

UCH-FC
Biotecnología
D 542
C.1



Escuela de Pregrado
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

“Identificación de genes que codifican para la enzima licopeno β -ciclase en *Malus domestica* y su evaluación por expresión heteróloga en *Escherichia coli*.”

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

Gonzalo Esteban Díaz Fuenzalida

Mayo, 2013

Santiago de Chile

Director de Seminario de Título: Dra. Claudia Stange



INFORME DE APROBACION SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **SR. GONZALO ESTEBAN DIAZ FUENZALIDA**

“Identificación de genes que codifican para la enzima licopeno β -ciclase en *Malus domestica* y su evaluación por expresión heteróloga en *Escherichia coli*”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Claudia Stange Klein
Director Seminario de Título

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

Comisión Evaluadora

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Presidente Comisión



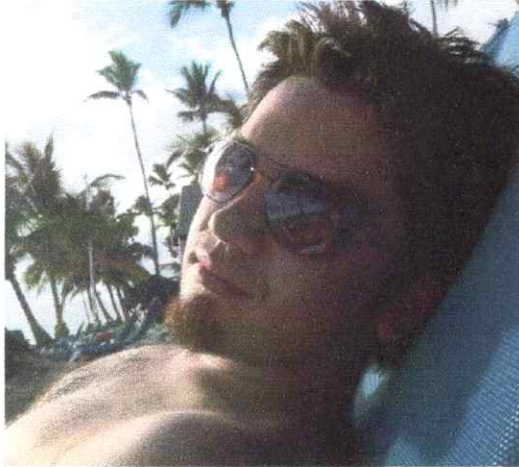
Dra. Jennifer Alcaíno Gorman
Evaluador

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Mayo de 2013



A mis admiradores



Soy Gonzalo Esteban Díaz Fuenzalida. Nací un día lunes 29 de Mayo de 1989 en la ciudad de Rancagua y soy el menor de una familia de tres hermanos.

Durante toda mi etapa escolar viví en la ciudad de Machalí y estudié desde prekinder hasta 4° medio en el Colegio Coya.

Desde pequeño me gustó el hecho de saber cómo funcionan las cosas, desde algo tan simple como desarmar un juguete. Por lo tanto, el campo de las ciencias siempre me produjo curiosidad, inclusive desde los primeros años de mi vida escolar.

Siempre me sentí apoyado por mis padres respecto a mi futuro laboral y, teniendo uno de mis hermanos estudiaba Biotecnología, me fue fácil optar por esta carrera, ya que me llamó la atención mucho antes de ingresar.

Tuve la suerte de venir a vivir a la ciudad de Santiago a la casa de mis abuelos, que me recibieron con los brazos abiertos, a pesar de haber recibido a mis dos hermanos previamente. Es por esto que nunca deje de sentirme rodeado de una familia amorosa.

En este momento soy alumno licenciado de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile y me encuentro pronto a finalizar mi carrera mediante este seminario de título.





AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia por estar siempre conmigo, sólo quiero decir que sin todos ustedes siempre a mi lado esta tesis se hubiese escrito en mucho menos tiempo.

A mis padres, a quienes quiero mucho, recuérdelo cuando estén viejos y arrugados viviendo en un asilo. Gracias por haber tomado la buena decisión de tenerme, comprobando que la tercera es la vencida.

A mis madres substitutas, porque vivir con ustedes tiene las libertades de vivir solo con las comodidades de vivir con mis padres. Gracias por preocuparse de que nunca pasara hambre, pero se les anduvo pasando un poco la mano.

A mis hermanos grandes y mis "hermanitos." Los quiero mucho, y si alguna vez los he ofendido de alguna manera, desde el fondo de mi corazón quiero decirles... HA HA.

A mi polola, gracias por acompañarme en esta última etapa, siempre preocupada de que trabajara, de que escribiera, de que no me distrajera. Por todo ese apoyo incondicional puedo decir que cada día te quise un poco menos.

A mis amigos, porque para tener conversaciones inteligentes existen los monólogos. Gracias por nada. A mis enemigos... púdranse.

A mis compañeros de trabajo, todos y cada uno de ustedes es una razón para quedarme acostado en las mañanas.

Finalmente, a la persona que haya inventado Wikipedia... muchas gracias.

RESUMEN

Los carotenoides son pigmentos presentes en cloroplastos y cromoplastos en plantas. Al acumularse entregan coloración a flores, frutos y raíces modificadas. En órganos fotosintéticos, cumplen un rol en la fotosíntesis y fotoprotección. El β -caroteno, en particular, actúa como antioxidante y precursor de la vitamina A al ser ingerido por mamíferos, siendo esencial para la dieta humana. Una de las enzimas más estudiadas en la ruta carotenogénica es la licopeno β -ciclase (LCYB), que cataliza la formación de β -caroteno a partir de licopeno. Por otro lado, *Malus domestica* (manzana) es una buena fuente de fibra y vitaminas, sin embargo, se ha reportado la presencia únicamente de trazas de β -caroteno en la pulpa. Para determinar la razón de esta baja acumulación de β -caroteno, realizamos una búsqueda genómica para identificar homólogos para enzimas LCYB. Usando la base de datos GDR, dos genes candidatos fueron encontrados, MdLCYB1 y MdLCYB2, que se expresan tanto en frutos como en hojas de manzana. MdLCYB1 exhibe una mayor identidad aminoacídica que MdLCYB2 con enzimas LCYB descritas previamente y estarían vinculadas a cloroplasto y cromoplasto, respectivamente. Para determinar su funcionalidad *in vivo*, en este Seminario de título, ambos genes fueron clonados en vectores de expresión pETBlue1 y se realizó complementación heteróloga en cepas de *E. coli* portadoras de la ruta carotenogénica de *E. uredoovora* mutada en el gen *crtY* (LCYB). La evaluación funcional fue realizada por HPLC para determinar la cantidad y composición de carotenoides. La transformación con el gen MdLCYB1 permitió la acumulación de β -caroteno, indicando que codifica para una LCYB funcional. No se encontró β -caroteno al transformar con MdLCYB2, sugiriendo que no codifica para una LCYB funcional en bacterias. Estos resultados sugieren que la manzana posee la habilidad de sintetizar β -caroteno *in vivo*.

ABSTRACT

Carotenoids are pigments found in chloroplasts and chromoplasts in plants. When accumulated, they give coloration to flowers, fruits and modified roots. They play an accessory role in the photosynthesis in photosynthetic organs, and exert also a photoprotective role in plants. β -carotene, in particular, works as an antioxidant and precursor of vitamin A when ingested by mammals, being essential for the human diet. One of the most studied enzymes of the carotenogenic pathway is lycopene β -cyclase (LCYB), catalyzing the formation of β -carotene from lycopene. On the other hand, *Malus domestica* (apple) is a good source of fiber and vitamins, however, it has been reported the presence of traces of β -carotene in its flesh. To determine the reason for the low accumulation of β -carotene in apples, we made a genomic search to identify homologous to LCYB enzymes. Using the GDR database, two candidates were found, MdLCYB1 and MdLCYB2, expressing both in apple fruits and leaves. MdLCYB1 exhibits a higher amino acid identity than MdLCYB2 to previously described enzymes, and present chloroplast and chromoplast specificity, respectively. To determine *in vivo* functionality, in this work, both genes were cloned in pETBlue1 expression vectors and heterologous complementation was made in a strain of *E. coli* carrying the carotenogenic pathway from *E. uredoovora* mutated in the *crtY* gene (LCYB). The functional evaluation was performed by HPLC measurement to determine the amount and composition of carotenoids. Transformation with MdLCYB1 gene allowed the accumulation of β -carotene, indicating it encodes for a functional LCYB. There was no β -carotene when transformed with MdLCYB2, suggesting it does not encode for a functional LCYB in bacteria. These results suggest that apple has the ability to produce β -carotene *in vivo*.

INDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION	1
1.1. Estructura y función de carotenoides.	1
1.2. Biosíntesis de carotenoides en plantas.	3
1.3. LCYB en la síntesis de carotenoides.	5
1.4. Carotenoides en <i>Malus domestica</i> .	8
1.5. <i>Escherichia coli</i> como sistema de expresión heteróloga de enzimas carotenogénicas.	9
1.6. Hipótesis.	12
1.7. Objetivos.	12
1.7.1. Objetivo general.	12
1.7.2. Objetivos específicos.	12
2. MATERIALES Y METODOS	13
2.1. Reactivos.	13
2.2. Cepas, plásmidos y medios de cultivo.	13
2.3. Material vegetal.	15
2.4. Partidores.	16
2.5. Metodologías.	17
2.5.1. Análisis bioinformático.	17
2.5.1.1. Obtención y análisis de secuencias nucleotídicas de genes <i>LCYB</i> posibles en <i>M. domestica</i> .	17
2.5.1.2. Análisis de secuencia aminoacídica de <i>LCYB</i> posibles.	17
2.5.2. Extracción del ARN.	19
2.5.2.1. Extracción de ARN a partir de tejido de <i>M. domestica</i> .	19
2.5.2.2. Extracción de ARN a partir de bacterias.	20
2.5.3. Cuantificación de ácidos nucleicos.	20
2.5.4. Síntesis de ADNc de <i>M. domestica</i> .	20
2.5.4.1. Tratamiento del ARN con DNAsa I.	20
2.5.4.2. Transcripción reversa (RT-PCR).	21
2.5.5. Amplificación de ADN mediante PCR.	21
2.5.6. Extracción del ADN plasmidial.	23
2.5.7. Digestiones enzimáticas.	23
2.5.8. Electroforesis en geles de agarosa.	23

2.5.9.	Purificación del ADN desde geles o productos de PCR.	24
2.5.10.	Generación de construcciones pETBlue1-MdLCYB.	24
2.5.10.1.	Clonación de las secuencias codificantes de genes MdLCYB1 y MdLCYB2 en el vector de entrada pCR8.	24
2.5.10.2.	Clonación de los genes MdLCYB en el vector de expresión pETBlue1.	24
2.5.11.	Secuenciación.	25
2.5.12.	Transformación de células de <i>E. coli</i> .	25
2.5.12.1.	Preparación de células quimio-competentes.	25
2.5.12.2.	Transformación de células quimio-competentes.	26
2.5.13.	Extracción y cuantificación de carotenoides a partir de <i>E. coli</i> .	26
2.5.13.1.	Preparación del cultivo.	26
2.5.13.2.	Determinación de peso seco.	27
2.5.13.3.	Extracción de pigmentos carotenoides.	27
2.5.13.4.	Determinación de la composición de carotenoides mediante RP-HPLC.	27
2.5.14.	Análisis estadísticos.	28
3.	RESULTADOS	29
3.1.	Identificación <i>in silico</i> de genes LCYB posibles en <i>M. domestica</i> .	29
3.2.	Expresión de genes LCYB en tejidos de <i>M. domestica</i> .	34
3.3.	Clonación de genes LCYB en el vector de entrada pCR8.	35
3.4.	Clonación de genes LCYB en el vector de expresión pETBlue1.	38
3.5.	Complementación heteróloga con genes MdLCYB.	41
3.6.	Cuantificación de carotenoides a partir de cepas de <i>E. coli</i> acumuladoras de pigmentos.	44
4.	DISCUSION	49
4.1.	Selección y obtención de secuencias codificantes de genes MdLCYB mediante análisis <i>in silico</i> y RT-PCR.	49
4.2.	MdLCYB1 y MdLCYB2 en <i>M. domestica</i> .	51
4.3.	Complementación heteróloga y cuantificación de carotenoides.	54
5.	CONCLUSIONES	58
6.	PROYECCIONES	58
7.	REFERENCIAS	59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas.	4
Figura 2.	Reacciones de ciclación en la ruta carotenogénica.	6
Figura 3.	Alineamiento de secuencias aminoacídicas de enzimas codificadas por genes <i>LCYB</i> .	32
Figura 4.	Análisis filogenético de las enzimas <i>LCYB</i> posibles de <i>M. domestica</i> .	33
Figura 5.	Expresión de transcritos de los genes <i>LCYB</i> en hojas y frutos de <i>M. domestica</i> .	34
Figura 6.	Expresión relativa de genes <i>LCYB</i> en tejidos de <i>M. domestica</i> .	35
Figura 7.	PCR de colonias de <i>E. coli</i> transformadas con productos de ligación pCR8-Md <i>LCYB1</i> y pCR8-Md <i>LCYB2</i> .	36
Figura 8.	PCR a partir de clones positivos para ligación pCR8-Md <i>LCYB1</i> y pCR8-Md <i>LCYB2</i> .	36
Figura 9.	Digestión enzimática de las construcciones pCR8-Md <i>LCYB</i> .	37
Figura 10.	PCR de colonias de <i>E. coli</i> transformadas con productos de ligación pETBlue1-Md <i>LCYB1</i> y pETBlue1-Md <i>LCYB2</i> .	38
Figura 11.	PCR direccionado de las construcciones pETBlue1-Md <i>LCYB1</i> y pETBlue1-Md <i>LCYB2</i> .	39
Figura 12.	Digestión enzimática de las construcciones pETBlue1-Md <i>LCYB1</i> .	40
Figura 13.	Digestión enzimática de las construcciones pETBlue1-Md <i>LCYB2</i> .	41
Figura 14.	PCR de colonias de <i>E. coli</i> cepa BL21 pDS1B Δ <i>crtY</i> transformadas con construcciones pETBlue1-Md <i>LCYB1</i> y pETBlue1-Md <i>LCYB2</i> .	42
Figura 15.	Expresión de genes Md <i>LCYB1</i> y Md <i>LCYB2</i> en cultivos de <i>E. coli</i> BL21 pDS1B Δ <i>crtY</i> transformadas con las construcciones pETBlue1-Md <i>LCYB</i> .	43
Figura 16.	Fenotipo de cepas <i>E. coli</i> acumuladoras de pigmentos carotenoides.	44
Figura 17.	Cromatogramas de carotenoides en cepas <i>E. coli</i> acumuladoras de pigmentos.	46
Figura 18.	Niveles de carotenoides en cepas <i>E. coli</i> acumuladoras de pigmentos.	47

INDICE DE TABLAS

Tabla I.	Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este seminario.	13
Tabla II.	Vectores plasmidiales utilizados en este seminario.	14
Tabla III.	Partidores utilizados en este seminario.	16
Tabla IV.	Códigos de acceso de secuencias aminoacídicas utilizadas en este seminario.	18
Tabla V.	Programa de transcripción reversa.	21
Tabla VI.	Programas de PCR utilizados en este seminario.	22
Tabla VII.	Genes <i>LCYB</i> posibles de <i>M. domestica</i> entregados por GDR.	29
Tabla VIII.	Genes <i>LCYB</i> posibles de <i>M. domestica</i> identificados por ensamblaje de EST.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

°C:	Grados Celsius.
ADN:	Acido desoxirribonucleico.
ADNc:	Acido desoxirribonucleico complementario.
ARN:	Acido ribonucleico.
ARNm:	Acido ribonucleico mensajero.
BLAST:	Herramienta de alineamiento basico local.
D.O.:	Densidad optica.
DNasa:	Desoxirribonucleasa.
EST:	Marcador de secuencia expresada.
g:	Gramo, Fuerza gravitacional.
h:	Hora.
RP-HPLC:	Cromatografia liquida de alta resolucion en fase reversa.
IPTG:	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.
kb:	Kilobase.
kDa:	KiloDalton.
L:	Litro.
LB:	Medio Luria Bertani.
LCYB:	Licopeno β-ciclasa.
M:	Molar.
mg:	Miligramo.
min:	Minuto.
mL:	Mililitro.
mM:	Milimolar.
nm:	Nanometro.
ORF:	Marco abierto de lectura.
pb:	Pares de base.
PCR:	Reaccion en cadena de la polimerasa.
RT:	Transcriptasa reversa.
RT-PCR:	Transcripcion reversa acoplada a PCR.
s:	Segundo.
UTR:	Region no traducible del ARNm.
μg:	Microgramo.
μL:	Microlitro.

1. INTRODUCCION

1.1. Estructura y función de carotenoides.

Los carotenoides son pigmentos de naturaleza hidrofóbica sintetizados por organismos fotosintéticos (plantas, algas y cianobacterias), además de algunos hongos y bacterias no fotosintéticos (Fujisawa y col., 2008; Walter y Strack, 2011). Estas moléculas se encuentran compuestas de 8 unidades isoprénicas, conformando polienos de 40 carbonos. Por la existencia de hasta 15 dobles enlaces conjugados en su estructura este grupo de compuestos posee la propiedad de cromóforos (Armstrong y Hearst, 1996; Christensen y col., 2004; Polli y col., 2004).

Los carotenoides son sintetizados en organelos plastidiales (como cloroplastos y cromoplastos) en las células vegetales (Cunningham y Gantt, 1998). En cloroplastos, estos pigmentos se localizan en las membranas de tilacoides, asociados a complejos captadores de luz y a centros de reacción en cloroplastos activos (Peter y Thornber, 1991; Howitt y Pogson, 2006). Además, estos pigmentos pueden ser localizados en estructuras cristalinas o cuerpos oleosos en el estroma de cromoplastos de flores, frutos y raíces modificadas (Cunningham y Gantt, 1998; Vishnevetsky y col., 1999; Maass y col., 2009).

Los carotenoides actúan como pigmentos accesorios en los complejos cosechadores de luz en los plastidios, absorbiendo la luz en parte del espectro visible (450-570 nm), transfiriendo esta energía absorbida a las clorofilas durante la fotosíntesis (Ritz y col., 2000; Koyama y col., 2004; Bode y col., 2009). Por poseer dobles enlaces conjugados, ejercen un papel fotoprotector, previniendo el daño fotooxidativo provocado por moléculas derivadas de la fotosíntesis como el oxígeno singlete o la clorofila triplete (Woodall y col., 1997; Dall'osto y col., 2012) y participan en

la disipación térmica del exceso nocivo de energía lumínica a través del ciclo de las xantófilas (Telfer, 2005; Dall'Osto y col., 2007). Además, los carotenoides son precursores de importantes fitohormonas relacionadas con el crecimiento y desarrollo en plantas (Cazzonelli y Pogson, 2010) como lo son el ácido abscísico (ABA), relacionado con la dormancia de semillas, maduración y diferenciación embrionarias, regulación de la apertura estomática y tolerancia a estrés abiótico (North y col., 2007; Barrero y col., 2008; Chen y col., 2008; Galpaz y col., 2008); y las estrigolactonas, implicadas en la inhibición de la ramificación de brotes, relaciones simbióticas con micorrizas y estimulación de la germinación de plantas parasitarias (Umehara y col., 2008; Akiyama y col., 2010; Yoneyama y col., 2010). Por último, por su capacidad de otorgar coloración a diversos tejidos vegetales, facilitan la polinización y dispersión de semillas (Grotewold, 2006; Howitt y Pogson, 2006).

Los animales son incapaces de sintetizar carotenoides, por lo que deben incluirlos en su dieta a través del consumo de alimentos vegetales. Su importancia radica principalmente en que algunos de estos pigmentos son precursores de la vitamina A (Yeum y Russell, 2002; Fierce y col., 2008), molécula esencial para la visión, respuesta inmune, desarrollo embrionario, metabolismo óseo, hematopoyesis, mantención de la piel y mucosa (Fraser y Bramley, 2004; Krinsky y Johnson, 2005; Zhao y col., 2006; Wan y col., 2012). A su vez, estos compuestos son antioxidantes, siendo conocida su acción en la prevención de algunas variedades de cáncer y de enfermedades cardiovasculares y degenerativas (Collins, 1999; Hadley y col., 2002; Lorenzo y col., 2009; Bone y Landrum, 2010; Misawa, 2011).

Dada la importancia que presentan los carotenoides para vegetales y animales, se ha intentado determinar los mecanismos regulatorios de su biosíntesis, lográndose

la identificación y caracterización de la mayoría de los genes involucrados en la ruta carotenogénica (Cunningham y Gantt, 1998; Howitt y Pogson, 2006). Adicionalmente, se han realizado numerosos eventos con el fin de aumentar los niveles de carotenoides en diversas especies vegetales a través de la ingeniería metabólica (Shewmaker y col., 1999; Mann y col., 2000; Beyer y col., 2002; Diretto y col., 2007; Fraser y col., 2007; Aluru y col., 2008; Lamers y col., 2008).

1.2. Biosíntesis de carotenoides en plantas.

La ruta de biosíntesis de carotenoides en vegetales se encuentra altamente conservada, encontrándose descritas la mayoría de los genes y enzimas involucradas (Cunningham y Gantt, 1998; Hirschberg, 2001). Este proceso se lleva a cabo en organelos plastidiales, sin embargo, los genes carotenogénicos se localizan en el genoma nuclear. Una vez traducidas, las proteínas son destinadas a los plastidios en forma de pre-proteínas donde cumplen su función (Howitt y Pogson, 2006).

La ruta carotenogénica comienza con la enzima fitoeno sintasa (PSY) que cataliza la condensación de dos moléculas de geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP) para formar un compuesto de 40 carbonos llamado fitoeno (**Figura 1**) (Fraser y Bramley, 2004; Cazzonelli y Pogson, 2010). El fitoeno es desaturado por la fitoeno desaturasa (PDS) y luego por la ζ -caroteno desaturasa (ZDS) para dar lugar finalmente al licopeno (Cunningham y Gantt, 1998). Estas desaturaciones generan los dobles enlaces conjugados que le otorgan la característica de cromóforos a los carotenoides. (Britton, 1995). El ζ -caroteno y el licopeno sufren isomerizaciones catalizadas por las enzimas ζ -caroteno isomerasa (Z-ISO) y caroteno isomerasa (CRTISO), obteniéndose la configuración estable all-trans-licopeno.

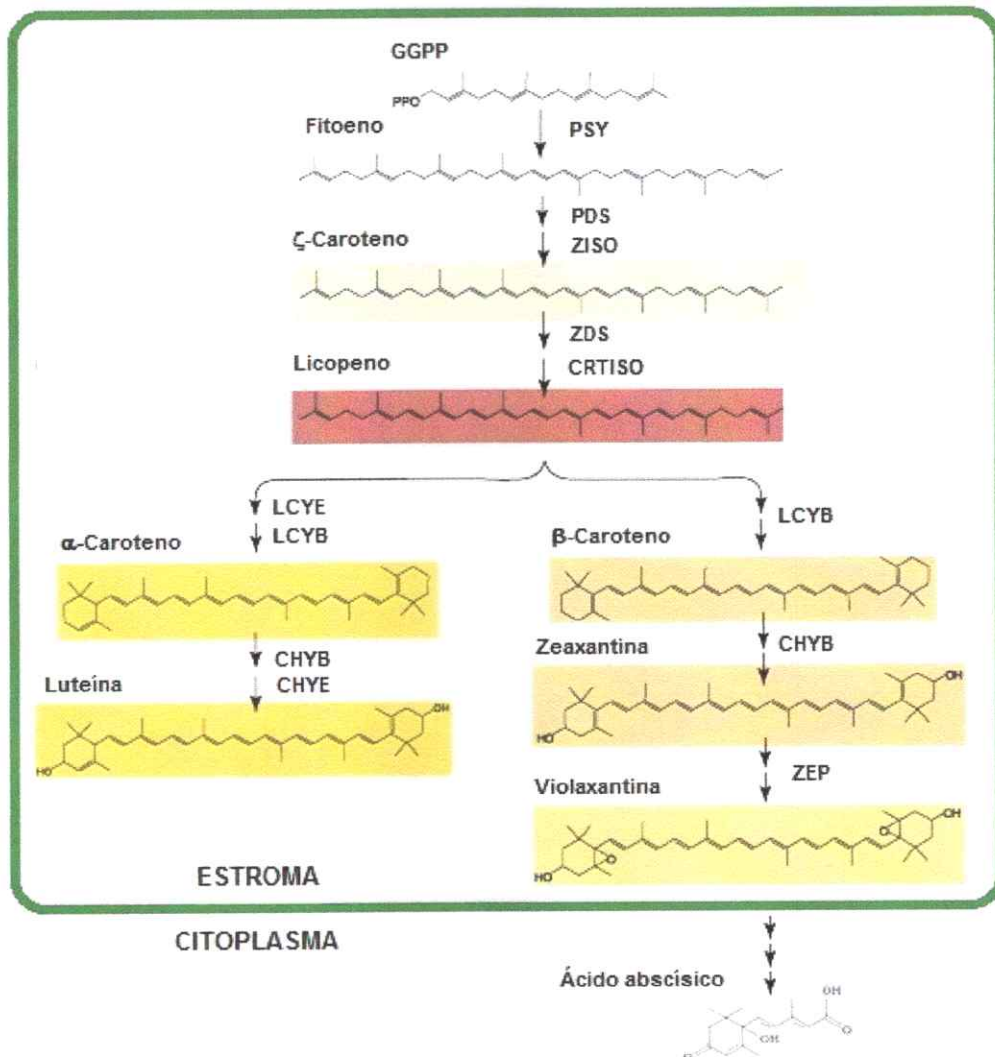


Figura 1. Ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas. Diagrama que indica las enzimas y principales productos de la biosíntesis de carotenoides en plantas. Se muestra el color del metabolito. PSY: fitoeno sintasa, PDS: fitoeno desaturasa, ZISO: ζ-caroteno isomerasa, ZDS: ζ-caroteno desaturasa, CRTISO: caroteno isomerasa, LCYE: licopeno ε-ciclasa, LCYB: licopeno β-ciclasa, CHYB: β-caroteno hidroxilasa, CHYE: ε-caroteno hidroxilasa y ZEP: zeaxantina epoxidasa. (Modificado de Ye y col., 2008)

El licopeno corresponde a un punto de ramificación en la ruta (Figura 1). Por un lado sufre ciclaciones en ambos extremos de su cadena por la licopeno ε-ciclasa (LCYE) y la licopeno β-ciclasa (LCYB), formando el α-caroteno, el cual presenta en sus extremos un anillo ε y uno β, producido por cada una de las enzimas respectivamente. Por el otro lado de la ruta, se genera el β-caroteno, molécula con 2 anillos β,

catalizados por la enzima LCYB (Cunningham y Gantt, 1998). Al hidroxilar estos dos carotenos en sus anillos se da lugar a las xantófilas luteína y zeaxantina, respectivamente, una mediada por la ϵ -hidroxilasa (CHYE) y β -hidroxilasa (CHYB) y la otra únicamente por la CHYB (Pogson y col., 1996; Sun y col., 1996). La zeaxantina es epoxidada por la zeaxantina epoxidasa (ZEP) generando violaxantina, la cual es modificada en el citosol para dar origen posteriormente al ácido abscísico (ABA) (Nambara y Marion-Poll, 2005).

Con respecto a las enzimas implicadas en esta vía, se han propuesto modelos que integran evidencia bioquímica, localización subcelular, análisis de co-expresión y mutantes que sugieren la participación de ciertas enzimas en etapas específicas de la ruta carotenogénica (Cunningham y Gantt, 1998; Fraser y col., 2000; Kim y DellaPenna, 2006; Bai y col., 2009; Joyard y col., 2009; Kim y col., 2010; Meier y col., 2011). Estos datos plantean la existencia de un complejo multi-enzimático asociado parcialmente a membranas tilacoidales plastidiales conformado por las enzimas fitoeno desaturasa (PDS), ζ -caroteno desaturasa (ZDS), licopeno β -ciclasa (LCYB) y licopeno ϵ -ciclasa (LCYE), que participan en la desaturación y ciclación de los carotenoides (Bonk y col., 1997; Cunningham y Gantt, 1998; Lopez y col., 2008).

1.3. LCYB en la síntesis de carotenoides.

La ciclación del compuesto lineal y simétrico denominado licopeno es un punto de ramificación clave en la vía de síntesis de los carotenoides, y se ha demostrado que alteraciones en su regulación o actividad enzimática afectan severamente la composición de carotenoides en distintos tejidos vegetales (Hirschberg, 2001; Bramley, 2002; Howitt y Pogson, 2006).

La formación de los anillos β o ϵ ionona es catalizada por las enzimas licopeno β -ciclase (LCYB) y licopeno ϵ -ciclase (LCYE), respectivamente. Ambas muestran identidad de secuencia aminoacídica, teniendo probablemente un origen evolutivo común (Krubasik y Sandmann, 2000).

LCYB puede actuar ciclando ambos extremos del licopeno (**Figura 2**), generando dos anillos β y produciendo β -caroteno, por medio del intermediario γ -caroteno (Huguene y col., 1995; Cunningham y col., 1996; Pecker y col., 1996). Por otra parte, LCYE puede introducir únicamente un anillo ϵ en uno de los extremos de la molécula del licopeno, generando δ -caroteno, sustrato que es reconocido por LCYB, que agrega un anillo β en el extremo opuesto de la molécula, formando α -caroteno (Hirschberg, 2001; Fraser y Bramley, 2004).

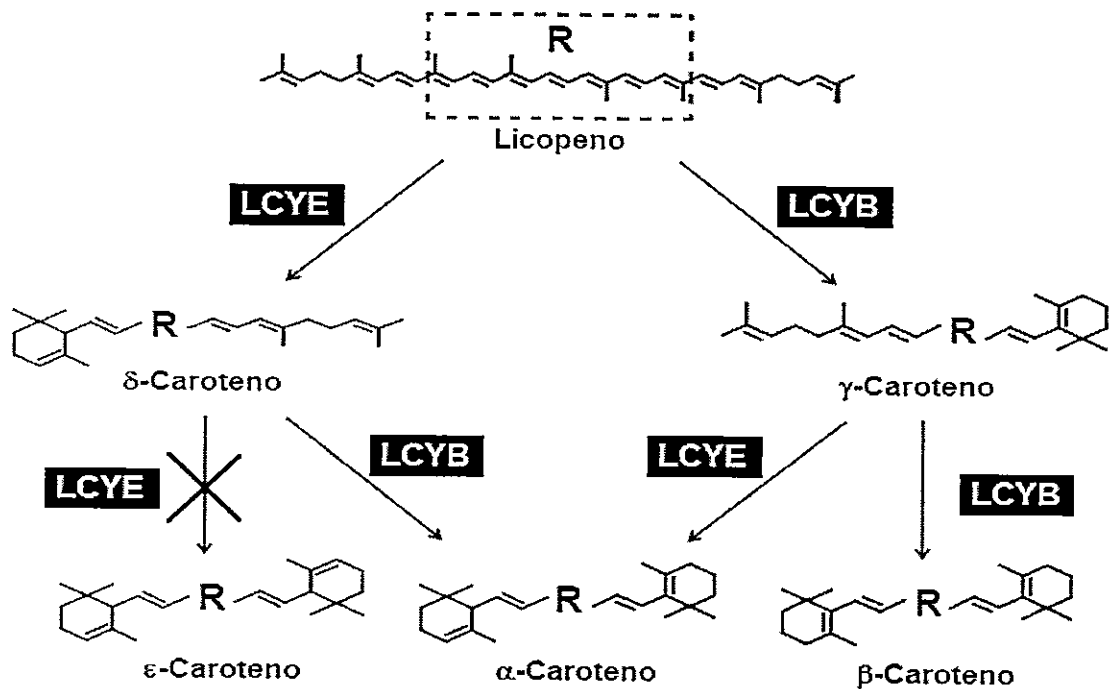


Figura 2. Reacciones de ciclación en la ruta carotenogénica. Diagrama del rol de las enzimas LCYB y LCYE en las reacciones de ciclación de carotenoides. Se indican los sustratos y productos de las enzimas. La dirección de las reacciones es indicada con una flecha. LCYB: licopeno β -ciclase. LCYE: licopeno ϵ -ciclase. (Modificado de Cunningham y Gantt, 1998)

Las enzimas tipo licopeno ciclasas se componen de alrededor de 400 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 40 kDa. Como el resto de las enzimas carotenogénicas de plantas, poseen un péptido de destinación a cloroplasto en el extremo amino terminal de 50-100 aminoácidos (Schnurr y col., 1996). Estas proteínas en estado maduro presentan un sitio de unión a dinucleótidos que parece estar implicado en la activación alostérica (Mialoundama y col., 2010), y motivos conservados característicos de este tipo de enzimas (Hugueney y col., 1995).

Se han caracterizado licopeno β -ciclasas de diversas especies vegetal tales como naranja, papaya, kiwi, azafrán, entre otros, las cuales podrían tener aplicaciones biotecnológicas en el aumento de carotenoides en plantas (Alquezar y col., 2009; Ampomah-Dwamena y col., 2009; Ahrazem y col., 2010; Devitt y col., 2010). Al respecto, se han llevado a cabo distintas estrategias para aumentar los niveles totales de los carotenoides y en especial del β -caroteno en distintos organismos vegetales. Se ha sobre-expresado el gen *LCYB* de *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum* (tomate) en plantas de tomate, obteniéndose como resultado un aumento y cambio en la composición de carotenoides (Rosati y col., 2000; D'Ambrosio y col., 2004). También se generó un aumento en los niveles de β -caroteno expresando el gen *LCYB* de *Lycium barbarum* en plantas de tabaco (Ji y col., 2009). Por otra parte, experimentos de silenciamiento génico del gen *LCYE* en plantas de papa resultaron en aumento en los niveles totales de carotenoides y particularmente en β -caroteno, lo que indica un redireccionamiento de la ruta y demuestra que la ciclación del licopeno es un paso clave en la biosíntesis de carotenoides (Diretto y col., 2006).

1.4. Carotenoides en *Malus domestica*.

La manzana (*Malus domestica*) es un fruto perteneciente a la familia *Rosaceae*, subfamilia *pomoideae*, junto con peras y membrillos. Los frutos de este grupo constan de dos partes principales: el ovario expandido homólogo a un fruto de tomate, conocido como núcleo, y la corteza o hipanto, parte comestible del fruto derivada de la expansión de la base fusionada de pétalos y sépalos rodeando el ovario (MacDaniels, 1940).

Los frutos del manzano son consumidos en grandes cantidades alrededor del mundo en parte debido a la presencia de metabolitos beneficiosos como flavonoides, vitaminas y fibra dietaria, que los convierten en un alimento con cualidades tanto nutritivas como desde el punto de vista de la salud humana. Los carotenoides en manzanas maduras se restringen a células de la cáscara, exhibiendo una coloración blanquecina en el hipanto, debido a la baja concentración de estos pigmentos. El β -caroteno en particular se presenta únicamente en trazas en la pulpa del fruto (Ampomah-Dwamena y col., 2012).

El manzano es funcionalmente un organismo diploide con un $2n = 34$, presentando un tamaño de genoma de aproximadamente $1,5 \times 10^9$ pb (Marie y Brown, 1993). El estudio de este genoma se ha facilitado debido a que *M. domestica* fue recientemente secuenciado (Velasco y col., 2010). Además de esto, existen aproximaciones que permiten identificar genes que se transcriben en este organismo gracias a marcadores de secuencia expresada o EST (Newcomb y col., 2006).

Existe escasa información disponible de los mecanismos involucrados y la regulación en la síntesis de carotenoides en manzana, pero recientemente se ha

comenzado a estudiar los componentes de esta ruta carotenogénica en diversas variedades de *M. domestica*, lográndose ver la expresión diferencial de diversos genes carotenogénicos (Ampomah-Dwamena y col., 2012). En nuestro laboratorio se ha comenzado con el estudio de esta ruta para el cultivar Fuji var. Raku-Raku de *M. domestica* dentro del marco del proyecto FONDEF D10I1022 que tiene como finalidad generar una variedad de manzana con mayor contenido de carotenoides.

1.5. *Escherichia coli* como sistema de expresión heteróloga de genes carotenogénicos.

Entre los muchos modelos existentes para la expresión heteróloga de proteínas, la bacteria gram negativa *Escherichia coli* es el sistema microbiano más ampliamente utilizado, esto debido a su alta tasa de crecimiento, bajo costo, rápido uso, alta productividad y capacidad de cultivo continuo, además del gran conocimiento que se tiene de su metabolismo y expresión génica debido a la secuenciación de su genoma (Sambrook y col., 1989; Makrides, 1996).

Existen diversas metodologías para la expresión del gen de interés y posteriormente la proteína, destacándose las basadas en comandar la transcripción de estos genes con promotores inducibles. En particular, una de las más utilizadas se basa en el promotor de la ARN polimerasa del fago T7 que puede ser inducido por el compuesto análogo no hidrolizable de la lactosa, el isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido o IPTG (Studier y Moffatt, 1986). Utilizando esta técnica es que se han diseñado vectores que presentan este tipo de promotores. Este es el caso de los vectores de expresión pET (Novagen), en el cual el gen de interés queda dirigido por el promotor T7 inducible por IPTG y transcrito únicamente por la enzima ARN polimerasa

proveniente del fago T7 que se encuentra codificada en el genoma bacteriano de las cepas específicas utilizadas para expresión heteróloga como BL21-DE3 (Pan y Malcolm, 2000).

En particular, el estudio de las enzimas carotenogénicas es posible gracias a la bacteria carotenogénica *Erwinia uredovora*. La ruta síntesis de carotenoides de *E. uredovora* es más simple que en plantas, ya que no posee ramificaciones e involucra únicamente seis enzimas para producir la xantófila zeaxantina β -diglucosidasa a partir de geranil-geranil pirofosfato (Misawa y col., 1990).

Se realizó la transformación de la bacteria *E. coli* con los genes de la ruta completa de síntesis de carotenoides de *E. uredovora* (Misawa y col., 1990; Niklitschek y col., 2008) para utilizarla como un sistema heterólogo para la verificación de la funcionalidad de los genes carotenogénicos de diferentes organismos. Para esto se usa una cepa de *E. coli* que ha sido transformada con un plásmido que contiene la ruta carotenogénica completa de *E. uredovora* con mutaciones en el gen cuya funcionalidad se desea evaluar.

Esta estrategia ha sido utilizada para analizar la funcionalidad y actividad catalítica de las enzimas carotenogénicas de distintos orígenes como bacterias, levaduras, algas y plantas. Esta estrategia fue implementada para determinar la funcionalidad del gen *crtI* de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Niklitschek y col., 2008) y del gen caroteno β -hidroxilasa (*crtX*) del alga *Haematococcus pluvialis* (Linden, 1999).

Esta metodología también ha sido probada con enzimas carotenogénicas provenientes de plantas superiores. Por ejemplo, se realizó la caracterización

molecular y funcional de los productos de los genes *LCYB1* y *LCYB2* específicos para cloroplasto y cromoplasto de *Citrus sinensis*, corroborándose producción del β -caroteno por parte de ambas enzimas utilizando este método (Alquezar y col., 2009). Particularmente, en nuestro laboratorio, se evaluó la funcionalidad del producto génico del gen *LCYB1* y *LCYB2* de *Daucus carota*, comprobándose que estos genes codifican enzimas capaces de convertir el licopeno en β -caroteno en un sistema bacteriano (Moreno, 2010; Rosas, 2013).

En este seminario de título se propuso buscar genes homólogos de la enzima LCYB provenientes de *M. domestica* y evaluar su funcionalidad mediante experimentos de complementación heteróloga en la bacteria *E. coli* BL21 portadora del vector pDS1B $\Delta crtY$, el cual contiene la ruta carotenogénica de *E. uredovora* y una mutación delecional de 612 pb en el gen *crtY*, análogo bacteriano a *LCYB* (Niklitschek y col., 2008).

1.6. Hipótesis.

El genoma de *M. domestica* posee genes homólogos a *LCYB* cuyo producto génico es funcional en el sistema heterólogo bacteriano, catalizando la formación de β -caroteno y complementando la mutación del gen *crtY* (*LCYB*) en cepas de *E. coli* BL21 pDS1B Δ *crtY*.

1.7. Objetivos.

1.7.1. Objetivo general.

- Evaluar la funcionalidad de posibles genes que codifiquen la enzima licopeno β -ciclase (*LCYB*) de *M. domestica* mediante expresión heteróloga en *E. coli*.

1.7.2. Objetivos específicos.

- Identificar los genes homólogos para *LCYB* en el genoma de *M. domestica* mediante análisis *in silico*.
- Aislar las secuencias codificantes de los genes *LCYB* a partir de ADNc de *M. domestica* mediante la técnica de RT-PCR.
- Generar un vector de expresión que contenga el gen *LCYB* y transformar cepas de *E. coli* BL21 pDS1B Δ *crtY*.
- Determinar la composición y contenido de carotenoides totales y específicos en *E. coli* mediante RP-HPLC.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Reactivos.

Se utilizaron reactivos de calidad adecuada para las técnicas de biología molecular realizadas, obtenidos de las empresas y marcas registradas: Axygen, BioRad, Fermentas, Invitrogen, Merck, MO BIO Laboratories Inc., New England Biolabs, Promega, Novagen, Sigma-Aldrich y US Biological.

2.2. Cepas, plásmidos y medios de cultivo.

En el presente Seminario de Título se utilizaron cepas de *E. coli* transformadas con distintos vectores (Tablas I y II).

Tabla I. Cepas de *E. coli* utilizadas en este seminario.

Cepa de <i>E. coli</i>	Características	Fuente de referencia
DH5 α	fhuA2 Δ (argF-lacZ) U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ) M15gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17.	Sambrook y col., 1989
pDS1B	BL21 portadora del plásmido pDS1B con genes de ruta de síntesis de carotenoides de <i>E. uredoovora</i> . Productora de β -caroteno. Utilizada como control positivo en el presente trabajo.	Niklitschek y col., 2008
pDS1B Δ crtY	BL21 portadora de genes de la ruta de síntesis de carotenoides de <i>E. uredoovora</i> en plásmido pDS1B con una delección en el gen <i>crtY</i> . Productora de licopeno. Utilizada como control negativo y sujeto de transformación en el presente trabajo.	Niklitschek y col., 2008
pDS1B Δ crtY pETBlue1	Derivada de la cepa BL21 pDS1B Δ crtY transformada con el vector de expresión pETBlue1. Utilizada como control de transformación en el presente trabajo.	Este trabajo
pDS1B Δ crtY pETBlue1-MdLCYB1	Derivada de la cepa BL21 pDS1B Δ crtY transformada con el gen posible MdLCYB1 clonado en el vector de expresión pETBlue1. Utilizada como sujeto de estudio en el presente trabajo.	Este trabajo
pDS1B Δ crtY pETBlue1-MdLCYB2	Derivada de la cepa BL21 pDS1B Δ crtY transformada con el gen posible MdLCYB2 clonado en el vector de expresión pETBlue1. Utilizada como sujeto de estudio en el presente trabajo.	Este trabajo

Tabla II. Vectores plasmidiales utilizados en este seminario.

Plásmido	Tamaño (pb)	Características	Fuente de referencia
pCR8/GW-TOPO	2817	Vector de entrada. Origen pUC Linealizado con 3' T overhangs. Topoisomerasa I unida covalentemente. Resistencia a espectinomicina.	Invitrogen
pCR8-MdLCYB1	4591	pCR8 clonado con el fragmento de ADNc de 1774 pb que contiene el marco abierto de lectura para MdLCYB1. Resistencia a espectinomicina.	Este trabajo
pCR8-MdLCYB2	4460	pCR8 clonado con el fragmento de ADNc de 1643 pb que contiene el marco abierto de lectura para MdLCYB2. Resistencia a espectinomicina.	Este trabajo
pETBlue1	3476	Vector de expresión. Promotor T7 inducible por IPTG. Operón Lac. Selección de recombinantes por color. Sitio de unión a ribosoma. Resistencia a ampicilina.	Novagen
pETBlue1-MdLCYB1	5150	pET-Blue1 clonado con el fragmento de ADNc de 1774 pb que contiene el marco abierto de lectura para MdLCYB1 interrumpiendo el gen lac-Z, comandado por el promotor T7. Resistencia a ampicilina.	Este trabajo
pETBlue1-MdLCYB2	5119	pET-Blue1 clonado con el fragmento de ADNc de 1643 pb que contiene el marco abierto de lectura para MdLCYB2 interrumpiendo el gen lac-Z, comandado por el promotor T7. Resistencia a ampicilina.	Este trabajo
pDS1B	11976	Portador de los genes de la ruta carotenogénica <i>crtB</i> , <i>crtE</i> , <i>crtI</i> , <i>crtY</i> , y <i>crtX</i> de <i>E. uredovora</i> . Resistencia a cloranfenicol.	Niklitschek y col., 2008
pDS1B Δ<i>crtY</i>	11364	pDS1B modificado. Presenta una mutación delecional interna de 612 pb del gen <i>crtY</i> . Resistencia a cloranfenicol.	Niklitschek y col., 2008

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento bacteriano en este seminario de título fue el medio Luria-Bertani (LB) compuesto de triptona 1%, cloruro de sodio 1% y extracto de levadura 0,5%. Para el crecimiento bacteriano en medio sólido se utilizó medio LB son Agar-agar 1,5%.

2.3. Material vegetal.

Se utilizaron muestras de tejido de frutos y hojas de manzanos (*M. domestica* cv. *Fuji var Raku-Raku*) para la extracción de ARN total obtenidos gracias a la empresa Univiveros (Paine, Región Metropolitana). Se seleccionaron hojas maduras con características similares de tamaño (5-7 x 3-4 cm) y frutos con una coloración rojiza clara sobre un fondo verdoso amarillento, piel característica de una manzana Fuji madura. Una vez recolectados, se congelaron todos los tejidos de manzano en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.4. Partidores.

Para las distintas amplificaciones por PCR se utilizaron los partidores descritos en la **Tabla III**.

Tabla III. Partidores utilizados en este seminario.

Nombre	Secuencia	T _m (°C)	Amp (pb)	Función
oligo AP	CGCCACGCGTCCGACTAGTACTTTTTTTTTTT TTTT	61,5	-	Reacciones de RT-PCR para la síntesis ADNc.
Actin F	TGACCGAATGAGCAAGGAAATTACTGC	59,3	156	Gen control. Utilizado para verificar la calidad del ADNc.
Actin R	TACTCAGCTTTGGCAATCCACATCTG	59,1		
LCYB1F1	ACCCAGATTGTATTTTCAGGAACTTG	55,7	1674	Amplificación de marco abierto de lectura de MdLCYB1 a partir de ADNc de <i>M. domestica</i> .
LCYB1R	GTTGGTTGACAACACTATTAGCAACAG	55,0		
LCYB2F	ACCTTCATTCTCGCTCTAATGGC	58,9	1643	Amplificación de marco abierto de lectura de MdLCYB2 a partir de ADNc de <i>M. domestica</i> .
LCYB2R	TGTGTCCGAGCAGATCATTTGACAAG	59,6		
M13F	GTAAAACGACGGCCAG	50,7	-	Secuenciación de las construcciones PCR8-MdLCYB.
M13R-pUC	CAGGAAACAGCTATGACC	50,1		
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	47,5	-	PCR direccionado y secuenciación de construcciones pETBlue1-MdLCYB junto con LCYB1R o LCYB2R.
lcyb1-fwd	GTCATCTCGACTGTTTCTTCCCGATC	58,8	116	Detección de la expresión transcripcional correspondiente a gen de MdLCYB1.
lcyb1-rev	TCTTTACCAAAGGAGGAGTCCCCTTG	59,9		
lcyb2-fwd	GGCTGAAGCCATTGCAGAGTGC	61,4	110	Detección de la expresión transcripcional correspondiente a gen de MdLCYB2.
lcyb2-rev	CCCTCGTGATCTCCTCTCGATT	60,5		

T_m = Temperatura de fusión. *Amp* = Tamaño de fragmento de amplificación por PCR.

2.5. Metodologías.

2.5.1. Análisis bioinformático.

2.5.1.1. Obtención y análisis de secuencias nucleotídicas de genes *LCYB* posibles en *M. domestica*.

La obtención y el análisis de secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes *LCYB*, se realizaron mediante la Base de Datos de Genomas de Rosáceas (Genome Database of Rosacea: GDR) donde se encuentra el genoma secuenciado de *M. domestica* (Velasco y cols., 2010). Se realizaron alineamientos de las secuencias de genes de otras especies que codifican la enzima *LCYB* con el genoma de *M. domestica* mediante la herramienta BLAST. La predicción de los transcritos de los genes posibles encontrados se realizó mediante las bases de datos de EST (Expressed Sequence Tag) ESTIMA:Apple y KEGG. El estudio de las secuencias nucleotídicas individuales y análisis posteriores se realizaron utilizando la herramienta VectorNTI (Invitrogen).

2.5.1.2. Análisis de secuencia aminoacídica de *LCYB* posibles.

Se analizó la localización subcelular predicha para cada proteína posible mediante el software TargetP 1.1. Se realizaron alineamientos de secuencias aminoacídicas y se construyó un árbol filogenético por Neighbor Joining utilizando el software de libre disposición MEGA 5.05 (Tamura y cols., 2011) y editados con el programa Jalview (Waterhouse y col., 2009). Los códigos de acceso de secuencias aminoacídicas utilizadas se muestran en la **Tabla IV**.

Tabla IV. Códigos de acceso de secuencias aminoacídicas utilizadas en este seminario.

Organismo	Nombre	Código
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtLCYB	AEE74874.1
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	BvCRTY	ABC50115.1
<i>Capsicum annuum</i>	CaLCYB1	ADH04276.1
<i>Carica papaya</i>	CpaLCYB1	ACM24791.1
<i>Carica papaya</i>	CpaLCYB2	ACR61334.1
<i>Citrus maxima</i>	CmLCYB	AAR89632.1
<i>Citrus x paradisi</i>	CpLCYB1	AAD38049.2
<i>Citrus x paradisi</i>	CpLCYB2	ACX37456.1
<i>Citrus sinensis</i>	CsLCYB1	ABB72443.1
<i>Citrus sinensis</i>	CsLCYB2	AAF18389.1
<i>Crocus sativus</i>	CsaLCYB1	ADA82242.1
<i>Crocus sativus</i>	CsaLCYB2	ADA82241.1
<i>Daucus carota</i>	DcLCYB1	ABB52071.1
<i>Daucus carota</i>	DcLCYB2	ABB52072.1
<i>Eriobotrya japonica</i>	EjLCYB	AFP43698.1
<i>Ficus carica</i>	FcLCYB	ADX36406.1
<i>Pantoea ananatis</i>	PaCRTY	BAA14126.1
<i>Solanum lycopersicum</i>	SlLCYB	CAA60170.1
<i>Solanum lycopersicum</i>	SlCYCB	NP001234445.1
<i>Vitis vinifera</i>	VvLCYB1	AFP28799.1
<i>Vitis vinifera</i>	VvLCYB2	AFP28803.1
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	XdPBS	AJ133646.1
<i>Zobellia galactanivorans</i>	ZgCRTY	CAZ96005.1

2.5.2. Extracción del ARN.

2.5.2.1. Extracción de ARN a partir de tejido de *M. domestica*.

Para la extracción de ARN total de tejidos de manzana se utilizó una modificación de un protocolo previamente descrito (Meisel y col., 2005). Se pesaron 4 g de hipanto de fruto o 0,3 g de hoja de manzano. Se maceró la muestra en un mortero estéril en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se calentaron a 65°C 10 mL de búffer de extracción: CTAB 2%, PVP40 (PM. 40.000) 2%, EDTA 25 mM, NaCl 2M, TrisHCl (pH 8) 100 mM, trihidroclorato de espermidina 0.05 % y β -mercaptoetanol 2% (adicionado inmediatamente antes de usar) y se agregaron a la muestra. Se transfirió la mezcla a un tubo de 50 mL, mezclando en un Vortex durante 1 min. Se incubó a 65°C, agitando ocasionalmente, durante 30 min. Se agregó 1 volumen equivalente de solución fría de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó vigorosamente la mezcla durante 2 min. Se centrifugó a 12.000 g a 4°C por 20 min y se transfirió el sobrenadante acuoso a un tubo nuevo. Se agregó 1 volumen de LiCl 10M y se dejó a 4°C durante 16 h. Se centrifugó a 12.000 g a 4°C durante 30 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se suspendió en 500 μ L de agua nanopura tratada con DEPC. Se transfirió la mezcla a un tubo de 2 mL, se le agregó 1 volumen frío de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó durante 2 min, para luego centrifugar a 14.000 g a 4°C durante 10 min. Se recuperó la fase acuosa y se agregó 1 mL de etanol 75% frío. Se incubó a -20°C durante 1 h y se centrifugó a 14.000 g a 4°C durante 20 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se secó a temperatura ambiente. Se suspendió en 20 μ L de agua nanopura tratada con DEPC (pH 5). Se almacenó a -80°C hasta su uso.

2.5.2.2. Extracción de ARN a partir de bacterias.

Para la extracción de ARN total a partir de bacterias se preparó un cultivo de las cepas a estudiar de 5 mL de medio LB líquido con ampicilina 100 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL crecido durante 16 h. Este cultivo fue usado para inocular 50 mL de medio LB líquido con los mismos antibióticos. Se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar $DO_{600} = 0,5-0,8$. Se dividió en 2 tubos y uno se indujo con IPTG 1 mM. Se incubó con agitación a 37°C durante 4h. Para los pasos de extracción de ARN se utilizó el protocolo del reactivo de TRIzol® (Life Technologies) siguiendo las indicaciones entregadas por el fabricante.

2.5.3. Cuantificación de ácidos nucleicos.

Para evaluar la calidad y cantidad de ARN o ADN se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Thermo). Además de determinar la concentración de la muestra, se evaluó la presencia de contaminantes en la mezcla. Para esto se analizaron las razones de absorción A_{260}/A_{280} (evaluación de contaminación por proteínas) y A_{260}/A_{230} (evaluación de contaminación por polisacáridos y polifenoles).

2.5.4. Síntesis de ADNc de *M. domestica*.

2.5.4.1. Tratamiento del ARN con DNAsa I.

Para eliminar contaminación con ADN genómico se trataron 7 µg de ARN con 50U de DNAsa I (Fermentas), 1 µL de inhibidor de RNAsa (Fermentas) y 2 µL de búffer de DNAsa/MgCl₂ 10X (Fermentas). Se completó con agua DEPC hasta 20 µL. Se incubó a 37°C durante 35 min. Se transfirió rápidamente a hielo y se agregaron 2 µL EDTA (25 mM). Se incubó en hielo durante 10 min.

2.5.4.2. Transcripción reversa (RT-PCR).

Para generar el ADNc a partir del ARN se realizó una transcripción reversa utilizando el sistema ImProm-II Reverse Transcription (Promega). Se mezclaron 9,5 μL de ARN total tratado con DNAsa con 3 μL del partidor Oligo-AP (**Tabla III**) para el caso de ARN extraído de tejido de manzana; y utilizando los partidores LCYB1R y LCYB2R (**Tabla III**) para la extracción de ARN a partir de bacterias. Se incubó a 70°C durante 5 min. (**Tabla V**). Se detuvo el programa y, manteniendo los tubos en hielo, se agregó la mezcla para la transcripción reversa compuesta por: 10 μL de búffer ImProm-II 5X, 1 μL de inhibidor de RNAsa (Fermentas), 5 μl de MgCl_2 50 mM, 2,5 μL de dNTP 10 μM , 16 μL de agua DEPC, 3 μL de transcriptasa reversa ImProm-II. Se colocaron nuevamente los tubos en el termociclador y se continuó el programa. Se utilizó el termociclador MyCycler™ (BioRad).

Tabla V. Programa de transcripción reversa.

Transcripción Reversa (RT-PCR)			
Segmento	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1*	70°C	5 min	1
	25°C	5 min	
1	42°C	60 min	1
	70°C	15 min	
	10°C	∞	

* *Luego de este paso se detuvo momentáneamente el programa para agregar el resto de los reactivos.*

2.5.5. Amplificación de ADN mediante PCR.

Se realizaron las reacciones de amplificación de ADN utilizando dos tipos de polimerasas: *Taq* ADN polimerasa (Sigma-Aldrich) y *Pfu* ADN polimerasa (Fermentas); para identificar o purificar las secuencias amplificadas, respectivamente. Se siguió las indicaciones entregadas por el fabricante para preparar las mezclas de reacción. Se

utilizó el termociclador MyCycler™ (BioRad). Los distintos programas de PCR para las diferentes reacciones se indican en la **Tabla VI**.

Tabla VI. Programas de PCR utilizados en este seminario.

1. Amplificación de fragmentos de actina y MdLCYB desde ADNc de <i>M. domestica</i>.			
Segmento	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	94°C	5 min	1
2	94°C	1 min	28
	55°C	1 min	
	72°C	30 s	
3	72°C	10 min	1
	10°C	∞	
2. Amplificación de la secuencia codificante de genes MdLCYB.			
Segmento	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	94°C	5 min	1
2	94°C	30 s	33
	55°C	1 min	
	72°C	2 min	
3	72°C	10 min	1
	10°C	∞	
3. Amplificación con <i>Pfu</i> ADN pol. de la secuencia codificante de genes MdLCYB.			
Segmento	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	94°C	5 min	1
2	94°C	30 s	33
	55°C	1 min	
	72°C	4 min	
3	72°C	10 min	1
	10°C	∞	
4. PCR direccionado para la identificación de las construcciones pETBlue1-MdLCYB.			
Segmento	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	94°C	5 min	1
2	94°C	30 s	33
	50°C	1 min	
	72°C	2 min 30 s	
3	72°C	10 min	1
	10°C	∞	

2.5.6. Extracción del ADN plasmidial.

La extracción del ADN plasmidial desde las cepas bacterianas para ensayos moleculares y transformaciones se realizó siguiendo el protocolo del kit Axyprep™ (Axygen).

2.5.7. Digestiones enzimáticas.

Se realizaron ensayos de digestión enzimática para detectar la inserción del fragmento de interés y el sentido de los fragmentos clonados. Las enzimas utilizadas fueron: *Ava*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Nco*I, *Xba*I y *Xho*I (Fermentas). Se preparó la mezcla de reacción con el ADN de interés, la enzima de restricción, búffer respectivo y agua libre de nucleasas en los volúmenes indicados por el fabricante. Se incubó por un tiempo y una temperatura determinados por el fabricante dependiendo de la enzima con la que se estuviera digiriendo.

2.5.8. Electroforesis en geles de agarosa.

Para la visualización de ácidos nucleicos obtenidos de la extracción de tejido vegetal o cultivo bacteriano y de la amplificación o digestión, se realizó electroforesis en geles de agarosa de 1-1,5% en búffer TAE 1X compuesto de: Tris 40mM, ácido acético 20mM, EDTA 1mM; pH 8. Previo a ser cargadas en el gel, se adicionó a las muestras, a razón de 5:1, búffer de carga, compuesto de: azul de bromofenol 0,25%, xilencianol 0,25%, glicerol 80%. Como estándar de peso molecular se utilizó Gene Ruler (Fermentas). Se corrió en búffer TAE 1X y posteriormente se tiñeron los geles en solución de bromuro de etidio 1 µg/mL durante 15 min. La visualización de los ácidos nucleicos se realizó con el transiluminador UV GeneGenius Classic (SynGene) y fueron fotografiados utilizando el software asociado al equipo (GeneSnap).

2.5.9. Purificación del ADN desde geles o productos de PCR.

La purificación de las bandas del ADN desde los geles de agarosa o directamente del producto de amplificación por PCR se realizó siguiendo el protocolo del kit de purificación de ADN Wizard® (Promega).

2.5.10. Generación de construcciones pETBlue1-MdLCYB.

2.5.10.1. Clonación de las secuencias codificantes de genes MdLCYB1 y MdLCYB2 en el vector de entrada pCR8.

Los fragmentos de amplificación con *Pfu* ADN polimerasa (**Sección 2.5.5.**) de las secuencias *LCYB* obtenidos a partir de ADNc de manzana fueron modificados después de purificarlos, agregándoles una adenina terminal en los extremos 3' con el fin de generar extremos cohesivos compatibles con el vector de entrada pCR8 (Invitrogen). Para ello, se realizó una mezcla de reacción con la siguiente composición: 1X búffer *Taq*, 0,5U de *Taq* ADN polimerasa (Sigma-Aldrich), 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dATP, 250 ng de producto PCR purificado. Se incubó a 72°C durante 30 min. Posteriormente, se realizó la ligación de los fragmentos obtenidos con el vector de entrada siguiendo las indicaciones del protocolo de pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen).

2.5.10.2. Clonación de los genes MdLCYB en el vector de expresión pETBlue1.

Se amplificaron las secuencias de MdLCYB con *Pfu* DNA Polimerasa usando como molde las construcciones pCR8-MdLCYB con los partidores correspondientes (**Tabla III**) y el programa usado anteriormente (**Tabla VI**) y se purificó el fragmento desde geles de agarosa luego de la electroforesis del producto de PCR. En paralelo, se realizó una extracción del ADN plasmidial del vector pETBlue1 y se linealizó utilizando

la enzima de restricción *EcoRV* (Fermentas) con las condiciones de reacción pertinentes y se purificó desde geles de agarosa luego de la corrida de electroforesis. La ligación de los extremos de los fragmentos se realizó utilizando la enzima T4 ADN ligasa (New England Biolabs) tomando como sustrato los fragmentos de ADN de la amplificación de los genes *MdLCYB* y el vector linealizado, siguiendo las indicaciones y condiciones entregadas por el fabricante.

2.5.11. Secuenciación.

Las construcciones *pCR8-MdLCYB* y *pETBlue1-MdLCYB* identificadas como positivas mediante los análisis de digestión enzimática fueron secuenciadas por Macrogen Co. (USA), utilizando los partidores pertinentes indicados previamente en la **Tabla III.**

2.5.12. Transformación de células de *E. coli*.

2.5.12.1. Preparación de células quimio-competentes.

Se inoculó 1 mL de cultivo de 16 h en 100 mL de medio LB. Se dejó creciendo con agitación moderada hasta una $DO_{600} = 0,3$. Se distribuyó en dos tubos Falcon de 50 mL y se centrifugó a 3000 g a 4°C durante 10 min. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente y se agregaron a cada tubo, en frío, 5 mL de búffer CCMB80 compuesto de: KOAc pH 7 10 mM, $CaCl_2 \times 2H_2O$ 80 mM, $MnCl_2 \times 4H_2O$ 20 mM, $MgCl_2 \times 6H_2O$ 10 mM, glicerol 10%; pH 6,4. Se suspendió delicadamente el precipitado para luego completar con búffer CCMB80 hasta 20 mL en cada tubo y transferir el contenido de ambos tubos a un único tubo Falcon de 50 mL. Se incubó en hielo por 20 min. Se centrifugó a 2000 g a 4°C por 8 min. Se descartó el sobrenadante y se suspendió suavemente el precipitado en 10 mL de búffer CCMB80 frío. Se midió la DO_{600} de una

mezcla de 200 μL de células suspendidas y 800 μL de medio LB. Se agregó búffer CCMB80 hasta alcanzar una $\text{DO}_{600} = 1-1,5$. Se Incubó en hielo 20 min. Se prepararon alícuotas de 100 μL en tubos Eppendorf de 1,5 mL estériles y fríos, las que fueron almacenadas a -80°C .

2.5.12.2. Transformación de células quimio-competentes.

Se agregaron 5 μL de ADN plasmidial (de 10 pg a 100 ng) a un vial de *E. coli* quimio-competentes y se mezcló suavemente. Se incubó en hielo por 30 min. Se dio un golpe de calor a 42°C sin agitación por 30 s para luego incubar inmediatamente en hielo por 2 min. Se agregó 1 mL de medio LB a temperatura ambiente al tubo. Se incubó a 37°C con agitación durante 1 h. Se tomaron 100 μL y se sembraron en placas de LB sólido con el antibiótico respectivo. Se incubaron a 37°C durante 16 h.

2.5.13. Extracción y cuantificación de carotenoides a partir de *E. coli*.

2.5.13.1. Preparación del cultivo.

Se creció un inóculo de las células a estudiar, con agitación a 37°C durante 16 h en medio LB con los antibióticos ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y cloranfenicol 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se tomaron 2 mL del inóculo y se agregaron a 200 mL de medio LB líquido con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y cloranfenicol 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar $\text{DO}_{600} = 0,5-0,8$. Se dividió el volumen total del cultivo en dos matraces y a uno de estos se le agregó IPTG 1 mM. Se incubó en condiciones de oscuridad con agitación a 30°C por 48 h., favoreciendo la acumulación de carotenoides.

2.5.13.2. Determinación de peso seco.

Se recolectaron 15 mL de los cultivos originales en tubos Falcon de 15 mL previamente pesados. Se centrifugó a 3000 g por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado obtenido se secó en una estufa a 50°C durante 24 h. Luego, se pesaron los tubos nuevamente y se obtuvo el valor de peso seco calculando la diferencia entre el valor de los tubos Falcon con y sin precipitado.

2.5.13.3. Extracción de pigmentos carotenoides.

Se centrifugaron los 85 mL en dos tubos Falcon de 50 mL a 5000 g por 15 min. Se descartó el sobrenadante y se suspendió cada tubo en 10 mL de agua estéril. Se traspasó a tubos Falcon de 15 mL y se centrifugó a 4000 g por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 500 µL de perlas de vidrio de 0,1 µm. Se agitó en Vortex a máxima velocidad por 5 min. Se agregó 1 mL de acetona y se agitó nuevamente en Vortex por 5 min. Se centrifugó a 4000 g a 4°C durante 5 min. Se recolectó el sobrenadante y se secó mediante SpeedVac (Savant). Se almacenó a -80°C en oscuridad hasta su uso.

2.5.13.4. Determinación de la composición de carotenoides mediante RP-HPLC.

Se utilizaron 20 µL de la extracción de pigmentos para el análisis mediante RP-HPLC. Este análisis se realizó en una columna cromatográfica 100 RP 18-5µ 150 x 4,6 mm (MultoHigh®) con una bomba de flujo LC-20AT (Shimadzu) y un detector con arreglo de fotodiodos SPD-M20A (Shimadzu). Se utilizó una fase móvil compuesta en base a Acetonitrilo:Metanol:Isopropanol a razón 17:2:1. Se realizó la cromatografía a un flujo de 2 mL/min durante 50 min. Se realizó la cuantificación a una longitud de onda

de 474 nm. El análisis de los datos se realizó mediante el software LabSolutions 5.42 SP3 (Shimadzu).

2.5.14. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos se basaron en el programa bioinformático GraphPad (Prism 5®) con un t-test pareado de dos colas ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Identificación *in silico* de genes *LCYB* posibles en *M. domestica*.

Utilizando las herramientas disponibles en la base de datos GDR fue posible identificar distintos genes posibles dentro del borrador del genoma de *M. domestica*. Esta actividad pudo ser realizada debido a que en GDR se encuentra una lista donde se indican los genes posibles con la posible función de la proteína codificada basada en la identidad de secuencia con proteínas anteriormente descritas. Además, existe la factibilidad de realizar un BLAST dentro del genoma deseado. Los genes posibles entregados como resultado de este análisis se indican en la **Tabla VII**. En ella se muestra el código de acceso dentro de GDR, en qué lugar fue encontrado dentro del genoma de *M. domestica*, la longitud predicha del transcrito y la mayor identidad aminoacídica de la posible proteína con otra enzima *LCYB* previamente descrita, además de la identidad aminoacídica que presenta con la enzima *LCYB* de *A. thaliana*.

Tabla VII. Genes *LCYB* posibles de *M. domestica* entregados por GDR.

Nombre	Código	Crom	Ex	ORF (pb)	Proteína (aa)	Identidad AtLCYB (%)	Máx. identidad (%)
<i>LCYB1</i>	MDP0000194622	14	5	3255	680	58,4	98 (EjLCYB)
<i>LCYB2</i>	MDP0000145663	3	1	1491	496	52,4	79 (AcLCYB)
<i>LCYB3</i>	MDP0000258205	15	1	720	239	19,1	72 (AcLCYB)

Crom: Cromosoma. *Ex:* Número de exones. *ORF:* Marco abierto de lectura. *At:* *Arabidopsis thaliana*. *Ej:* *Eriobotrya japonica* (níspero). *Ac:* *Actinidia chinensis* (kiwi).

La base de datos GDR arrojó tres genes posibles dentro del genoma de manzana, sin embargo, se presentaron situaciones anómalas en la estructura de estos genes, como el gen *LCYB1* en el cromosoma 14, el cual presenta 5 exones que codifican una región N-terminal mayor que en cualquier otro gen *LCYB* descrito. Por

otro lado, el gen *LCYB3* ubicado en el cromosoma 15, codificaría una proteína más pequeña o trunca.

Con el fin de esclarecer cuales son los genes *LCYB* en manzana, se procedió a analizar si existía evidencia de expresión de estos genes, y para esto se recurrió a una base de datos de marcadores de secuencia expresada (EST). De este modo se pudo encontrar los marcos abiertos de lectura (ORF) además de las secuencias del ARNm no traducidas (UTR). Los resultados de este análisis y ensamblaje de EST se muestran en la **Tabla VIII**.

El ensamblaje de los EST permitió determinar que el transcrito del gen posible *LCYB1* (de ahora en adelante denominado **MdLCYB1** por *LCYB1* proveniente del organismo *M. domestica*) presenta una longitud menor, que no comprende los exones adicionales predichos por GDR (**Tabla VII**) generando una proteína de un tamaño similar a las descritas previamente en otros modelos vegetales. El transcrito del gen posible *LCYB2* (de ahora en adelante **MdLCYB2**) presenta una longitud de ADNc mayor a la predicha por GDR, pero que no afectaría la longitud de la proteína codificada. Para el gen posible *LCYB3* no se encontró expresión por lo tanto fue descartado. Ambos genes seleccionados presentan proteínas codificadas en un ARNm que posee un solo exón, característica compartida por el resto de los genes *LCYB* descritos.

Tabla VIII. Genes *LCYB* posibles de *M. domestica* identificados por ensamblaje de EST.

Gen	Exones	Transcrito (pb)	ORF (pb)	Proteína (Aa)	Identidad AtLCYB (%)	Máx. identidad (%)
MdLCYB1	1	2016	1515	504	78,7	98 (EjLCYB)
MdLCYB2	1	1713	1491	496	52,4	79 (AcLCYB)

ORF: Marco abierto de lectura. At: *Arabidopsis thaliana*. Ej: *Eriobotrya japonica* (níspero). Ac: *Actinidia chinensis* (kiwi).

Al analizar la secuencia aminoacídica deducida de las enzimas codificadas por los genes seleccionados se observa que, a nivel del extremo N-terminal, existe una baja identidad de secuencia que puede corresponder a un péptido que confiera destinación a algún compartimiento subcelular. Luego del análisis de estas secuencias (**Sección 2.5.1.2.**) se pudo determinar que las proteínas **MdLCYB1** y **MdLCYB2** presentan péptidos de tránsito de 55 y 46 aminoácidos, respectivamente. El análisis indica que este péptido corresponde a una señal de destinación cloroplástica y, por ende, lo más probable es que estas proteínas se destinen a plastidios. Este resultado se condice con el compartimiento subcelular donde actúan las enzimas carotenogénicas.

Como una primera aproximación para determinar la potencial funcionalidad de la enzimas LCYB identificadas en manzana, se realizó un alineamiento de secuencias aminoacídicas con enzimas ya identificadas, ya que las licopeno β -ciclasas se caracterizan por poseer dominios conservados que permiten su función (Cunningham y col., 1996). Los resultados de este alineamiento se muestran en la **Figura 3**. En el alineamiento se puede observar que tanto MdLCYB1 como MdLCYB2 poseen los motivos esenciales propios de todas las LCYB funcionales de plantas descritas hasta el momento. Sin embargo, existen diferencias dentro de estas importantes regiones que pudiesen generar un cambio en la eficiencia de la enzima en su proceso catalítico *in vivo*. Se puede observar que MdLCYB1 presenta una mayor identidad aminoacídica al ser comparada con el resto de las LCYB, mientras que para el caso de MdLCYB2 se puede apreciar que posee una mayor cantidad de diferencias, que la diferencian tanto de las LCYB previamente identificadas como de su supuesto parólogo en *M. domestica*.

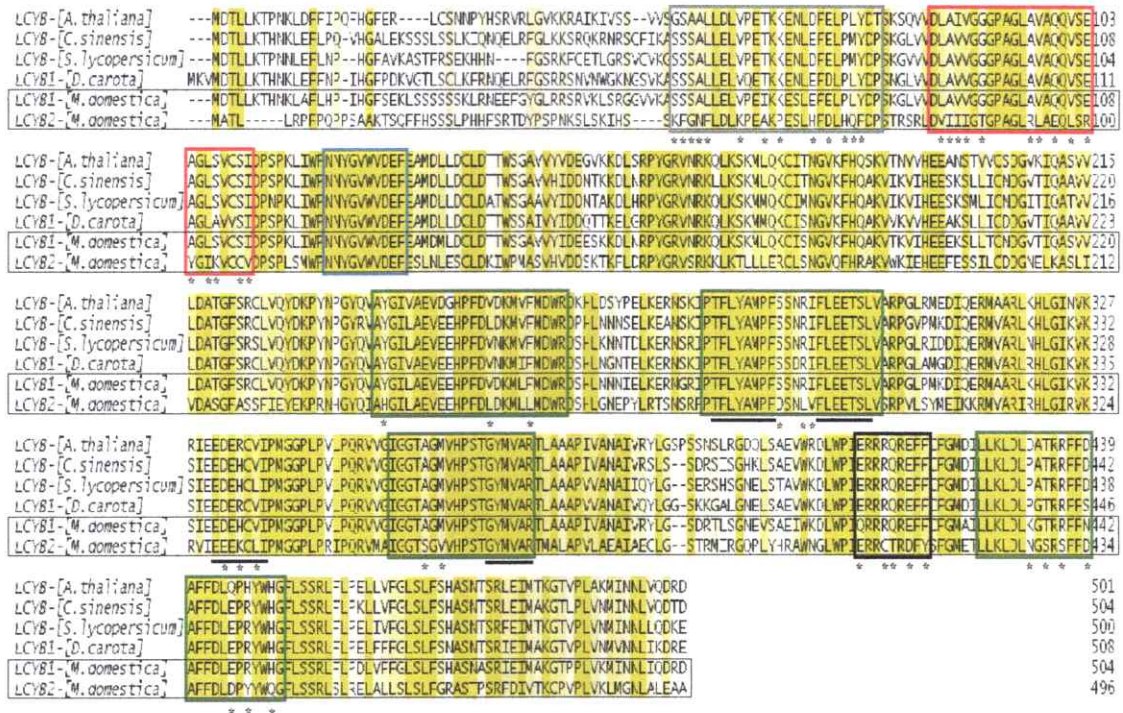


Figura 3. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de enzimas codificadas por genes LCYB. Se muestra el alineamiento entre enzimas MdLCYB y algunos representantes de enzimas LCYB que han sido previamente identificadas y caracterizadas funcionalmente. Los aminoácidos dentro del alineamiento presentan coloración dependiendo de su grado de conservación. Los motivos funcionales que caracterizan a una enzima LCYB se indican como cajas (gris: motivo LCYB conservado en plantas, rojo: dominio de unión a nucleótido, azul: región conservada de ciclasas, verde: motivos y dominios ciclasa, negro: región cargada). Los asteriscos indican las diferencias de aminoácidos dentro de regiones conservadas en las enzimas posibles mientras que las líneas indican secuencias importantes descritas (Cunningham y col., 1996; Alquezar y col., 2009).

Posteriormente, se construyó un árbol filogenético con el fin de aclarar el origen evolutivo de las enzimas posibles de *M. domestica*. Estos resultados que muestran en la **Figura 4.** Dentro del árbol se puede ver la enzima XdPBS, correspondiente a una LCYB bifuncional de la levadura *X. dendrorhous* como grupo externo (color azul). Luego de esto se agrupan las enzimas CRTY bacterianas, es decir, los homólogos de LCYB (color amarillo). Finalmente se encuentra la ramificación donde se puede ver la familia de las LCYB vegetales. El árbol filogenético muestra una clara segregación de LCYB vegetales en dos subfamilias, una específica de cloroplastos (subfamilia 1, color verde) y una de cromoplastos (subfamilia 2, color anaranjado). Las enzimas posibles

de manzana se encuentran agrupadas en ramas distintas del árbol filogenético. La enzima MdLCYB1 se encuentra agrupada dentro de la subfamilia de LCYB cloroplásticas y, por su parte, la enzima MdLCYB2 se agrupa dentro de la subfamilia de LCYB cromoplásticas.

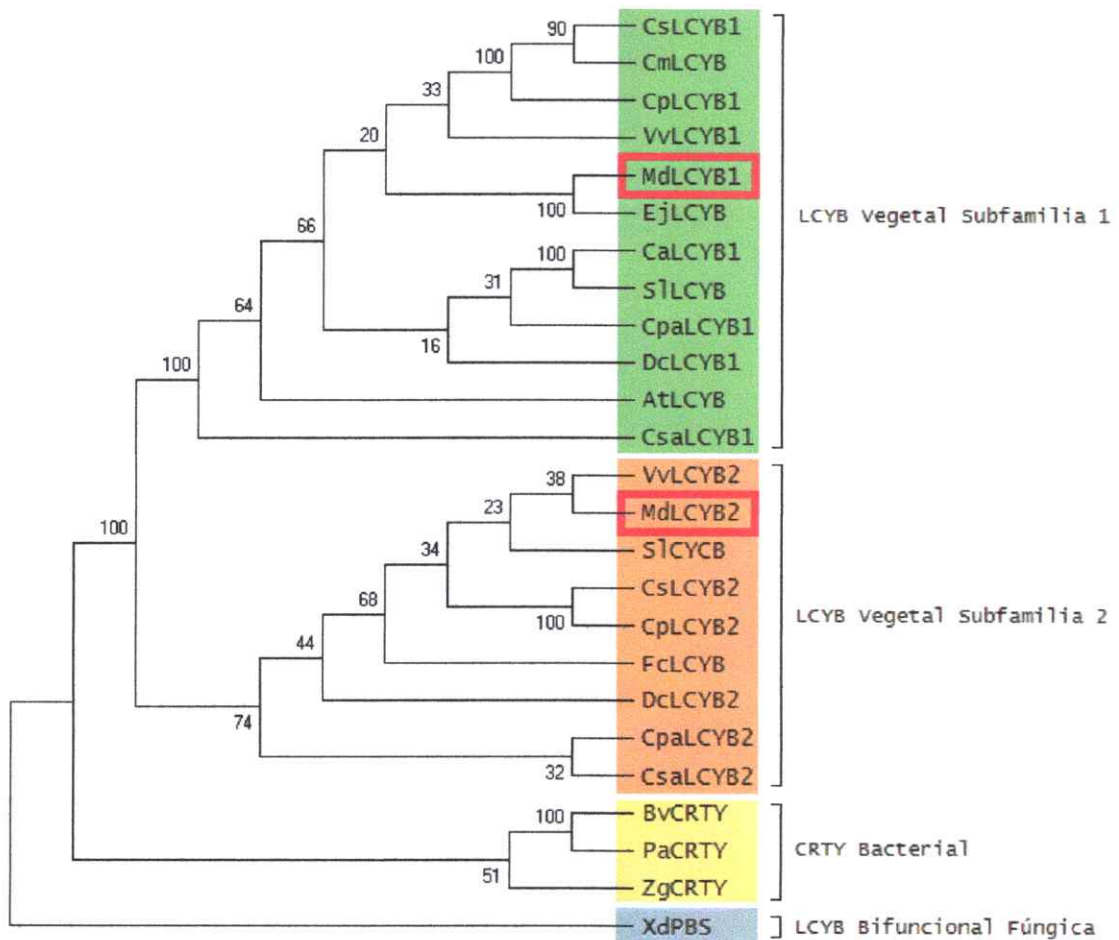


Figura 4. Análisis filogenético de las enzimas LCYB posibles de *M. domestica*. Se muestra el árbol filogenético construido a partir del alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los genes MdLCYB1 y MdLCYB2 con enzimas previamente descritas. Las ramificaciones de origen similar dentro del árbol se encuentran coloreadas. Las proteínas de *M. domestica* propias de este estudio se encuentran destacadas con un rectángulo rojo. Para la construcción del árbol se utilizó el método de Neighbor Joining (Bootstrap = 1000).

3.2. Expresión de genes *LCYB* en tejidos de *M. domestica*.

La expresión de los genes *MdLCYB1* y *MdLCYB2* se analizó con ADNc obtenido de tejido de hojas maduras e hipanto de frutos de *M. domestica*. Como primer paso se amplificó, mediante RT-PCR, un fragmento del gen de actina de *M. domestica*, para verificar la calidad y homogeneidad del ADNc (Sección 2.5.4.). En la Figura 5 se puede apreciar una banda de 156 pb para todas las muestras analizadas, tanto de hoja como fruto. Además, no existe contaminación por ADN genómico, lo que se aprecia por la ausencia de bandas en los controles negativos (-) que corresponde a la muestra de ARN tratada con DNAsa. Se ilustra el éxito en la amplificación del ADNc de los genes *MdLCYB1* y *MdLCYB2* y la comparación entre la expresión en hojas y frutos. Se pueden observar bandas similares al tamaño esperado de los fragmentos de amplificación para *MdLCYB1* y *MdLCYB2*, de 1674 y 1643 pb, respectivamente.

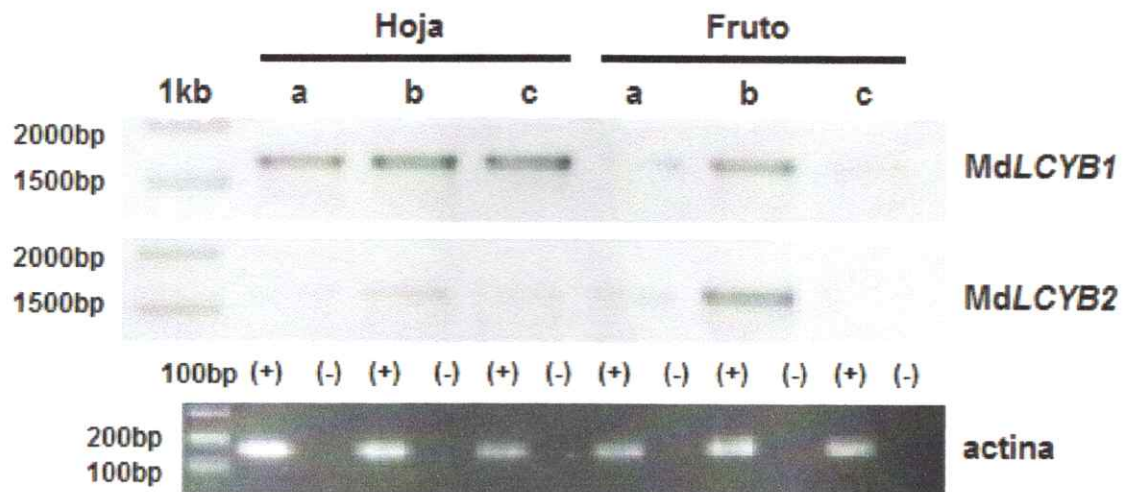


Figura 5. Expresión de transcritos de los genes *LCYB* en hojas y frutos de *M. domestica*. Amplificación de un fragmento de ADNc del transcrito de los genes carotenogénicos *MdLCYB1* y *MdLCYB2* en frutos y hojas. Se analizaron tres muestras para hoja y tres para fruto de manzana. (-): Muestra de ARN tratada con DNAsa. Se muestran bandas correspondientes a 1674 pb para *MdLCYB1*, 1643 pb para *MdLCYB2* y 156 pb para actina. 1kb: Marcador de peso molecular. 100bp: Marcador de peso molecular.

Mediante PCR en tiempo real se pudo identificar que existe expresión diferencial para ambos genes en tejidos de fruto y hoja (Cerdea A., trabajo en curso). Se logró concluir que el gen *MdLCYB1* se expresa preferentemente en hojas de manzano, mientras que *MdLCYB2*, preferentemente en frutos (Figura 6), resultado que se condice con el árbol filogenético.

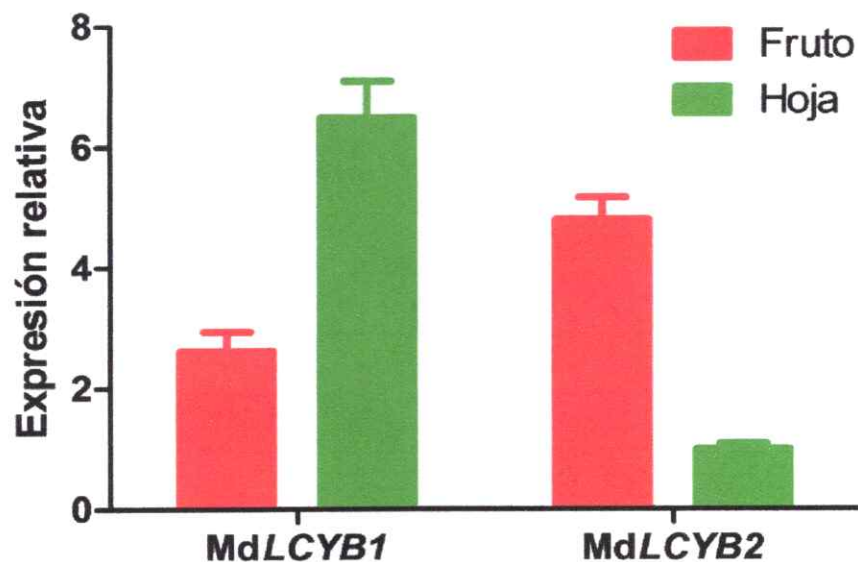


Figura 6. Expresión relativa de genes *LCYB* en tejidos de *M. domestica*. Se muestran los niveles de expresión relativa de los mensajeros de los genes *LCYB* identificados, en hipanto de frutos y hojas maduras (Modificado de Cerdea A., trabajo en curso). Como gen normalizador se utilizó actina y la expresión fue calibrada respecto a *MdLCYB2* en hoja, ajustando el valor a 1.

3.3. Clonación de genes *LCYB* en el vector de entrada pCR8.

El ADNc obtenido del tejido de fruto de manzana fue utilizado para la amplificación de las secuencias codificantes de los genes *LCYB* con el fin de clonarlos en el vector de entrada pCR8. Para ello, se amplificaron estos fragmentos con la enzima *Pfu* ADN polimerasa y se siguió el protocolo descrito anteriormente (Sección 2.5.10.1.).

Las células quimio-competentes de *E. coli* DH5 α fueron transformadas con el producto de ligación en el vector pCR8. Se realizó un PCR a partir de las colonias crecidas en las placas con selección al antibiótico espectinomicina para comprobar la ligación de los fragmentos de ambos genes carotenogénicos. Los resultados de este procedimiento se muestran en la **Figura 7**.

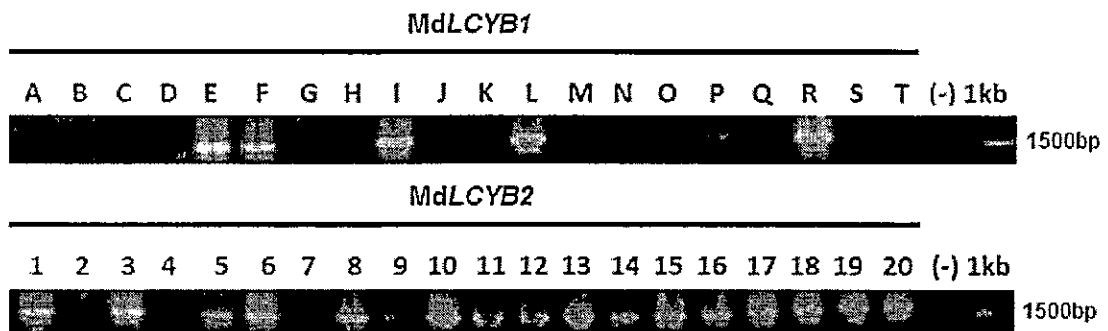


Figura 7. PCR de colonias de *E. coli* transformadas con productos de ligación pCR8-MdLCYB1 y pCR8-MdLCYB2. A partir de veinte colonias bacterianas para cada gen *LCYB*, se amplificó la secuencia codificante completa de MdLCYB1 y MdLCYB2. (-): Control negativo sin molde. Se muestran bandas correspondientes a 1674 pb para MdLCYB1 y 1643 pb para MdLCYB2. 1kb: Marcador de peso molecular.

Para ambos genes se seleccionaron 5 clones positivos, los que fueron cultivados en medio LB líquido durante 16 h y se realizó extracción de ADN plasmidial. Los vectores extraídos fueron nuevamente comprobados mediante PCR de los fragmentos de interés con el fin de descartar falsos positivos de la reacción anterior (**Figura 8**).

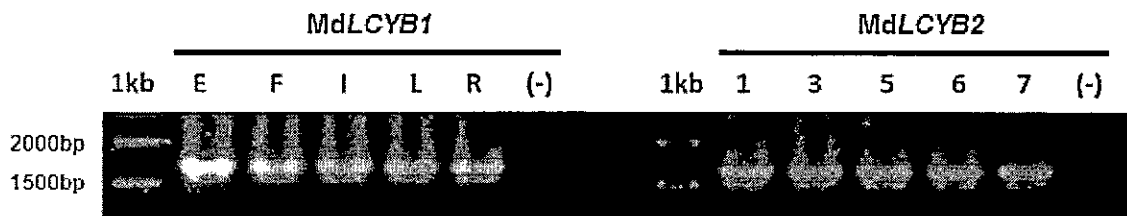


Figura 8. PCR a partir de clones positivos para ligación pCR8-MdLCYB1 y pCR8-MdLCYB2. Amplificación a partir de DNAP de clones positivos para ligación de las secuencias codificantes de MdLCYB1 y MdLCYB2 en el vector de entrada pCR8 que fueron seleccionados y purificados por Miniprep. (-): Control negativo sin molde. Se muestran bandas correspondientes a 1674 pb para MdLCYB1 y de 1643 pb para MdLCYB2. 1kb: Marcador de peso molecular.

Posteriormente, se realizó una digestión enzimática para comprobar la presencia del fragmento de interés. El vector pCR8 posee un sitio de corte para la enzima de restricción *XhoI* y dos para la enzima *EcoRI*, sitios que, según la predicción de secuencia, no se repite dentro de los fragmentos de las secuencias codificantes de los genes MdLCYB (Figura 9A). La digestión con *XhoI* indica el tamaño de los vectores linealizados (4491 y 4460 pb para MdLCYB1 y MdLCYB2, (Figura 9B). Al digerirse con *EcoRI* se producen dos fragmentos: uno de 2799 pb que contiene casi la totalidad del vector pCR8 (2817 pb) y uno que corresponde a los fragmentos clonados más 18 pb del vector, es decir, 1692 y 1661 pb para MdLCYB1 y MdLCYB2, respectivamente (Figura 9B). Los vectores positivos fueron seleccionados para secuenciación, obteniéndose la secuencia predicha por EST y GDR (Datos No Mostrados).

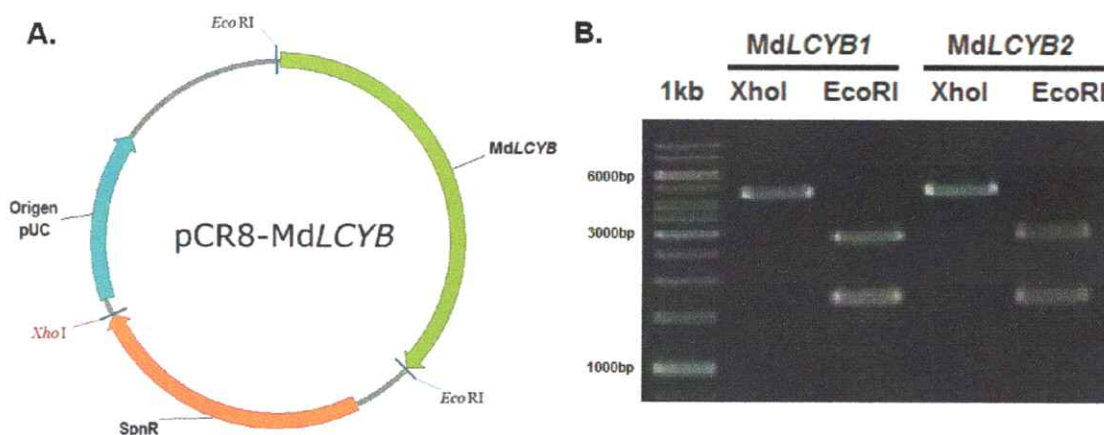


Figura 9. Digestión enzimática de las construcciones pCR8-MdLCYB. (A) Diagrama de los vectores pCR8-MdLCYB, donde se indica el OriC, el gen de interés, el gen de resistencia a espectinomicina y los sitios de corte para *XhoI* y para *EcoRI*; todas en segmentos fuera de los fragmentos clonados. (B) Digestión de construcciones pCR8-MdLCYB1 y pCR8-MdLCYB2 con *XhoI* y *EcoRI*. Para *XhoI* se muestran bandas de 4491 o 4460 pb para MdLCYB1 o MdLCYB2. Para *EcoRI* se muestran dos bandas, una de 2799 pb y otra de 1692 o 1661 pb para MdLCYB1 o MdLCYB2. 1kb: Marcador de peso molecular.

3.4. Clonación de genes *LCYB* en el vector de expresión pETBlue1.

Una vez verificadas por secuenciación, las construcciones pCR8-Md*LCYB*1 y pCR8-Md*LCYB*2 obtenidas fueron utilizadas como molde para la amplificación de las secuencias de interés por PCR con la enzima *Pfu* ADN polimerasa para luego ser purificados y clonados en el vector de expresión pETBlue1 (Sección 2.5.10.2.).

Los productos de la ligación fueron transformados en células quimio-competentes *E. coli* DH5 α , las cuales fueron sembradas en medio LB sólido suplementado con el antibiótico ampicilina (Sección 2.5.12.2.). Ya que el vector pETBlue1 posee el gen *lacZ* que se ve interrumpido al momento de integrar una secuencia, se seleccionaron las colonias blancas resultantes, al adicionar el compuesto X-Gal al medio de cultivo. A continuación se realizó un PCR para las secuencias Md*LCYB* a partir de las colonias seleccionadas para ambos genes. El gel con los resultados de este PCR se muestra en la Figura 10.

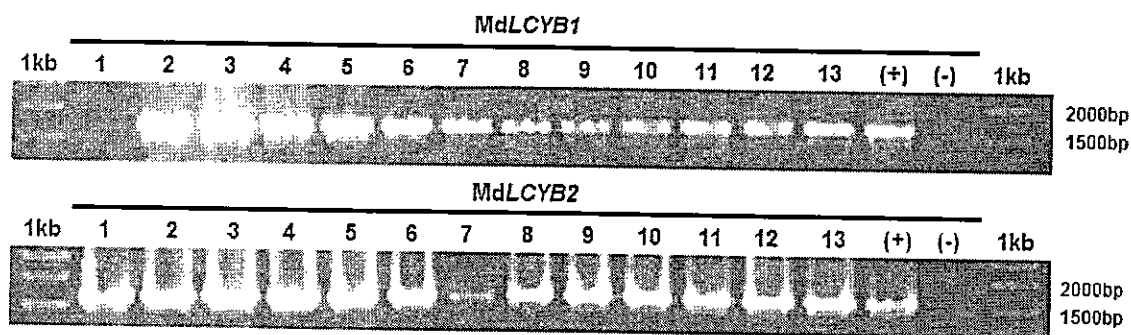


Figura 10. PCR de colonias de *E. coli* transformadas con productos de ligación pETBlue1-Md*LCYB*1 y pETBlue1-Md*LCYB*2. Amplificación de las secuencias codificantes de Md*LCYB*1 y Md*LCYB*2 en el vector de expresión pETBlue1. Análisis de trece colonias bacterianas blancas para cada gen *LCYB*. (+): Control positivo con pCR8-Md*LCYB* como molde. (-): Control negativo sin molde. Se muestran bandas correspondientes a 1674 pb para Md*LCYB*1 y 1643 pb para Md*LCYB*2. 1kb: Marcador de peso molecular.

Para comprobar la orientación de los fragmentos clonados en los vectores de los clones positivos, respecto al promotor T7, se realizó un PCR direccionado. Como partidor directo se utilizó el oligo **T7 promotor (Sección 2.4.)** que se une al promotor T7 y como partidor reverso se utilizó el partidor que hibrida en la región 3' del inserto (partidor inverso) o el partidor que hibrida en la región 5' (partidor directo) en cada uno de los fragmentos clonados. Si los fragmentos *MdLCYB1* o *MdLCYB2* se encuentran en sentido respecto al promotor T7, se obtiene un producto de 1952 o 1921 pb, utilizando los oligos **LCYB1R** o **LCYB2R**, respectivamente (**Sección 2.4.**). De encontrarse en antisentido los fragmentos *MdLCYB1* o *MdLCYB2* respecto al promotor T7, se generan productos de amplificación de exactamente los mismos tamaños, pero utilizando los partidores **LCYB1F1** o **LCYB2F**, respectivamente (**Sección 2.4.**). Si los fragmentos se encuentran en sentido no debe existir amplificación al realizar el PCR con los partidores que detectan los clones antisentido. En la **Figura 11** se muestran cuatro clones positivos para el PCR direccionado para cada gen.

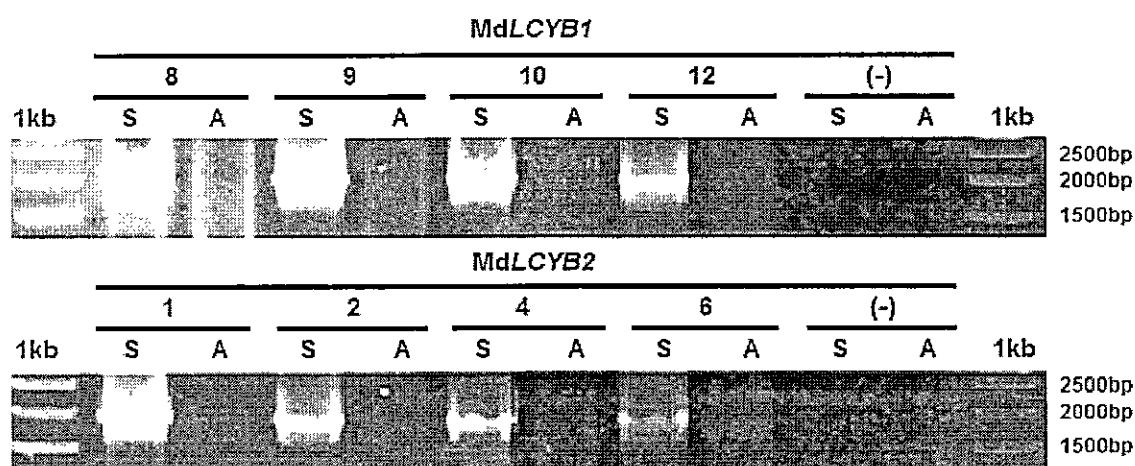


Figura 11. PCR direccionado de las construcciones pETBlue1-MdLCYB1 y pETBlue1-MdLCYB2. Comprobación de la dirección de inserción de las secuencias *MdLCYB* dentro del vector pETBlue1. Se muestran cuatro clones para cada uno de los genes. S: Gen en posición correcta en sentido (amplificación con partidores T7 y LCYBR, inverso). A: Gen posición incorrecta en antisentido (amplificación con partidores T7 y LCYBF, directo). Se muestran bandas correspondientes a 1952 y 1921 pb para *MdLCYB1* y *MdLCYB2*, respectivamente. 1kb: Marcador de peso molecular.

A continuación se realizó una digestión enzimática para corroborar los resultados obtenidos anteriormente de presencia y orientación de los fragmentos de interés y de este modo asegurar que la transcripción de los genes *MdLCYB* pueden ser inducidos por el promotor T7. Según el análisis de la secuencia predicha para la construcción pETBlue1-*MdLCYB1*, este vector presenta un sitio de corte para la enzima *XbaI* dentro de la región promotora del fago T7, además de un sitio de corte para la enzima *NcoI* dentro del fragmento clonado del gen *MdLCYB1* (Figura 12A). Al realizar una doble digestión con los cuatro clones seleccionados se obtuvieron los fragmentos predichos para una orientación en sentido, de 4438 y 712 pb, como se puede apreciar en el gel de la Figura 12B.

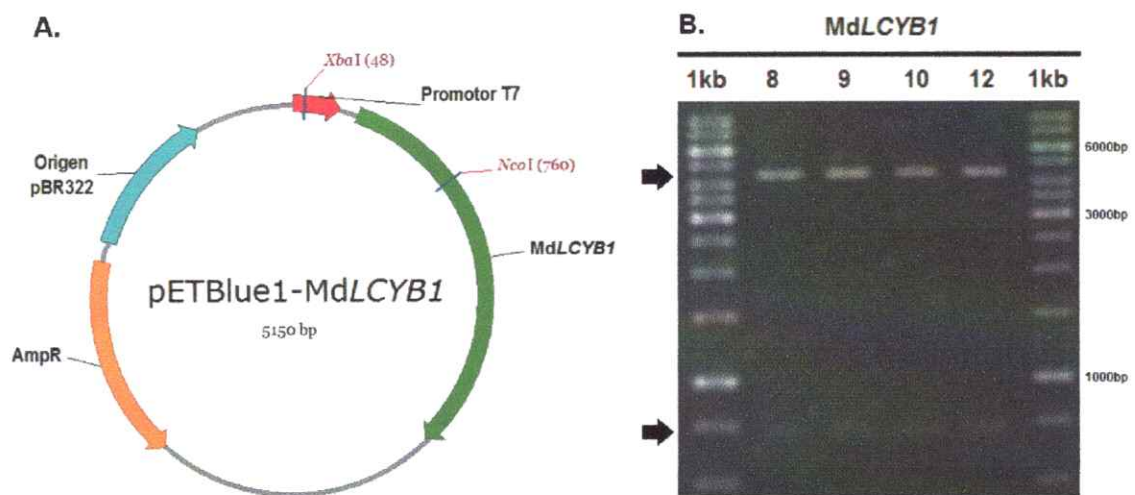


Figura 12. Digestión enzimática de las construcciones pETBlue1-*MdLCYB1*. (A) Diagrama del vector pETBlue1-*MdLCYB1* indicando el gen de resistencia a ampicilina propia del vector, gen de interés, oripBR322, además de los sitios de corte para *XbaI* y *NcoI*. (B) Gel de digestión enzimática doble con endonucleasas de restricción *XbaI* y *NcoI* de las construcciones pETBlue1-*MdLCYB1* seleccionadas. Se muestran bandas correspondientes a 4438 y 712 pb. 1kb: Marcador de peso molecular.

Para el caso de pETBlue1-*MdLCYB2*, también se corroboró la direccionalidad del fragmento de interés en sentido respecto del promotor T7 al digerir con *AvaI*, sitio de restricción ubicado al comienzo del fragmento del gen *MdLCYB2* y otro, luego del fin de

éste (Figura 13A). Al realizar una digestión con esta enzima en los cuatro vectores seleccionados se obtienen fragmentos de 3666 y 1453 pb, observándose este patrón en todos los vectores (Figura 13B).

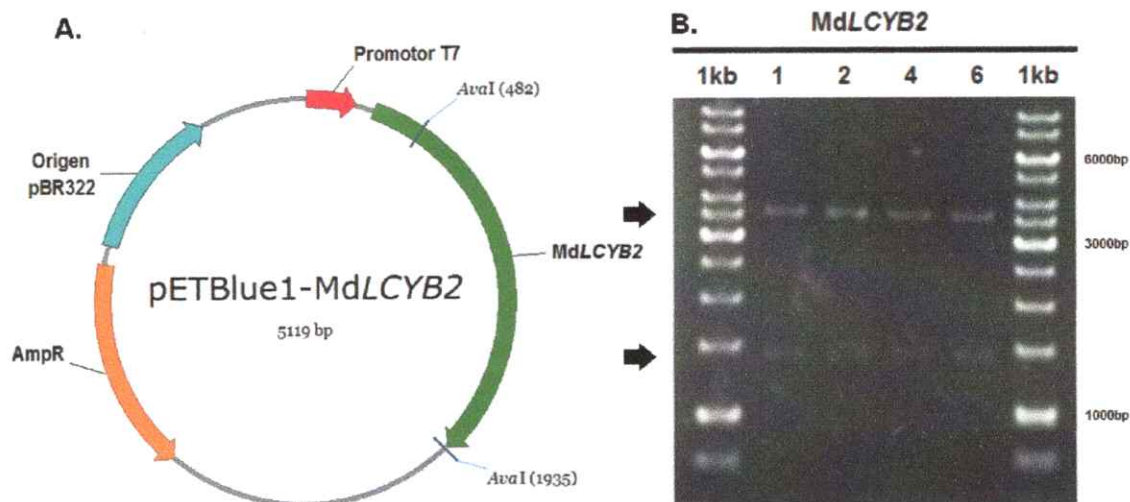


Figura 13. Digestión enzimática de las construcciones pETBlue1-MdLCYB2. (A) Diagrama del vector pETBlue1-MdLCYB2. Las construcciones pETBlue1-MdLCYB2 presentan la resistencia a ampicilina propia del vector, además de dos sitios de corte para la enzima *Ava*I. (B) Gel de digestión enzimática con endonucleasa de restricción *Ava*I de las construcciones pETBlue1-MdLCYB2 seleccionadas. Se muestran bandas correspondientes a 3666 y 1453 pb. 1kb: Marcador de peso molecular.

3.5. Complementación heteróloga con genes *MdLCYB*.

Para evaluar la funcionalidad de los genes, se utilizó la cepa bacteriana *E. coli* BL21 transformada con el vector pDS1B $\Delta crtY$, que presenta un fenotipo de color rojo por la acumulación de licopeno, como sujeto para la cotransformación con las construcciones pETBlue1-MdLCYB1 y pETBlue1-MdLCYB2 (Sección 2.5.12.). Se realizó un PCR de colonias para las colonias obtenidas de la transformación con las construcciones tanto para *MdLCYB1* como *MdLCYB2*. En la Figura 14 se observa que todas las colonias seleccionadas cuentan con las construcciones.

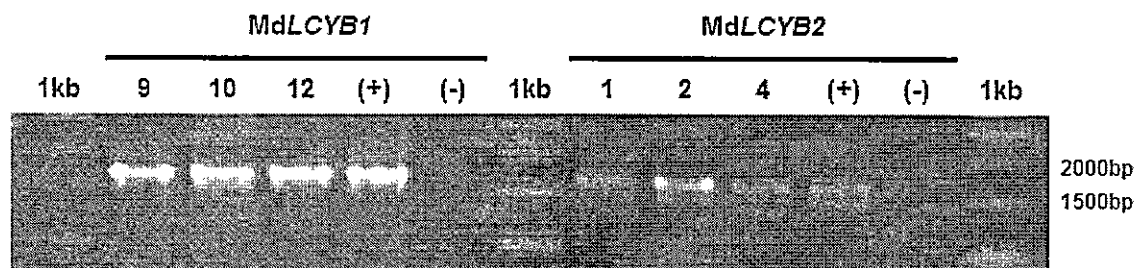


Figura 14. PCR de colonias de *E. coli* cepa BL21 pDS1B $\Delta crtY$ transformadas con construcciones pETBlue1-MdLCYB1 y pETBlue1-MdLCYB2. Se muestra la amplificación de la región codificante de MdLCYB1 y MdLCYB2 a partir de 3 colonias positivas para cada construcción. (+): Control positivo con pCR8-MdLCYB como molde. (-): Control negativo sin molde. Se muestran bandas correspondientes a 1674 pb para MdLCYB1 y 1643 pb para MdLCYB2. 1kb: Marcador de peso molecular.

Luego de secuenciar 3 clones positivos para las construcciones pETBlue1-MdLCYB1 y pETBlue1-MdLCYB2 se determinó que no existen mutaciones puntuales entre los distintos vectores, y que las secuencias se condicen un 100% con las clonadas en primera instancia en el vector de entrada pCR8. Es por esto que se seleccionó únicamente un clon representativo para cada construcción para los análisis siguientes.

Una vez obtenidas las colonias pDS1B cotransformadas con el vector pDS1B $\Delta crtY$ y con los vectores pETBlue1-MdLCYB, y cultivadas en las condiciones adecuadas (Sección 2.5.13.) se corroboró la efectiva transcripción de los genes MdLCYB realizando una extracción de ARN total a partir de los cultivos bacterianos (Sección 2.5.2.2.). Se generó el ADNc y se realizó una reacción de PCR utilizando partidores específicos para las secuencias de los genes MdLCYB1 y MdLCYB2 (Sección 2.4.). En la Figura 15 se muestra que existe amplificación del transcrito para ambos genes, sin observarse banda en los controles de ARN tratados con DNasa I que no fueron sometidos a transcripción reversa. Por lo tanto, se puede inferir que existe transcripción de estos genes en este sistema bacteriano.

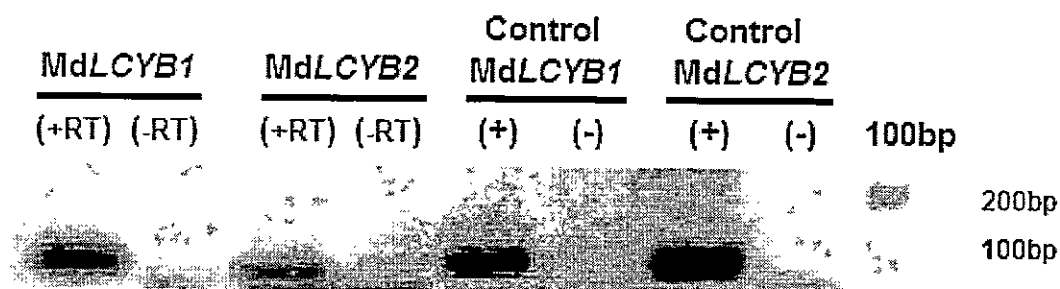


Figura 15. Expresión de genes *MdLCYB1* y *MdLCYB2* en cultivos de *E. coli* BL21 pDS1B Δ *crtY* transformadas con las construcciones pETBlue1-MdLCYB. Amplificación de fragmentos de ADNc de transcritos de genes *MdLCYB1* y *MdLCYB2* en el sistema bacteriano con inducción por IPTG. (+RT): Muestra de ADNc. (-RT): Muestra de ARN tratada con DNAsa no sometida a transcripción reversa. (+): Control positivo con ADNp del vector pETBlue1-MdLCYB purificado como molde. (-): Control negativo sin molde. Se muestran bandas correspondientes a 116 pb (*MdLCYB1* y Control *MdLCYB1*) y 110 pb (*MdLCYB2* y Control *MdLCYB2*). 100bp: Marcador de peso molecular.

Una vez confirmada la transcripción de los genes de interés se procedió a analizar los fenotipos que se apreciaban en cada una de las transformaciones para cada uno de los genes *MdLCYB* y como se correlacionaba con los controles. Como control positivo se utilizó la cepa de *E. coli* BL21 transformada con el vector pDS1B, portador de la ruta completa e íntegra de biosíntesis de β -caroteno, proveniente de la bacteria *E. uredoavora*, presentando una acumulación de este compuesto, evidenciado por la coloración amarillenta de esta cepa. Como control negativo se utilizó la cepa de *E. coli* BL21 pDS1B Δ *crtY*. Al observar el precipitado de células crecidas en medio líquido se puede apreciar claramente el fenotipo de cada una de las cepas estudiadas. El control positivo (pDS1B) presenta la coloración amarillenta característica esperada para la acumulación de β -caroteno. El control negativo (Δ CRTY) presenta su fenotipo rojizo característico por la acumulación de licopeno. El control de transformación (pETBlue1) presenta el fenotipo rojizo esperado para la acumulación de licopeno, debido a que no existe presencia de una enzima LCYB codificada en el vector sin inserto. Para la muestra transformada con la construcción pETBlue1-MdLCYB1 (*MdLCYB1*) se observa un fenotipo amarillento que se asemeja al control positivo,

suponiéndose acumulación de β -caroteno. Para la muestra transformada con pETBlue1-MdLCYB2 (MdLCYB2), sin embargo, se observa un fenotipo rojizo, similar al presentado por el control negativo y de transformación, presumiéndose acumulación del pigmento licopeno (Figura 16).

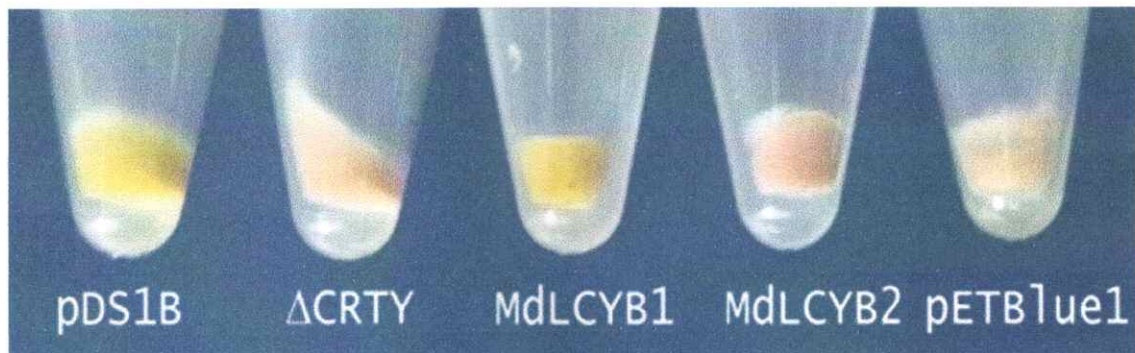


Figura 16. Fenotipo de cepas de *E. coli* acumuladoras de pigmentos carotenoides. Coloración del precipitado de las cepas de *E. coli* con la ruta de síntesis de carotenoides. pDS1B: Control positivo. Δ CRTY: Control negativo. MdLCYB1: Cotransformación de Δ CRTY con el vector pETBlue1-MdLCYB1. MdLCYB2: Cotransformación de Δ CRTY con el vector pETBlue1-MdLCYB2. pETBlue1: Control de transformación con el vector pETBlue1 sin inserto.

3.6. Cuantificación de carotenoides a partir de cepas de *E. coli* acumuladoras de pigmentos.

Se realizó la extracción de pigmentos a partir de los cultivos líquidos de las cepas bacterianas según los métodos descritos (Sección 2.5.14.3.) y se realizó una medición por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) a 474 nm, longitud de onda a la que absorben todos los pigmentos carotenoides (Sección 2.5.14.4.).

Se obtuvieron cromatogramas con picos que según tiempos de retención y espectros de absorción corresponden a licopeno y β -caroteno (Figura 17). Se puede observar para el control positivo (pDS1B) un único pico con un tiempo de retención aproximadamente a los 34 min, el cual corresponde a β -caroteno. Para el control

negativo (Δ CRTY) se observa también un único pico, pero a un tiempo de retención en la columna de aproximadamente 19 min, el cual corresponde a licopeno. Este fenotipo se repitió para la cepa utilizada como control de transformación (pETBlue1) transformada con el vector de expresión pETBlue1 vacío, demostrando que este vector por sí solo no genera ningún producto que catalice la formación de β -caroteno.

Al analizar el cromatograma de la cepa transformada con la construcción pETBlue1-MdLCYB1 se aprecia un pico con un tiempo de retención que se condice con el compuesto licopeno presente en el control negativo, por lo que se puede decir que en esta cepa existe acumulación de este compuesto. Sin embargo, a un tiempo mayor, se observa un pico de mayor tamaño a un tiempo de retención consistente con el compuesto β -caroteno presente en el control positivo, indicando que el fenotipo amarillento que presenta esta cepa se debe a la acumulación de este carotenoide.

El cromatograma de la cepa transformada con la construcción pETBlue1-MdLCYB2 presenta un único pico a un tiempo de retención consistente al pigmento licopeno presente en el control negativo (Δ CRTY) y el control de transformación (pETBlue1), lo que indica que esta cepa acumula este pigmento explicando el fenotipo rojizo observado e indicando que esta cepa no sintetiza el compuesto β -caroteno.

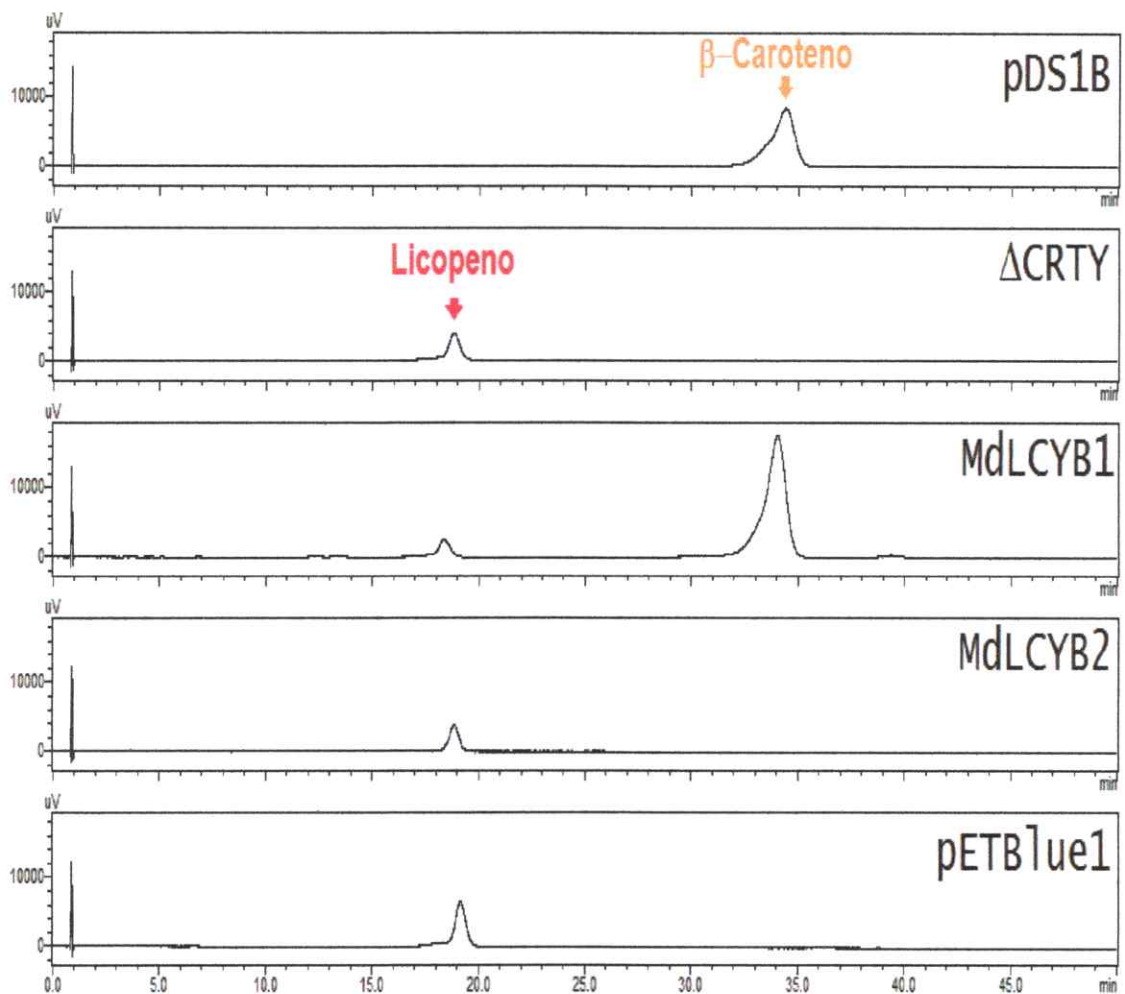


Figura 17. Cromatogramas de carotenoides en cepas de *E. coli* acumuladoras de pigmentos. Medición por RP-HPLC a una longitud de onda 474 nm de extracción de pigmentos a partir de cultivos líquidos. Se realizó extracción de 3 cultivos para cada construcción. Se muestran picos de licopeno y β -caroteno. Eje X: Tiempo de retención (min). Eje Y: Unidades de absorbancia (μ V).

Posteriormente, se tomaron los valores arrojados por estas cromatografías y se realizó una cuantificación del área bajo la curva para los distintos picos de cada muestra. Estos valores fueron relativizados normalizados para los pesos secos de los cultivos previos a la extracción de pigmentos (Sección 2.5.14.2.) para luego calcular la cantidad utilizando ecuaciones previamente descritas (Lichtenthaler y Buschmann, 2001). Los resultados de la cuantificación se muestran en la **Figura 18**.

Se puede apreciar, en primera instancia, la cantidad relativa de los pigmentos acumulados por las cepas utilizadas como controles: β -caroteno para el control positivo (pDS1B) y licopeno para el control negativo (Δ CRTY).

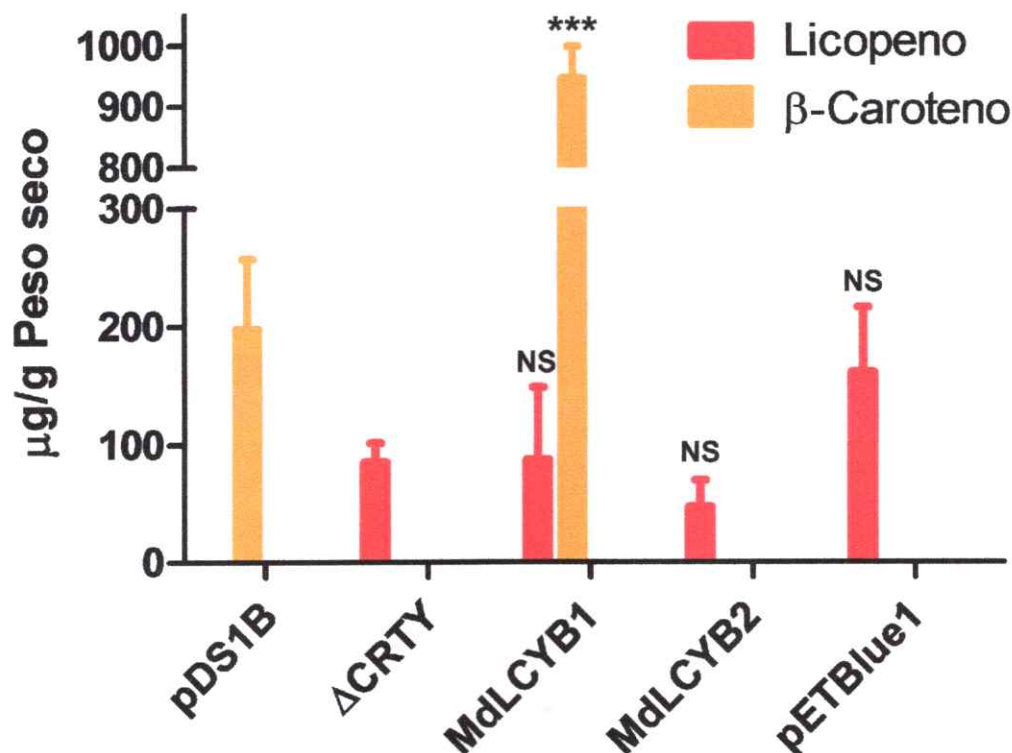


Figura 18. Niveles de carotenoides en cepas de *E. coli* acumuladoras de pigmentos. La cuantificación fue realizada por medición en RP-HPLC a 474 nm de extracción de pigmentos a partir de cultivos líquidos. Se realizó la extracción de 3 cultivos para cada construcción. Los valores fueron normalizados por peso seco y relativizados al control negativo (Δ CRTY). El análisis estadístico fue realizado respecto a control positivo (pDS1B) o negativo (Δ CRTY). ***: Diferencia significativa ($p < 0,001$). NS: Diferencia no significativa.

Es posible corroborar que la presencia del vector de expresión vacío pETBlue1 en la cepa utilizada como control de transformación, no afecta la composición ni los niveles de carotenoides producidos para la cepa pDS1B Δ crtY, al no existir una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de licopeno al compararlos con el control negativo Δ CRTY.

Para la cepa transformada con la construcción pETBlue1-MdLCYB1, se puede observar que la cantidad relativa de licopeno con respecto al control negativo Δ CRTY no es estadísticamente diferente. Sin embargo, la cantidad relativa obtenida del β -caroteno acumulado por esta cepa presenta una diferencia significativa con respecto al control positivo pDS1B. Por lo tanto, existe una mayor producción de β -caroteno a pesar de no existir una conversión completa de licopeno a β -caroteno.

Para la cepa transformada con la construcción pETBlue1-MdLCYB2, se puede apreciar que la cantidad relativa de licopeno acumulada no presenta una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo Δ CRTY. Esto quiere decir que la presencia de la enzima posible no genera cambios en la composición o niveles de carotenoides.

De los resultados anteriores se puede determinar que el gen MdLCYB1 fue capaz de revertir parcialmente el fenotipo de la cepa mutada, restituyendo la ruta de síntesis de β -caroteno, por lo que se infiere que codifica una enzima licopeno β -ciclase funcional. Por otra parte, no se encontró β -caroteno en la cepa transformada con el gen MdLCYB2, por ende no se restituyó la ruta carotenogénica, lo que pudiera indicar que en este gen no codifica una enzima licopeno β -ciclase funcional en *E. coli*.

4. DISCUSION

4.1. Selección y obtención de secuencias codificantes de genes *MdLCYB* mediante análisis *in silico* y RT-PCR.

Dada la reciente secuenciación del genoma de *M. domestica*, es factible acceder a la identificación de genes de interés. Sin embargo, debido a que esta secuenciación corresponde a un primer borrador para el conocimiento del genoma de *M. domestica*, puede esperarse un ensamblaje erróneo de secuencias de algunos cóntigos y por ende una mala predicción de la estructura de genes que codifican las proteínas de este organismo. Para el caso particular de los genes *LCYB*, objetos de este estudio, se encontraron patrones extraños en la predicción génica. En particular, el gen posible *LCYB1*, ubicado en el cromosoma 14 del genoma de *M. domestica*, presentaba una distribución de exones que no había sido descrita previamente en genes de la familia licopeno β -ciclase, por lo cual se procedió a buscar en secuencias de expresión (EST). Utilizando la secuencia del gen posible se descartó la predicción de los exones extra arrojados por la base de datos GDR y se obtuvo un gen posible que se condice con los genes descritos previamente en otras especies vegetales. Si bien la predicción de los genes exhibió discordancia con respecto a los EST de estudios previos, las secuencias codificantes presentes en estos genes si coincidieron con los fragmentos aislados a partir del ADNc de *M. domestica*, luego de ser clonados y secuenciados por separado. Además, al existir concordancia entre los fragmentos obtenidos a partir del ARN total y la secuenciación del genoma, se corrobora la predicción de que *MdLCYB1* y *MdLCYB2* efectivamente se expresan *in vivo*, tanto en el fruto como en las hojas de *M. domestica*.

La obtención de una buena cantidad y calidad de ARN total es un prerrequisito para la generación de ADNc y la posterior evaluación de expresión génica o purificación de secuencias. Sin embargo, la extracción de ARN desde tejido vegetal puede ser engorrosa. En particular, al realizar la extracción de fruto de manzana, el principal problema se debe a la contaminación del ARN con compuestos fenólicos y polisacáridos (Newbury y Possingham, 1977). Existen reactivos comerciales, como el TRIzol® (Life Technologies), utilizados para la extracción de ARN total de tejido de plantas, no obstante, en este caso no proporcionaron suficiente cantidad y calidad de ARN total de manzana. El protocolo utilizado en este seminario de título fue diseñado específicamente para la extracción de ARN a partir de pulpa de frutos de *M. domestica*, pero puede ser utilizado para cualquier tejido con altos niveles de polisacáridos y compuestos fenólicos, siendo también evaluado para la extracción a partir de hojas maduras. Este protocolo es una modificación de un método de extracción de ARN total descrito para *Prunus persica* (Meisel y col., 2005).

Se evaluó, en primera instancia, la expresión de los genes *MdLCYB* en tejido de la pulpa madura del fruto de manzana (hipanto) y hojas maduras. La razón de esto es que la mayoría de los cultivares comerciales de manzana poseen una pulpa característicamente blanca, con escasa o sin pigmentación. En la madurez los carotenoides y la clorofila se encuentran restringidos a células de la piel. Los plastidios se encuentran presentes en el hipanto blanco, pero carecen de acumulación de carotenoides (Ampomah-Dwamena y col., 2012) y en aquellos hipantos de color amarillo claro existe una leve acumulación de estos pigmentos. Debido a que estamos interesados en aumentar el contenido de carotenoides en la pulpa y en determinar cuál es la causa de la falta de acumulación de carotenoides en esta región, se evaluó la

expresión de estos genes de interés en pulpa. Se evaluó la presencia de estos transcritos en tejido de hojas maduras, como control, debido a que es en los cloroplastos del tejido fotosintético donde los carotenoides cumplen su función principal en plantas (Ritz y col., 2000; Koyama y col., 2004; Bode y col., 2009) y, por lo tanto, los genes deben ser expresados.

4.2. MdLCYB1 y MdLCYB2 en *M. domestica*.

M. domestica posee 17 pares de cromosomas, un número mayor al observado en otras plantas superiores. Este hecho se debe a que a través de la evolución, el antepasado de este organismo sufrió una serie de duplicaciones en varios cromosomas (Velasco y col., 2010), evento que pudiese explicar tanto la cantidad de repeticiones de genes carotenogénicos completos, como la presencia de pseudo-genes y secuencias codificantes trunca encontradas al realizar el análisis *in silico* utilizando la base de datos GDR. Al realizar un primer BLAST sobre el genoma se encontraron 4 resultados que presentaron identidad con enzimas licopeno β -ciclase, de las cuales 2 mostraron expresión al analizarlos con las bases de datos de EST. El tercer gen, *LCYB3* codificado en el cromosoma 15, fue descartado por no presentar expresión al ser analizado mediante este método, además de codificar una proteína trunca. El cuarto gen posible se encontró en el cromosoma 12, presentando una identidad de casi el 90% con *LCYB1*, pero presentando una mutación delecional que genera un cambio de marco de lectura y codificando un producto génico menor a 30 aminoácidos; gen para el cual no se encontró expresión, por lo que fue descartado inmediatamente (**Datos No Mostrados**).

La enzima MdLCYB1 presenta una identidad aminoacídica mayor que MdLCYB2 con respecto a la enzima LCYB de *A. thaliana*, con aproximadamente un 79% y un 52% de identidad, respectivamente. Las diferencias de aminoácidos en MdLCYB2 se presentan incluso dentro de los motivos conservados de la secuencia de las proteínas previamente descritas, mientras que MdLCYB1 casi no presenta diferencias dentro de estos motivos (**Figura 3**). Principalmente, MdLCYB2 presenta diferencias dentro de la región conservada en las LCYB vegetales, región importante para la funcionalidad de la enzima y asociación a membrana (Beyer y col., 1991; Hugueney y col., 1995). Otras zonas importantes donde se observan cambios considerables en residuos aminoacídicos en MdLCYB2, son el sitio de unión a dinucleótido y la región cargada. En menor medida, se encuentran diferencias en los motivos y dominios ciclasa, especialmente de MdLCYB2, pero que no afectan directamente aminoácidos que se sabe son esenciales para la función, encontrándose estos aminoácidos altamente conservados. La región conservada de enzimas ciclasas, en particular, no presenta ninguna diferencia para MdLCYB1 o MdLCYB2 con respecto a las otras enzimas analizadas (Cunningham y col., 1996; Alquezar y col., 2009).

La presencia de más de una copia del gen LCYB en el genoma de la manzana puede haber generado una menor presión selectiva sobre el gen MdLCYB2, permitiendo la presencia de mutaciones que finalmente generen una proteína con falta de actividad enzimática. Sin embargo, puede ser que la enzima MdLCYB2 no corresponda a una enzima licopeno β -ciclasa, propuesto por el análisis mediante BLAST que muestra que esta proteína presenta una identidad de 82% con la enzima neoxantina sintasa (NSY) de *Camellia nitidissima* y de 77% con la enzima capsantina-capsorrubina sintasa (CCS) de *Ricinus communis* (**Datos No Mostrados**),

involucradas en pasos posteriores de la ruta carotenogénica. Estas enzimas presentan un origen común con las enzimas LCYB y, por lo tanto, presentan conservación de regiones dentro de la secuencia aminoacídica (Al-Babili y col., 2000; Bouvier y col., 2000).

El árbol filogenético de las enzimas LCYB de *M. domestica* (**Figura 4**) presenta concordancia dentro de sí mismo y con resultados anteriores. Todas las LCYB de plantas superiores se encuentran agrupadas en una rama diferente a las CRTY bacterianas. Dentro de la rama de las LCYB vegetales se encontró una clara segregación en dos subfamilias, una donde se agrupan las enzimas específicas de cloroplastos de órganos fotosintéticos y una en la que se agrupan las enzimas específicas de cromoplastos de órganos sumideros. Esto denota que, para organismos que presentan más de un gen que codifica una enzima LCYB, estas presentan cierta preferencia de expresión en distintos tejidos, como es el caso del tomate, que posee más de un gen que codifica enzimas LCYB, uno de los cuales es específico del tejido cromoplástico (Ronen y col., 2000). Este resultado fue perceptible dentro de las enzimas de *M. domestica*, observándose que ambas se encuentran agrupadas en ramas distintas del árbol filogenético. MdLCYB1 se encuentra agrupada dentro de la subfamilia de LCYB cloroplásticas y MdLCYB2, dentro de la subfamilia de LCYB cromoplásticas. El resultado del árbol filogenético se correlaciona con la expresión diferencial de los genes MdLCYB1 y MdLCYB2 a partir de PCR cuantitativo de ARN extraído de hojas maduras y pulpa frutos maduros de *M. domestica* cv Fuji (Cerdeira, trabajo en curso). Se obtuvo expresión en ambos tejidos, presentando MdLCYB1 mayor nivel de transcrito en hojas que en frutos y MdLCYB2, mayor nivel en frutos. Consecuentemente, los bajos niveles de acumulación de β -caroteno en tejido de fruto

pueden deberse a los patrones de expresión de estos genes, ya que en este tejido, el gen *MdLCYB1* se expresa en menor nivel que en hoja, impidiendo la acumulación de carotenoides en frutos y que el gen *MdLCYB2*, que se expresa preferentemente en este tejido puede codificar una enzima inactiva o que presente actividad no correspondiente a licopeno β -ciclasa. Sin embargo, esto podría generar la acumulación del sustrato de esta enzima. Recientemente, se reportó una baja expresión del gen *CRTISO* en *M. domestica* (Ampomah-Dwamena y col., 2012). El producto génico *CRTISO* es responsable de la generación del isómero all-trans-licopeno, y en base a ello los autores proponen que se encontraría fuertemente relacionado con la baja acumulación de carotenoides en manzana (Ampomah-Dwamena y col., 2012). Sin embargo, si ésta actividad enzimática o la *LCYB* fuera un paso limitante, debería existir acumulación del precursor cis-licopeno en manzana. Lo más probable es que la deficiencia de β -caroteno se deba a una serie de factores como: eficiencia en la interacción entre diferentes enzimas de la ruta, regulaciones que impidan el normal funcionamiento, o a la degradación de carotenoides a apocarotenoides volátiles (Auldrige y col., 2006). De acuerdo a los resultados obtenidos proponemos que la funcionalidad y expresión de las enzimas *LCYB* podrían participar en alguna medida en el fenotipo exhibido por los frutos de manzana.

4.3. Complementación heteróloga y cuantificación de carotenoides.

El gen *MdLCYB1* fue capaz de revertir el fenotipo de la cepa de *E. coli* mutada, restituyendo la ruta de síntesis de β -caroteno, lo que permite concluir que codifica una enzima licopeno β -ciclasa funcional. Esto se fundamenta en el hecho que el fenotipo exhibido por el clon *MdLCYB1* era de color amarillento, semejante al control positivo, suponiéndose acumulación de β -caroteno, predicción que se comprobó al analizar el

cromatograma (**Figura 17**), donde se aprecian dos picos diferentes, uno que se condice con el compuesto licopeno y uno de mayor tamaño consistente con el compuesto β -caroteno, indicando que existe acumulación de ambos pigmentos. La presencia de β -caroteno primó por sobre la de licopeno, otorgando el fenotipo de coloración amarilla característico a esta cepa. Por lo tanto, existe expresión de la enzima MdLCYB1 en el sistema bacteriano, generándose β -caroteno. No obstante, esta proteína no es capaz de ciclar la totalidad del licopeno, resultado que puede deberse a que la enzima posee menor funcionalidad que la enzima CRTY de *E. uredovora*, convirtiéndose en el paso limitante de la ruta de síntesis y acumulándose el sustrato de la enzima. Otra opción es que esta enzima, al ser de origen vegetal, es menos eficiente al acoplarse al complejo multienzimático conformado por el resto de las enzimas carotenogénicas provenientes de *E. uredovora* expresadas en este sistema heterólogo (Bonk y col., 1997; Cunningham y Gantt, 1998). Si bien la enzima parece incapaz de realizar la conversión completa de licopeno a β -caroteno, se obtuvo una mayor producción de β -caroteno con respecto al control positivo pDS1B, ya que los niveles de β -caroteno acumulado por la cepa MdLCYB1 es significativamente superior con respecto a la cepa pDS1B. La razón de la mayor acumulación de β -caroteno en la cepa MdLCYB1 que en el control positivo puede radicar en el sistema de expresión que se está utilizando, en particular el promotor T7 que comanda la transcripción del gen. El promotor T7 es un promotor con expresión fuerte al ser inducido, por lo tanto, se generan altos niveles de transcrito y, teóricamente, de la proteína codificada. La presencia de ésta puede derivar en un cambio en el metabolismo del organismo por una retroalimentación positiva o un direccionamiento de los precursores de la ruta carotenogénica hacia la síntesis de β -caroteno, lo que aumentaría el flujo, reflejado en los niveles elevados de este pigmento.

Por otro lado, no se encontró β -caroteno en la cepa transformada con el gen MdLCYB2, indicando que no fue posible restituir la ruta carotenogénica, lo que permite sugerir que este gen no codifica una enzima licopeno β -ciclase funcional. Las evidencias están en que para la cepa MdLCYB2, se observa un fenotipo rojizo, similar al presentado por el control negativo Δ CRTY, infiriéndose la acumulación del licopeno, lo cual fue comprobado por el cromatograma (**Figura 17**), donde se observa un único pico consistente con licopeno, lo que revela que esta cepa acumula este pigmento y que no acumula β -caroteno. Por consiguiente esta enzima es incapaz de generar β -caroteno a partir de licopeno en este sistema heterólogo y la presencia de la enzima posible no genera cambios en los niveles de carotenoides, ya que la cantidad relativa de licopeno acumulada no es significativamente diferente al control negativo. Probablemente, las diferencias aminoacídicas en las regiones importantes de MdLCYB1 y MdLCYB2 pueden explicar que la enzima MdLCYB1 presente funcionalidad, mientras no se detecta funcionalidad para MdLCYB2. Pese a esto, no se puede saber efectivamente cuales son las diferencias aminoácídicas que están siendo implicadas en la falta de función de la enzima MdLCYB2, porque no se ha podido cristalizar enzimas carotenogénicas en su forma nativa y, por lo tanto, ha sido imposible el análisis a nivel de los residuos aminoácídicos involucrados en la actividad catalítica o en interacciones con otras enzimas. Desafortunadamente, a pesar de que no se ve funcionalidad para MdLCYB2 no se puede tener la certeza, ya que mediante este método de complementación heteróloga, la presencia de β -caroteno denota funcionalidad, pero la ausencia de éste no indica tajantemente una falta total de funcionalidad. Se descarta que la falta de transcrito sea la causa de la ausencia en la detección de β -caroteno, ya que al realizar un RT-PCR a partir de ARN de esta cepa bacteriana se detectó amplificación (**Figura 15**). Dentro del sistema en el que se está

expresando esta proteína, la falta de un resultado positivo puede deberse a una serie de factores. Uno de ellos puede ser la presencia del péptido de destinación a cloroplasto. Debido a que las proteínas destinadas a plastidios carecen de esta secuencia aminoacídica al encontrarse en su estado nativo dentro de los organelos plastidiales, el hecho de que se encuentre presente en la proteína expresada en *E. coli* puede generar un problema de plegamiento que impida la actividad catalítica de la enzima o impida el acoplamiento con el complejo multi-enzimático (Bonk y col., 1997; Cunningham y Gantt, 1998). Sin embargo, se siguió el mismo procedimiento con la enzima MdLCYB1, sin cortar el péptido de destinación previo a la clonación de la secuencia codificante del gen, y sí se obtuvo un resultado positivo. Además, ya que la disponibilidad de ARNt difiere entre organismos procariontes y eucariontes, la utilización de codones es distinta entre *E. coli* y *M. domestica*, y se ha reportado que la escasa disponibilidad de algún ARNt, al momento de la traducción de proteínas, puede inhibir la síntesis de las proteínas de interés (de Boer y Kastelein, 1986), no obstante, no existe diferencia significativa en la utilización de codones entre ambos genes analizados. Por último, es posible que la proteína sea traducida, pero luego sea degradada por la bacteria (Gottesman y Maurizi, 1992) o se encuentre formando cuerpos de inclusión en el citoplasma (Hartley y Kane, 1988), impidiendo que cumpla su función. Sin embargo, al no existir anticuerpos diseñados específicamente para esta proteína, no es posible probar estas hipótesis. Una posible forma de determinar la funcionalidad de esta proteína puede ser la expresión heteróloga en un modelo vegetal mutante para este gen, permitiendo que el producto génico sea procesado por la maquinaria celular similar al organismo de origen y comprobando reversión del fenotipo.

5. CONCLUSIONES

- *M. domestica* posee 2 genes homólogos a *LCYB* codificados en su genoma.
- *MdLCYB1* codifica una enzima licopeno β -ciclase funcional, como fue demostrado por la expresión heteróloga en cepas de *E. coli* pDS1B $\Delta crtY$.
- Para la cepa transformada con *MdLCYB2* no se observó acumulación de β -caroteno, a pesar de existir transcrito, lo que puede indicar que este gen no es funcional en bacterias.
- Estos resultados sugieren que 1) el bajo nivel de β -caroteno en frutos podría deberse en parte a la ausencia de funcionalidad de *MdLCYB2* y 2) *M. domestica* posee al menos una enzima *LCYB* que se expresa tanto en hojas como en frutos.

6. PROYECCIONES

- Utilizar el gen *MdLCYB1* en estrategias de cis-genia al sobreexpresarlo de manera fruto-específica en *M. domestica*, para elevar el nivel de β -caroteno, aumentando sus propiedades como alimento funcional.

7. REFERENCIAS

- Ahrazem O, Rubio-Moraga A, Lopez RC, Gomez-Gomez L (2010) The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors. *J Exp Bot* **61**: 105-119
- Akiyama K, Ogasawara S, Ito S, Hayashi H (2010) Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol* **51**: 1104-1117
- Al-Babili S, Hugueney P, Schledz M, Welsch R, Frohnmeyer H, Laule O, Beyer P (2000) Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum*. *FEBS Lett* **485**: 168-172
- Alquezar B, Zacarias L, Rodrigo MJ (2009) Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene beta-cyclase from Citrus and its relation to lycopene accumulation. *J Exp Bot* **60**: 1783-1797
- Aluru M, Xu Y, Guo R, Wang Z, Li S, White W, Wang K, Rodermeil S (2008) Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *J Exp Bot* **59**: 3551-3562
- Ampomah-Dwamena C, Dejnopratt S, Lewis D, Sutherland P, Volz RK, Allan AC (2012) Metabolic and gene expression analysis of apple (*Malus x domestica*) carotenogenesis. *J Exp Bot* **63**: 4497-4511
- Ampomah-Dwamena C, McGhie T, Wibisono R, Montefiori M, Hellens RP, Allan AC (2009) The kiwifruit lycopene beta-cyclase plays a significant role in carotenoid accumulation in fruit. *J Exp Bot* **60**: 3765-3779
- Armstrong GA, Hearst JE (1996) Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J* **10**: 228-237
- Auldrige ME, McCarty DR, Klee HJ (2006) Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 315-321
- Bai L, Kim EH, DellaPenna D, Brutnell TP (2009) Novel lycopene epsilon cyclase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis. *Plant J* **59**: 588-599
- Barrero JM, Rodriguez PL, Quesada V, Alabadi D, Blazquez MA, Boutin JP, Marion-Poll A, Ponce MR, Micol JL (2008) The ABA1 gene and carotenoid biosynthesis are required for late skotomorphogenic growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **31**: 227-234
- Beyer P, Al-Babili S, Ye X, Lucca P, Schaub P, Welsch R, Potrykus I (2002) Golden Rice: introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *J Nutr* **132**: 506S-510S
- Beyer P, Kroncke U, Nievelstein V (1991) On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplasts. *J Biol Chem* **266**: 17072-17078
- Bode S, Quentmeier CC, Liao PN, Hafi N, Barros T, Wilk L, Bittner F, Walla PJ (2009) On the regulation of photosynthesis by excitonic interactions between carotenoids and chlorophylls. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 12311-12316
- Bone RA, Landrum JT (2010) Dose-dependent response of serum lutein and macular pigment optical density to supplementation with lutein esters. *Arch Biochem Biophys* **504**: 50-55
- Bonk M, Hoffmann B, Von Lintig J, Schledz M, Al-Babili S, Hobeika E, Kleinig H, Beyer P (1997) Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes in vitro reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. *Eur J Biochem* **247**: 942-950

- Bouvier F, D'harlingue A, Backhaus RA, Kumagai MH, Camara B (2000)** Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *European Journal of Biochemistry* **267**: 6346–6352
- Bramley PM (2002)** Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J Exp Bot* **53**: 2107-2113
- Britton G (1995)** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* **9**: 1551-1558
- Cazzonelli CI, Pogson BJ (2010)** Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* **15**: 266-274
- Collins AR (1999)** Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* **21**: 238-246
- Cunningham FX, Gantt E (1998)** Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 557-583
- Cunningham FX, Jr., Pogson B, Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D, Gantt E (1996)** Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of Arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* **8**: 1613-1626
- Chen H, Zhang J, Neff MM, Hong SW, Zhang H, Deng XW, Xiong L (2008)** Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 4495-4500
- Christensen RL, Barney EA, Broene RD, Galinato MG, Frank HA (2004)** Linear polyenes: models for the spectroscopy and photophysics of carotenoids. *Arch Biochem Biophys* **430**: 30-36
- D'Ambrosio C, Giorio G, Marino I, Merendino A, Petrozza A, Salfi L, Stigliani AL, Cellini F (2004)** Virtually complete conversion of lycopene into β -carotene in fruits of tomato plants transformed with the tomato lycopene β -cyclase (tlcy-b) cDNA. *Plant Science* **166**: 207–214
- Dall'Osto L, Cazzaniga S, North H, Marion-Poll A, Bassi R (2007)** The Arabidopsis aba4-1 mutant reveals a specific function for neoxanthin in protection against photooxidative stress. *Plant Cell* **19**: 1048-1064
- Dall'osto L, Holt NE, Kaligotla S, Fuciman M, Cazzaniga S, Carbonera D, Frank HA, Alric J, Bassi R (2012)** Zeaxanthin Protects Plant Photosynthesis by Modulating Chlorophyll Triplet Yield in Specific Light-harvesting Antenna Subunits. *J Biol Chem* **287**: 41820-41834
- de Boer HA, Kastelein RA (1986)** Biased codon usage: an exploration of its role in optimization of translation. *Maximizing gene expression.*: p: 225–285
- Devitt LC, Fanning K, Dietzgen RG, Holton TA (2010)** Isolation and functional characterization of a lycopene beta-cyclase gene that controls fruit colour of papaya (*Carica papaya L.*). *J Exp Bot* **61**: 33-39
- Diretto G, Al-Babili S, Tavazza R, Papacchioli V, Beyer P, Giuliano G (2007)** Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. *PLoS One* **2**: e350
- Diretto G, Tavazza R, Welsch R, Pizzichini D, Mourgues F, Papacchioli V, Beyer P, Giuliano G (2006)** Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase. *BMC Plant Biol* **6**: 13
- Fierce Y, de Moraes Vieira M, Piantedosi R, Wyss A, Blaner WS, Paik J (2008)** In vitro and in vivo characterization of retinoid synthesis from beta-carotene. *Arch Biochem Biophys* **472**: 126-138

- Fraser PD, Bramley PM (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* **43**: 228-265
- Fraser PD, Enfissi EM, Halket JM, Truesdale MR, Yu D, Gerrish C, Bramley PM (2007) Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell* **19**: 3194-3211
- Fraser PD, Schuch W, Bramley PM (2000) Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts--partial purification and biochemical properties. *Planta* **211**: 361-369
- Fujisawa M, Watanabe M, Choi SK, Teramoto M, Ohyama K, Misawa N (2008) Enrichment of carotenoids in flaxseed (*Linum usitatissimum*) by metabolic engineering with introduction of bacterial phytoene synthase gene crtB. *J Biosci Bioeng* **105**: 636-641
- Galpaz N, Wang Q, Menda N, Zamir D, Hirschberg J (2008) Abscisic acid deficiency in the tomato mutant high-pigment 3 leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content. *Plant J* **53**: 717-730
- Gottesman S, Maurizi MR (1992) Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol Rev* **56**: 592-621
- Grotewold E (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 761-780
- Hadley CW, Miller EC, Schwartz SJ, Clinton SK (2002) Tomatoes, lycopene, and prostate cancer: progress and promise. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**: 869-880
- Hartley DL, Kane JF (1988) Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* **16**: 101-102
- Hirschberg J (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 210-218
- Howitt CA, Pogson BJ (2006) Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ* **29**: 435-445
- Huguene P, Badillo A, Chen HC, Klein A, Hirschberg J, Camara B, Kuntz M (1995) Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant J* **8**: 417-424
- Ji J, Wang G, Wang J, Wang P (2009) Functional analysis of multiple carotenogenic genes from *Lycium barbarum* and *Gentiana lutea* L. for their effects on beta-carotene production in transgenic tobacco. *Biotechnol Lett* **31**: 305-312
- Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, Rolland N (2009) Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Mol Plant* **2**: 1154-1180
- Kim J, DellaPenna D (2006) Defining the primary route for lutein synthesis in plants: the role of *Arabidopsis* carotenoid beta-ring hydroxylase CYP97A3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3474-3479
- Kim JE, Cheng KM, Craft NE, Hamberger B, Douglas CJ (2010) Over-expression of *Arabidopsis thaliana* carotenoid hydroxylases individually and in combination with a beta-carotene ketolase provides insight into in vivo functions. *Phytochemistry* **71**: 168-178
- Koyama Y, Rondonuwu FS, Fujii R, Watanabe Y (2004) Light-harvesting function of carotenoids in photo-synthesis: the roles of the newly found 1(1)Bu- state. *Biopolymers* **74**: 2-18
- Krinsky NI, Johnson EJ (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* **26**: 459-516
- Krubasik P, Sandmann G (2000) Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochem Soc Trans* **28**: 806-810

- Lamers PP, Janssen M, De Vos RC, Bino RJ, Wijffels RH (2008) Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends Biotechnol* **26**: 631-638
- Lichtenthaler H, Buschmann C (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: F4.3.1-F4.3.8
- Linden H (1999) Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation. *Biochim Biophys Acta* **1446**: 203-212
- Lopez AB, Yang Y, Thannhauser TW, Li L (2008) Phytoene desaturase is present in a large protein complex in the plastid membrane. *Physiol Plant* **133**: 190-198
- Lorenzo Y, Azqueta A, Luna L, Bonilla F, Dominguez G, Collins AR (2009) The carotenoid beta-cryptoxanthin stimulates the repair of DNA oxidation damage in addition to acting as an antioxidant in human cells. *Carcinogenesis* **30**: 308-314
- Maass D, Arango J, Wust F, Beyer P, Welsch R (2009) Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS One* **4**: e6373
- MacDaniels L (1940) The morphology of the apple and other pome fruits., Ed Memoir Vol **230**:1-32. Cornell Agricultural Experimental Station, Geneva, New York, USA
- Makrides SC (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**: 512-538
- Mann V, Harker M, Pecker I, Hirschberg J (2000) Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nat Biotechnol* **18**: 888-892
- Marie D, Brown SC (1993) A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol Cell* **78**: 41-51
- Meier S, Tzfadia O, Vallabhaneni R, Gehring C, Wurtzel ET (2011) A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Syst Biol* **5**: 77
- Meisel L, Fonseca B, Gonzalez S, Baeza-Yates R, Cambiazo V, Campos R, Gonzalez M, Orellana A, Retamales J, Silva H (2005) A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. *Biol Res* **38**: 83-88
- Mialoundama AS, Heintz D, Jadid N, Nkeng P, Rahier A, Deli J, Camara B, Bouvier F (2010) Characterization of plant carotenoid cyclases as members of the flavoprotein family functioning with no net redox change. *Plant Physiol* **153**: 970-979
- Misawa N (2011) Pathway engineering for functional isoprenoids. *Curr Opin Biotechnol* **22**: 627-633
- Misawa N, Nakagawa M, Kobayashi K, Yamano S, Izawa Y, Nakamura K, Harashima K (1990) Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**: 6704-6712
- Moreno JC (2010) Evaluación de la funcionalidad de la licopeno β -ciclase de *Daucus carota L.* (zanahoria) mediante complementación heteróloga. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 165-185

- Newbury HJ, Possingham JV (1977)** Factors affecting the extraction of intact ribonucleic Acid from plant tissues containing interfering phenolic compounds. *Plant Physiol* **60**: 543-547
- Newcomb RD, Crowhurst RN, Gleave AP, Rikkerink EH, Allan AC, Beuning LL, Bowen JH, Gera E, Jamieson KR, Janssen BJ, Laing WA, McArtney S, Nain B, Ross GS, Snowden KC, Souleyre EJ, Walton EF, Yauk YK (2006)** Analyses of expressed sequence tags from apple. *Plant Physiol* **141**: 147-166
- Niklitschek M, Alcaino J, Barahona S, Sepulveda D, Lozano C, Carmona M, Marcoleta A, Martinez C, Lodato P, Baeza M, Cifuentes V (2008)** Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol Res* **41**: 93-108
- North HM, De Almeida A, Boutin JP, Frey A, To A, Botran L, Sotta B, Marion-Poll A (2007)** The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J* **50**: 810-824
- Pan SH, Malcolm BA (2000)** Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3). *Biotechniques* **29**: 1234-1238
- Pecker I, Gabbay R, Cunningham FX, Jr., Hirschberg J (1996)** Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Mol Biol* **30**: 807-819
- Peter GF, Thornber JP (1991)** Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J Biol Chem* **266**: 16745-16754
- Pogson B, McDonald KA, Truong M, Britton G, DellaPenna D (1996)** Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. *Plant Cell* **8**: 1627-1639
- Polli D, Cerullo G, Lanzani G, De Silvestri S, Yanagi K, Hashimoto H, Cogdell RJ (2004)** Conjugation length dependence of internal conversion in carotenoids: role of the intermediate state. *Phys Rev Lett* **93**: 163002
- Ritz T, Damjanovic A, Schulten K, Zhang JP, Koyama Y (2000)** Efficient light harvesting through carotenoids. *Photosynth Res* **66**: 125-144
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J (2000)** An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11102-11107
- Rosas C (2013)** Caracterización molecular y funcional del gen carotenogénico licopeno b-ciclasa 2 (DcLCYB2) de *Daucus carota* (zanahoria). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Rosati C, Aquilani R, Dharmapuri S, Pallara P, Marusic C, Tavazza R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G (2000)** Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant J* **24**: 413-419
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed., Ed Cold Spring Harbor Laboratory Press Vol., Cold Spring Harbor, NY
- Schnurr G, Misawa N, Sandmann G (1996)** Expression, purification and properties of lycopene cyclase from *Erwinia uredovora*. *Biochem J* **315 (Pt 3)**: 869-874
- Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY (1999)** Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J* **20**: 401-412X
- Studier FW, Moffatt BA (1986)** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130

- Sun Z, Gantt E, Cunningham FX, Jr. (1996) Cloning and functional analysis of the beta-carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **271**: 24349-24352
- Telfer A (2005) Too much light? How beta-carotene protects the photosystem II reaction centre. *Photochem Photobiol Sci* **4**: 950-956
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kozuka J, Yamaguchi S (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195-200
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troggio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald LM, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell JT, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu VT, King ST, Vick J, Tao Q, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchietti A, Kater MM, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan AC, Bus V, Chagne D, Crowhurst RN, Gleave AP, Lavezzo E, Fawcett JA, Proost S, Rouze P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens RP, Durel CE, Gutin A, Bumgarner RE, Gardiner SE, Skolnick M, Egholm M, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nat Genet* **42**: 833-839
- Vishnevetsky M, Ovadis M, Vainstein A (1999) Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci* **4**: 232-235
- Walter MH, Strack D (2011) Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Nat Prod Rep* **28**: 663-692
- Wan Y, Yang S, Sun F, Wang J, Chen Q, Hong A (2012) All-trans retinoic acid induces chromatin remodeling at the promoter of the mouse liver, bone, and kidney alkaline phosphatase gene in C3H10T 1/2 cells. *Biochem Genet* **50**: 495-507
- Woodall AA, Britton G, Jackson MJ (1997) Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1336**: 575-586
- Yeum KJ, Russell RM (2002) Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu Rev Nutr* **22**: 483-504
- Yoneyama K, Awad AA, Xie X, Takeuchi Y (2010) Strigolactones as germination stimulants for root parasitic plants. *Plant Cell Physiol* **51**: 1095-1103
- Zhao X, Aldini G, Johnson EJ, Rasmussen H, Kraemer K, Woolf H, Musaeus N, Krinsky NI, Russell RM, Yeum KJ (2006) Modification of lymphocyte DNA damage by carotenoid supplementation in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* **83**: 163-169