8,7
		HDR 1	0,3	5,3
		HDR 2	0,295	5,2

Tabla A.10. Datos de ensayo de luciferasa y actividades específicas calculadas para líneas transgénicas de *DXS*

Muestra	Abs	Concentración de proteína(ug/mL)	uL de muestra	URL [†]	URL/uL	URL/ug	Actividad específica (URL/ug/seg)
Wt	0,295	5,2	5	156	31.2	6.05	30
DXS L3	0,401	7,5	2.5	2,085,406	417081.2	55685.07	278,845
DXS L7	0,391	7,3	2.5	1,903,148	380629.6	52356.20	261,781
DXS L9	0,443	8,4	2.5	948842	189768.4	22537.81	112,789
DXS L1.9	0,441	8,4	2.5	4,595,806	919161.2	109816.15	1,098,162

Tabla A.11. Datos de ensayo de luciferasa y actividades específicas calculadas para líneas transgénicas de *DXR*

Muestra	Abs	Concentración (ug/mL)	uL de muestra	URL	URL/uL	URL/ug	Actividad específica (URL/ug/seg)
DXR 2	0,355	6,5	5	3,978,357	122,788.80	12,278.88	613,944
DXR 4	0,327	5,9	5	2,611,037	88,962.08	8,896.21	444,810
DXR 8	0,458	8,7	5	3,663,798	83,743.95	83,743.40	418,720

Tabla A.12. Datos de ensayo de luciferasa y actividades específicas calculadas para líneas transgénicas de *HDR*

Muestra	Abs	Concentración (ug/mL)	uL de muestra	URL	URL/uL	URL/ug	Actividad específica (URL/ug/seg)
HDR 1	0,3	5,3	5	1,224,557	244,911.4	46,472.75	232,364
HDR 2	0,295	5,2	5	688,971	137,794.2	26,704.30	133,522

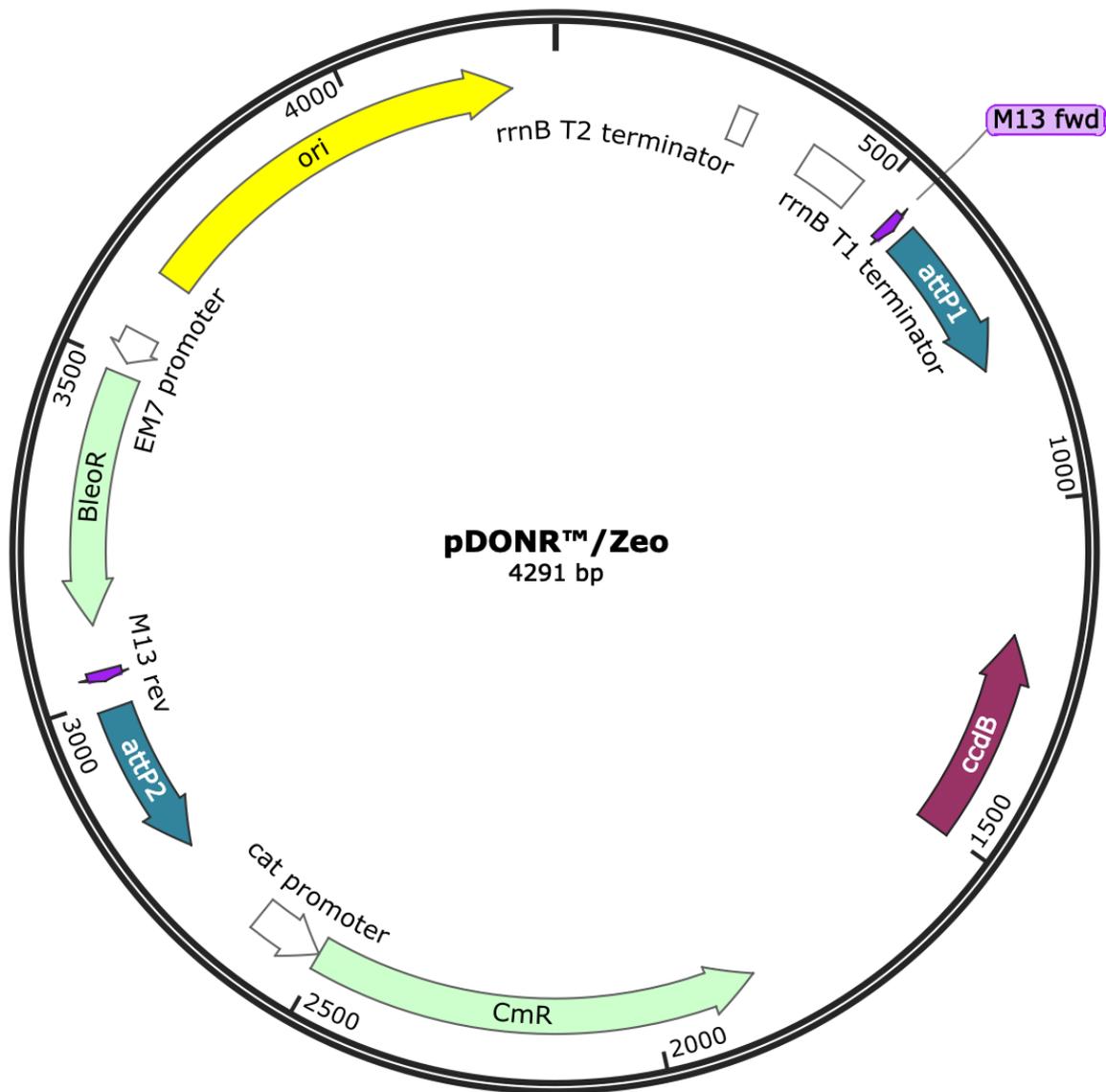


Figura A. 1. Vector donador pDONR/Zeo

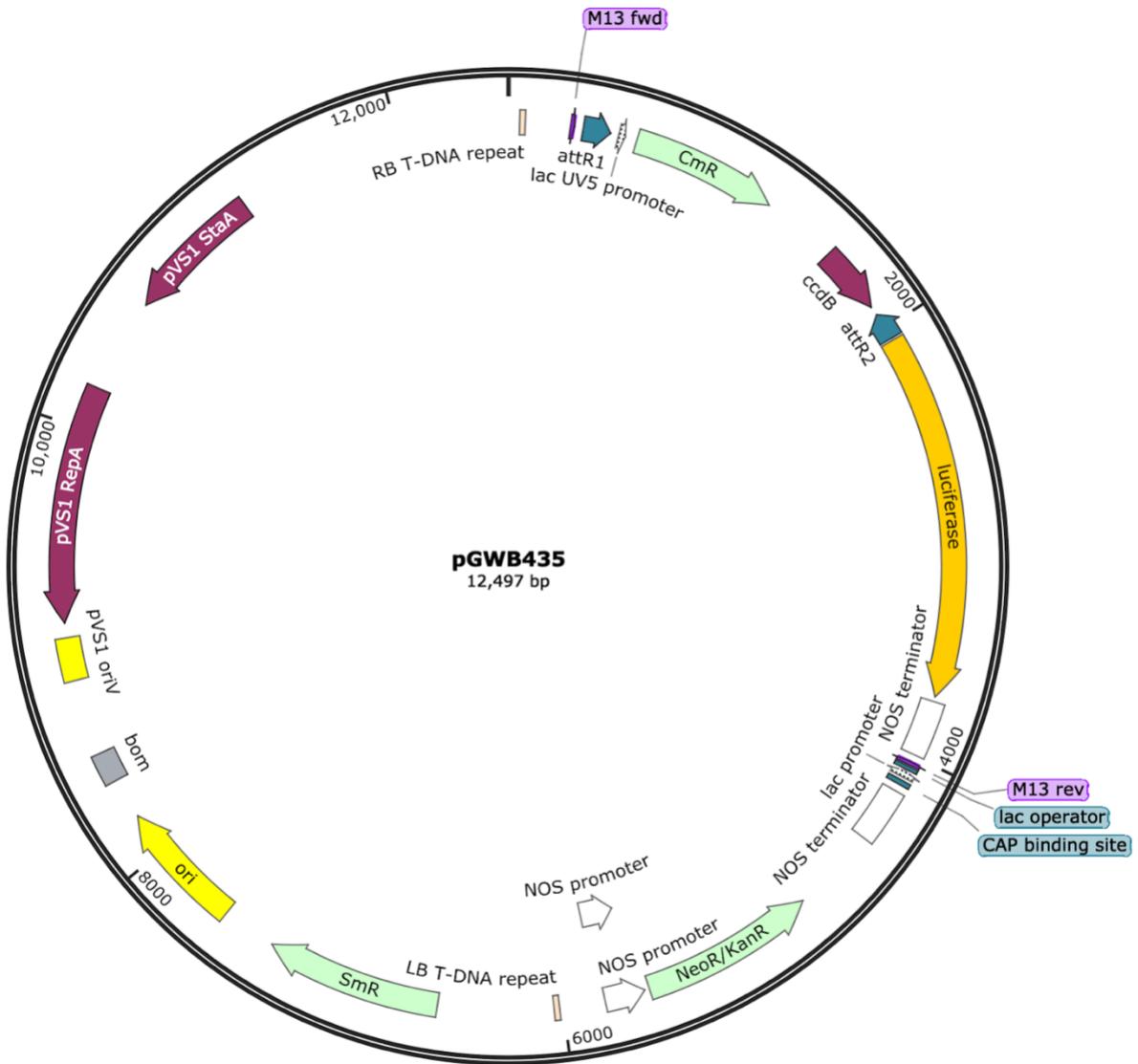
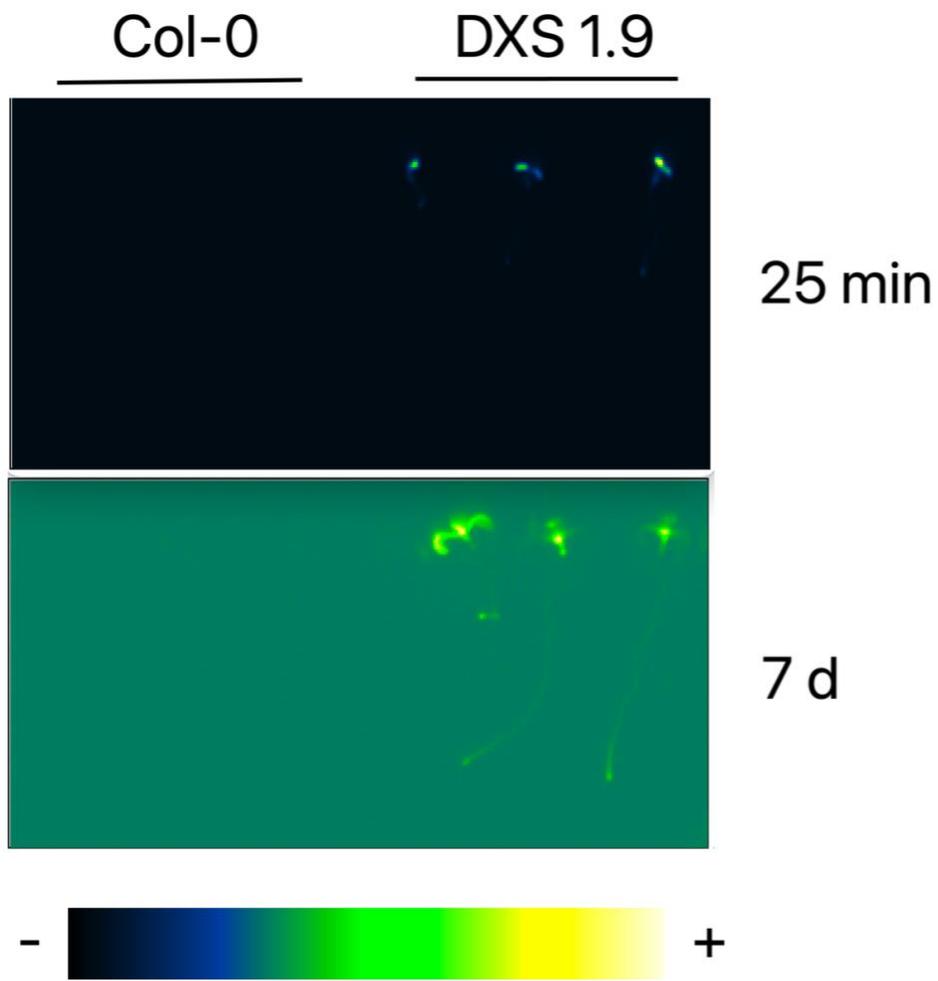


Figura A. 2. Vector donador pGWB435



A.3. Visualización in vivo de la actividad de luciferasa Col-0 vs DXS 1.9