

UCH-FC  
Biotecnología  
A 185  
C.1



Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

**“Evaluación de la funcionalidad de los genes *MdPSY2* y *MdPSY3* de manzana (*Malus domestica cv. Fuji*) que codifican a fitoeno sintasa, enzima involucrada en la síntesis de carotenoides”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título profesional de: **Ingeniero en Biotecnología Molecular**

**Facultad de ciencias**

**Por**

**Daniel Andrés Acosta Badilla**

Directora de Seminario de Título: Dra. Claudia Stange K.

Septiembre, 2014  
Santiago - Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

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. Daniel Andrés Acosta Badilla**.

### **“Evaluación de la funcionalidad de los genes *MdPSY2* y *MdPSY3* de manzana (*Malus domestica* cv. *Fuji*) que codifican a fitoeno sintasa, enzima involucrada en la síntesis de carotenoides”**

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

Directora Seminario de Título:      Dra. Claudia Stange K.

#### Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión:      Dra. Jennifer Alcaíno G.

Evaluador:      Dr. Ricardo Cabrera P.



Santiago de Chile, Septiembre de 2014



Llegué al mundo el 15 de agosto de 1988 en Santiago. Tuve la suerte de nacer en medio de una familia esforzada y cariñosa, que hasta el presente me siguen acompañando, enseñando y soportando.

Desde niño tuve curiosidad por entender y cuestionar las cosas que ocurrían a mi alrededor, y fue eso lo que me motivó a estudiar una carrera relacionada con el área científica. Antes de llegar a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, si bien no me consideraba un “genio”, creía saber mucho. Sin embargo, bastó un semestre para darme cuenta lo equivocado que estaba, y siete años en la Universidad no disminuyeron el sentimiento de ignorancia. Pero sí me hicieron tener una actitud de humildad frente al mundo, a continuar con ganas de aprender y con el deseo de poder transmitir ese conocimiento.

Espero que esa curiosidad, el sentimiento de satisfacción al entender o aprender algo nuevo y la gratificación de compartir ese conocimiento, me sigan acompañando en el futuro.

## **Agradecimientos**

Quiero comenzar por agradecer a las personas que hicieron posible este Seminario de Título: Ariel Cerda y Carolina Rosas por sus consejos y ayuda al comienzo y durante el desarrollo del presente trabajo, Juan Carlos Cáceres y el Dr. Ricardo Cabrera por su orientación y ayuda en el modelamiento por homología, Dra. Claudia Stange por su paciencia y guía durante mi estadía en el laboratorio y por su tiempo dedicado a las correcciones del presente trabajo, Sebastián Urbina y Angélica Vega por su trabajo en la administración, cuidado y aseo del laboratorio, entre otras labores indispensables.

Agradecer a mis compañeros de laboratorio por sus preguntas y consejos en cada seminario y por hacer del lugar que compartimos la mayor parte del día, un lugar agradable de cooperación, apoyo y respeto.

Agradecer a los profesores que integran el laboratorio: Dra. Claudia Stange, Dr. Michael Handford, Dra. Liliana Cardemil y Dra. Lorena Norambuena, por sus consejos y preguntas en cada seminario, y por la disponibilidad y buena voluntad frente a las consultas realizadas por nosotros los estudiantes.

Finalmente agradecer a mi familia, por el apoyo incondicional entregado durante toda mi vida.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN .....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIII</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Estructura y función de los carotenoides .....	1
1.2. Biosíntesis de carotenoides en plantas.....	3
1.3. La enzima fitoeno sintasa en plantas.....	7
1.4. <i>Malus domestica</i> y los genes carotenogénicos.....	11
1.5. <i>Escherichia coli</i> como modelo de complementación heteróloga .....	13
1.6. Objetivos .....	14
1.6.1. Objetivo general .....	14
1.6.2. Objetivos específicos.....	14
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
2.1. Reactivos .....	15
2.2. Material Biológico .....	15
2.2.1. Partidores.....	15
2.2.2. Vectores, plásmidos y cepas .....	16
2.2.3. Medio de cultivo bacteriano .....	17
2.3. Metodologías.....	18
2.3.1. Métodos de Biología Molecular .....	18
2.3.1.1. Extracción de ADN plasmidial .....	18
2.3.1.2. Digestión enzimática .....	18
2.3.1.3. Electroforesis en geles de agarosa y purificación de bandas de ADN desde geles .....	19
2.3.1.4. Clonación de <i>MdPSY3</i> , <i>MdPSY2</i> incluyendo las mutantes <i>MdPSY2_F</i> y <i>MdPSY2_CG</i> , en el vector de expresión pET28a.....	19
2.3.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	20
2.3.1.6. Preparación de cepas de <i>E. coli</i> quimiocompetentes .....	21
2.3.1.7. Transformación de cepas de <i>E. coli</i> quimiocompetentes.....	21

2.3.1.8.	Complementación de la cepa de <i>E. coli</i> BL-21 pDS1B $\Delta crtB$ .....	22
2.3.2.	Extracción y análisis de carotenoides .....	23
2.3.2.1.	Preparación del cultivo. ....	23
2.3.2.2.	Determinación del peso seco .....	23
2.3.2.3.	Extracción de carotenoides .....	24
2.3.2.4.	Cuantificación y determinación de la composición de carotenoides .	24
2.3.2.5.	Análisis estadístico.....	25
2.3.3.	Bioinformática.....	26
2.3.3.1.	Análisis de la secuencias de MdPSY3, MdPSY2 y las mutantes MdPSY2_F y MdPSY2_CG.....	26
2.3.3.2.	Modelamiento <i>in-silico</i> de las secuencias aminoacídicas de MdPSY3, MdPSY2 y la mutantes MdPSY2_F.....	26
<b>RESULTADOS.....</b>		<b>29</b>
3.1.	Análisis de las secuencias aminoacídicas de MdPSY3, MdPSY2 y las mutantes MdPSY2_F y MdPSY2_CG .....	29
3.2.	Generación de las construcciones pET28/MdPSY2_CG, pET28/MdPSY2_F y pET28/MdPSY2 .....	32
3.3.	Complementación heteróloga de la cepa de <i>E. coli</i> BL-21 pDS1B $\Delta crtB$ .....	35
3.4.	Extracción y análisis de carotenoides desde las cepas complementadas.....	37
3.5.	Modelamiento <i>in-silico</i> de MdPSY3, MdPSY2 y la mutante MdPSY2_F .....	39
<b>DISCUSIÓN .....</b>		<b>48</b>
4.1.	Análisis de las secuencias aminoacídicas MdPSY3, MdPSY2 y las mutantes MdPSY2_F y MdPSY2_CG.....	48
4.2.	Evaluación de la funcionalidad de MdPSY3, MdPSY2 y las mutantes MdPSY2_F y MdPSY2_CG.....	52
4.3.	Modelamiento <i>in-silico</i> de MdPSY3, MdPSY2 y la mutante MdPSY2_F .....	53
<b>CONCLUSIONES.....</b>		<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>		<b>56</b>
<b>ANEXOS .....</b>		<b>63</b>
7.1.	<b>Anexo 1:</b> Secuencias aminoacídicas de las enzimas MdPSY .....	63
7.2.	<b>Anexo 2:</b> Alineamientos usado en el modelamiento por homología. ....	64
7.3.	<b>Anexo 3:</b> Secuencia de MdPSY2 y MdPSY3 anotada desde el borrador del genoma de <i>Malus domestica</i> .....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Partidores diseñados y usados en este seminario.....	15
<b>Tabla II.</b> Plásmidos utilizados y construidos en el presente trabajo.....	16
<b>Tabla III.</b> Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas y obtenidas en el presente trabajo.....	17
<b>Tabla IV.</b> Programa de PCR de colonia usado.....	20

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas.....	6
<b>Figura 2.</b> Síntesis de 15-cis-fitoeno.....	8
<b>Figura 3.</b> Esquema de los pasos realizados en la obtención de los modelos a través de modelamiento por homología .....	28
<b>Figura 4.</b> Alineamiento múltiple de las secuencias de PSY de <i>M. domestica</i> y de sus ortólogos bacterianos.....	30
<b>Figura 5.</b> Alineamiento múltiple entre parálogos de MdPSY y sus ortólogos en plantas. ....	31
<b>Figura 6.</b> Digestión de pET28a, pCR8/MdPSY2_CG, pCR8/MdPSY2_F y pCR8/MdPSY2 con las enzimas <i>Bam</i> HI y <i>Sal</i> I .....	32
<b>Figura 7.</b> Esquema de las construcciones derivadas de pET28a y los marcos abiertos de lectura de <i>MdPSY</i> .....	33
<b>Figura 8.</b> PCR de las colonias de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ transformadas con los productos de ligación. ....	34
<b>Figura 9.</b> Digestión con la enzima <i>Ava</i> I de clones que portan los marcos abiertos de lectura de <i>MdPSY</i> en el vector pET28a .....	35
<b>Figura 10.</b> PCR de colonias de BL-21 transformadas con las construcciones pET28/MdPSY3, pET28/MdPSY2, pET28/MdPSY2_F y pET28/MdPSY2_CG.....	36
<b>Figura 11.</b> Fenotipo de las cepas complementadas .....	37
<b>Figura 12.</b> Carotenoides totales de las cepas complementadas con PSY de <i>M. domestica</i> .....	38

<b>Figura 13.</b> Cromatogramas y espectros de absorción de los carotenoides obtenidos desde las cepas con <i>PSY</i> de <i>M. domestica</i> .....	39
<b>Figura 14.</b> Modelos de MdPSY3, MdPSY2 y MdPSY2_F .....	40
<b>Figura 15.</b> Evaluación de los dominios funcionales de MdPSY .....	41
<b>Figura 16.</b> Modelos predichos de MdPSY .....	42
<b>Figura 17.</b> Regiones funcionales de los modelos predichos de MdPSY .....	44
<b>Figura 18.</b> Valor de RMSD por residuo .....	45
<b>Figura 19.</b> Entorno hidrofóbico del residuo Tyr/Phe358 (MdPSY2) y Tyr386 (MdPSY3) .....	46
<b>Figura 20.</b> Residuos cercanos a Tyr/Phe358 (MdPSY2) y Tyr386 (MdPSY3) .....	47
<b>Figura 21.</b> Alineamiento entre MdPSY2 y los moldes 4HD1, 2ZCO y 3VJ8. ....	64
<b>Figura 22.</b> Alineamiento entre MdPSY2_F y los moldes 4HD1, 2ZCO y 3VJ8. ....	64
<b>Figura 23.</b> Alineamiento entre MdPSY3 y los moldes 4HD1, 2ZCO y 3VJ8. ....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN : Ácido desoxirribonucleico.
- ABA : Ácido abscísico.
- ADNc : ADN copia.
- ANOVA : Análisis de varianza.
- dNTP : Desoxinucleótido trifosfato.
- $DO_{600}$  : Densidad óptica a 600 nm.
- $H_2O_d$  : Agua destilada.
- IPTG : Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido.
- Kb : Kilobase.
- MEP : 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato.
- MVA : Mevalonato.
- ORF : Marco abierto de lectura.
- p/v : Relación peso/volumen.
- pb : Pares de base.
- PCR : Reacción en cadena de la polimerasa.
- PDB : Banco de datos de proteínas.
- PSI-BLAST : Herramienta de alineamiento básico local iterado específico por posición.
- RMSD : Raíz de la desviación cuadrática media.
- RP-HPLC : Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.
- SNP : Polimorfismo de nucleótido único.
- Tyr/Phe358 : Residuo aminoacídico en la posición 358, puede ser Tyr (MdPSY2) o Phe (MdPSY2\_F y MdPSY2\_CG).
- VMD : Herramienta de visualización de dinámica molecular.

## RESUMEN

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides sintetizados por plantas, algas y algunos hongos y bacterias. En plantas participan en la fotosíntesis, en la protección contra el daño fotooxidativo y son precursores del ácido abscísico (ABA) y estrigolactonas. En mamíferos son precursores de la vitamina A e importantes agentes antioxidantes, por lo cual deben ser incorporados a través de la dieta.

En plantas la síntesis de carotenoides ocurre en los plastidios y comienza con la formación de fitoeno, reacción catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY), la cual ha sido reportada como un paso limitante y altamente regulado en la síntesis de carotenoides. Por esta razón, genes que codifican a PSY han sido ampliamente estudiados en diversos sistemas y usados en ingeniería metabólica de plantas junto a otros genes carotenogénicos con el fin de incrementar el nivel de carotenoides, en particular el de  $\beta$ -caroteno.

*Malus domestica* es uno de los frutos cultivables más ampliamente consumido, principalmente por su alto valor nutricional y fácil consumo. Sin embargo, el nivel de carotenoides (pro vitamina A) en el hipanto del fruto es bajo (6  $\mu\text{g/g}$  de peso seco) y por ello posee una coloración blanquecina. Con el fin de entender la regulación del metabolismo de carotenoides en el fruto de manzana, hemos identificado cuatro genes parálogos de PSY los que mostraron tener una expresión diferencial a nivel transcripcional en la planta. *MdPSY2* y *MdPSY3* se expresan preferentemente en fruto y hoja respectivamente, mientras que *MdPSY1* y *MdPSY4* se expresa escasamente en

estos tejidos. En el caso del desarrollo del fruto *MdPSY3* aumenta su expresión mientras que *MdPSY2* disminuye. Por otro lado, se identificaron dos mutantes, posiblemente variantes polimórficas, de *MdPSY2*: i) *MdPSY2\_CG*, posee una escisión de 6 aminoácidos entre los residuos 30 y 37 (Arg30\_Leu37del), una serina en el residuo 41 (Gly41Ser) y una fenilalanina en el residuo 358 (Tyr358Phe) y ii) *MdPSY2\_F*, posee una fenilalanina en el residuo 358 (Tyr358Phe).

Continuando con la caracterización de la familia de *MdPSY*, en este seminario de título se evaluó la funcionalidad de *MdPSY3* y cada variante génica de *MdPSY2* por medio de complementación heteróloga en la cepa recombinante *E. coli* pDS1B  $\Delta crtB$ , la cual posee los genes necesarios para la síntesis de  $\beta$ -caroteno, con una escisión en *crtB* ( $\Delta crtB$ ), ortólogo bacteriano de *PSY*. De esta manera fue posible determinar que *MdPSY3*, *MdPSY2* y sus mutantes (*MdPSY2\_CG* y *MdPSY2\_F*) son funcionales ya que complementan la mutación en *crtB*. Sin embargo, en las cepas complementadas con *MdPSY3* y *MdPSY2* se observó hasta dos veces más carotenoides respecto a las cepas transformadas con *MdPSY2\_F* y *MdPSY2\_CG*.

Finalmente, el modelamiento por homología de la estructura terciaria de *MdPSY2*, *MdPSY2\_F* y *MdPSY3* permitió entender en parte como el cambio del residuo Tyr358 por Phe358 puede afectar posibles interacciones electrostáticas con los residuos de su entorno.

## ABSTRACT

Carotenoids are isoprenoid pigments synthesized by plants, algae and some fungus and bacteria. In Plants, they participate in photosynthesis, protection against photooxidative damage and they are precursors of abscisic acid (ABA) and strigolactones. In mammals, they are vitamin A precursors and important antioxidants agents, and therefore must be incorporated in the diet.

In plants, the synthesis of carotenoids occurs in plastids and begins with the formation of phytoene, reaction catalyzed by the enzyme phytoene synthase (PSY), which has been reported as a limiting and highly regulated step in the synthesis of carotenoids. Therefore, genes coding for PSY have been extensively studied in various systems and used in metabolic engineering of plants with other carotenogenic genes in order to increase the level of carotenoids, in particular of  $\beta$ -carotene.

*Malus domestica* is one of the most widely consumed cultivated fruits, mainly for its nutritional value and easy consumption. However, the level of carotenoids (pro vitamin A) in the hypanthium of the fruit, is low (6  $\mu\text{g/g}$  dry weight) and therefore has a whitish color. In order to understand the regulation of carotenoid metabolism in apple fruit, we identified four *PSY* paralogous genes with differential expression at the transcriptional level in apple plants. *MdPSY2* and *MdPSY3* are preferably expressed in fruits and leaves respectively, while *MdPSY1* and *MdPSY4* are scarcely expressed in these tissues. During fruit development, *MdPSY3* increases its expression while *MdPSY2* decreases. Furthermore, two mutants (possible polymorphic variants) of

*MdPSY2* were identified: i) *MdPSY2\_CG* has a deletion of 6 amino acids between residues 30 and 37 (Arg30\_Leu37del), a serine at residue 41 (Gly41Ser) and a phenylalanine at residue 358 (Tyr358Phe) and ii) *MdPSY2\_F*, has a phenylalanine at residue 358 (Tyr358Phe). Following with the characterization of the *MdPSY* family, in this work we evaluated the functionality of *MdPSY3* and each genetic variant of *MdPSY2* by heterologous complementation in a recombinant strain *E. coli* pDS1B  $\Delta crtB$ , which has the necessary genes for the synthesis of  $\beta$ -carotene, with a deletion in *crtB* ( $\Delta crtB$ ), the bacterial orthologue of *PSY*. It was possible to determine that *MdPSY3*, *MdPSY2* and its mutants (*MdPSY2\_CG* y *MdPSY2\_F*) are functional, as they were able to restore the  $\Delta crtB$  mutation. However, in strains complemented with *MdPSY3* and *MdPSY2* up to 2-fold more carotenoids was observed compared to strains with *MdPSY2\_F* and *MdPSY2\_CG*.

Finally, homology modeling of the tertiary structure of *MdPSY2*, *MdPSY2\_F* and *MdPSY3* allowed us to understand in part how changes of residue Tyr358 by Phe358 may affect possible electrostatic interaction with residues in its neighborhood.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Estructura y función de los carotenoides

Los carotenoides son pigmentos hidrofóbicos, compuestos en su mayoría por una estructura básica formada por una cadena central de 8 unidades isoprénicas (C<sub>40</sub>) con 3 a 15 enlaces conjugados constituyendo una cadena central de polienos. Esta estructura básica puede sufrir una serie de modificaciones tales como ciclaciones de sus extremos terminales, cambios en el nivel de hidrogenación o adición de grupos oxigenados (Britton, 1995; Armstrong y Hearst, 1996). La cadena central de polienos determina la capacidad de actuar como cromóforos captando longitudes de ondas entre 400 y 500 nm, además al ser una zona de alta densidad electrónica, es capaz de reaccionar frente a agentes oxidantes y radicales libres (Britton, 1995; Woodall y col., 2007).

Los carotenoides son los segundos pigmentos más abundantes en la naturaleza y se han descrito más de 700 (Howitt y Pogson, 2006; Giorio y col., 2007). Estos pueden dividirse en dos grupos, aquellos en que su estructura está formada solo por átomos de carbono e hidrógeno y que reciben el nombre de carotenos y los que además presentan grupos funcionales oxigenados que reciben el nombre de xantófilas (Armstrong y Hearst, 1996).

En el caso de plantas y algas los carotenoides son sintetizados y acumulados en plastidios, principalmente dentro de cloroplastos adonde se encuentran asociadas a los sistemas captadores de luz y a los centros de reacción en la membrana tilacoidal (Frank y Cogdell, 1996; Cunningham y Gantt, 1998). En cromoplastos también es

posible encontrar carotenoides asociados a membranas y en el estroma como estructuras cristalinas y asociados a cuerpos grasos (Cunningham y Gantt, 1998; Howitt y Pogson, 2006; Maass y col., 2009).

En organismos fotosintéticos los carotenoides participan como pigmentos accesorios en el proceso de fotosíntesis absorbiendo luz en el rango de 400 y 500 nm, cuya energía posteriormente es transferida a las clorofilas (Armstrong y Hearst, 1996; Frank y Cogdell, 1996). Además, son compuestos claves en la protección contra el estrés oxidativo generado durante la fotosíntesis, a través de la inactivación de agentes oxidantes como la clorofila en su estado triplete, el singlete de oxígeno y el anión superóxido (Frank, 1996; Woodall y col., 1997; Cunningham y Gantt, 1998), y disipando el exceso de energía a través del ciclo de las xantófilas (Frank, 1996; Demmig y Adams, 1996).

En plantas también son precursores de fitohormonas como el ácido abscísico (ABA) y estrigolactonas. El ABA participa en los procesos de dormancia de semillas, desarrollo y diferenciación de células vegetales embrionarias, apertura de estomas, adaptación a condiciones ambientales y en la respuesta frente a patógenos (Zeevaart y Creelman, 1998; Taylor y col., 2000; Vleesschauwer y col., 2010), mientras que las estrigolactonas participan en el establecimiento de relaciones simbióticas con micorrizas, germinación de plantas parásitas y en la inhibición de la ramificación de los brotes (Akiyama y Hayashi, 2006; Besserer y col., 2006; López-Ráez y col., 2008; Yoneyama y col., 2008). Por otro lado, en plantas los carotenoides se acumulan en cromoplastos, plastidios presentes en frutos y flores, otorgando a éstos órganos coloraciones que pueden variar entre el rojo, naranja y amarillo. Esta coloración en flores y frutos es clave en la atracción de organismos dispersores de polen y semillas (Cunningham y Gantt, 1998; Howitt y Pogson, 2006).

En animales, los carotenoides de importancia nutricional son principalmente  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno, dan origen a la rodopsina, ácido retinoico y la vitamina A, los que son esenciales en la función visual de la retina y la diferenciación celular del tejido epitelial (Iwata-Reuyl y col., 2003). Además, su consumo se ha asociado con la disminución en el riesgo de algunos tipos de cáncer, enfermedades vasculares y degeneración macular (Mayne, 1996; Cooper, 2004; Rao and Rao, 2007, Sajilata y col., 2008). Dado que los animales no son capaces de sintetizar carotenoides, deben incorporarlos a través de su dieta (Cazzonelli, 2010).

Es por su importancia biológica y su impacto positivo en la salud humana que en el último tiempo el estudio en la regulación de la biosíntesis de carotenoides ha tomado relevancia (Cunningham, 1998; Hirscheberg y col., 2001; Cunningham, 2002; Naik y col., 2003; Pizarro y Stange, 2009). Esto ha llevado a la identificación de genes claves dentro de la ruta de biosíntesis de carotenoides y los mecanismos moleculares que regulan el flujo metabólico de la misma (Sandmann y col., 2006, Cazzonelli y Pogson, 2010; Rodríguez-Concepción y Stange, 2013), lo que ha permitido a su vez la obtención de nuevas variedades vegetales capaces de acumular altos niveles de carotenoides (Shewmaker y col., 1999; Frasser y col., 2002; Paine y col., 2005; Ducreux y col., 2005; Sandmann y col., 2006).

## **1.2. Biosíntesis de carotenoides en plantas**

Los genes carotenogénicos se encuentran en el núcleo y las proteínas sintetizadas son destinadas a plastidios en donde son modificados post traduccionalmente (Rodermeil, 2001). Cada proteína posee un péptido de tránsito que corresponde a una extensión en el amino terminal de la proteína, el cual permite la

destinación y translocación hacia el estroma del cloroplasto a través del complejo TOC/TIC (Bruce, 2001). Una vez en el estroma, la proteína es procesada y el péptido de tránsito es escindido.

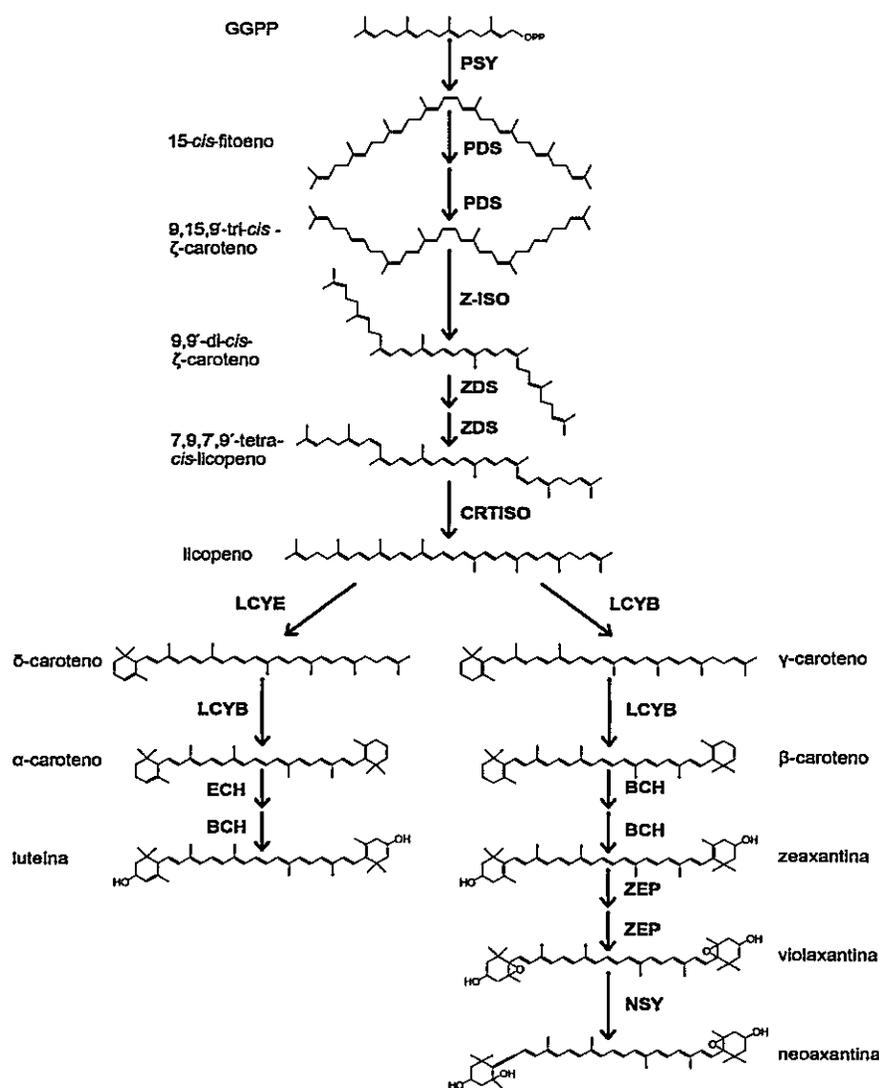
El primer intermediario en la ruta de biosíntesis de carotenoides es geranilgeranil pirofosfato, sintetizado a partir de isopentenil pirofosfato (IPP) por la enzima geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS). El intermediario IPP es sintetizado a través de dos vías independientes: la vía del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) relacionada con la formación de isoprenoides en plastidios y la vía del mevalonato (MVA) relacionada con formación de esteroides en citoplasma. Si bien ambas vías están compartimentadas existe evidencia de una regulación metabólica entre ambas (Stange y Flores, 2011; Vranová y col., 2013).

La primera reacción en la biosíntesis de carotenoides es la condensación de dos moléculas de geranilgeranil pirofosfato (GGPP) formando fitoeno, reacción catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY). En plantas el fitoeno se acumula principalmente como el isómero 15-cis (**figura 1**, Fraser y Bramley, 2004). A continuación el fitoeno sufre dos desaturaciones por parte de las enzimas fitoeno desaturasa (PDS) para formar 9-15-9'-tri-cis- $\zeta$ -caroteno. Luego, la molécula es isomerizada en el doble enlace 15-cis, catalizado por la enzima  $\zeta$ -caroteno isomerasa (Z-ISO) para producir 9-9'-di-cis- $\zeta$ -caroteno, reacción que además puede ser mediada por luz (Chen y col, 2010). 9-9'-di-cis- $\zeta$ -caroteno sufre dos nuevas desaturaciones catalizadas por la enzima  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS) generando 7-9-7'-9'-tetra-cis-neurosporeno. Posteriormente, la molécula sufre dos isomerización catalizadas por la enzima CRTISO llevando finalmente a la formación de licopeno ( $\psi$ ,  $\psi$ -caroteno), la cual también puede ser mediada por luz (Giuliano y col., 2002; Park y col., 2002; Isaacson y col., 2004; Howitt y Pogson, 2006; Chen y col., 2010; Stange y Flores, 2011).

La ciclación de uno o ambos extremos de licopeno marca el primer punto de ramificación de la ruta, por un lado están los carotenoides con dos anillos de ciclohexano beta ( $\beta$ ,  $\beta$ -carotenoides) y aquellos carotenoides con un anillo de ciclohexano beta y épsilon ( $\beta$ ,  $\epsilon$ -carotenoides); carotenoides con dos anillos de ciclohexano épsilon son poco frecuentes (Cunningham y col., 1996). Las enzimas claves en este punto son licopeno  $\beta$ -ciclase (LCYB) que media la introducción de anillos beta, y licopeno  $\epsilon$ -ciclase (LCYE) que cataliza la formación de un anillo épsilon. La rama de los  $\beta$ ,  $\beta$ -carotenoides comienza con la ciclación de un extremo de licopeno, llevando a la formación de  $\gamma$ -caroteno ( $\beta$ ,  $\psi$ -caroteno) seguido de una segunda reacción de ciclación que lleva a la formación de  $\beta$ -caroteno ( $\beta$ ,  $\beta$ -caroteno), ambas reacciones son catalizadas por LCYB (figura 1). En el caso de la rama de los  $\beta$ ,  $\epsilon$ -carotenoides, inicialmente LCYE cataliza la formación de  $\delta$ -caroteno ( $\epsilon$ ,  $\psi$ -caroteno) seguida de una segunda ciclación que lleva a la síntesis de  $\alpha$ -caroteno ( $\beta$ ,  $\epsilon$ -caroteno), reacción catalizada por LCYB (Cunningham y col., 1996; Hirschberg y col., 1997, Stange y Flores, 2011). Luego puede ocurrir la hidroxilación de ambos anillos,  $\epsilon$ -caroteno hidroxilasa (ECH) cataliza la hidroxilación en el anillo épsilon mientras que  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (BCH) cataliza la hidroxilación del anillo beta. De esta manera BCH conduce a la formación de zeaxantina a partir de  $\beta$ -caroteno, mientras ECH y BCH llevan a la síntesis de luteína a partir de  $\alpha$ -caroteno. Zeaxantina puede sufrir una epoxidación en sus dos anillos betas, catalizadas por Zeaxantina epoxidasa (ZEP) llevando a la formación de violaxantina. El paso final en la rama de los  $\beta$ ,  $\beta$ -carotenoides es la formación de neoxantina a partir de violaxantina, reacción catalizada por neoxantina sintasa (NSY) (Cunningham, 2002).

Los apocarotenoides son producidos a partir de la escisión oxidativa de los carotenoides por parte de un grupo de enzimas llamadas dioxigenasas de ruptura de

carotenoides (CCD). Estas moléculas están ampliamente distribuidas en bacterias, hongos, animales, algas y plantas superiores en donde pueden actuar como pigmentos, fitohormonas, odoríferos, o participar en procesos de señalización. En el caso de plantas dos importantes apocarotenoides son las estrigolactonas y el ácido abscísico (ABA) (Auldridge y col., 2006; Huang y col., 2009; Walter y col., 2012).



**Figura 1. Ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas.** GGPP, geraniogeranil pirofosfato; PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; Z-ISO, ζ-caroteno isomerasa; ZDS, ζ-caroteno desaturasa; CRTISO, caroteno isomerasa; LCYB, licopeno β-ciclasa; LCYE, licopeno ε-ciclasa; ECH, ε-caroteno hidroxilasa; BCH, β-caroteno hidroxilasa; ZEP, Zeaxantina epoxidasa; NSY, neoxantina sintasa. (Modificado de Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012).

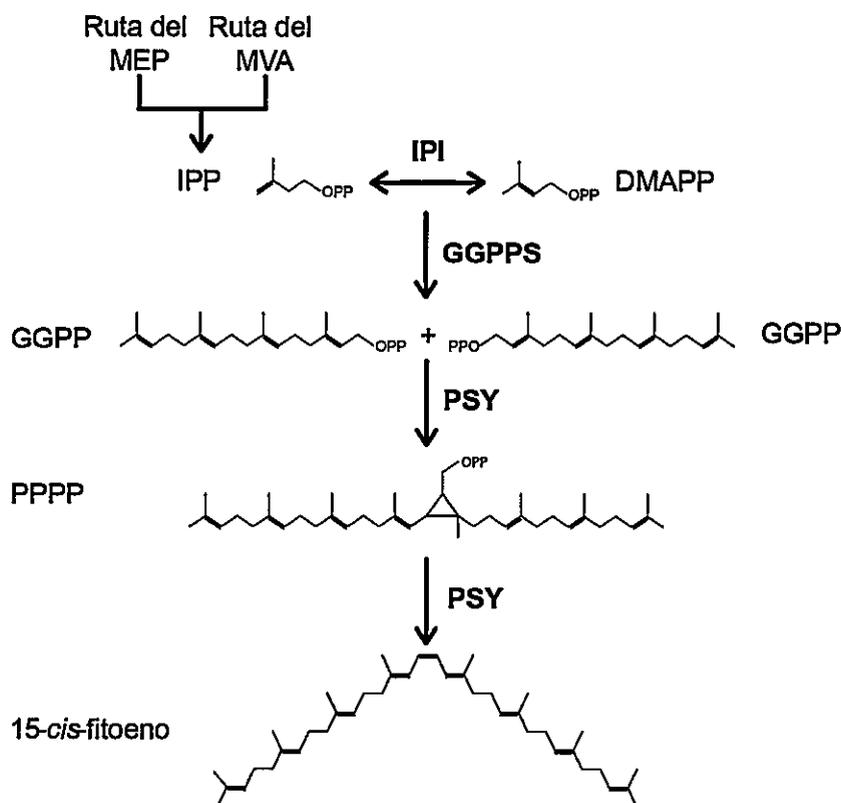
Existe evidencia que las enzimas involucradas en la síntesis de carotenoides se encontrarían formando complejos enzimáticos, y a su vez estos complejos estarían asociados a membranas plastidiales y a plastoglobulos (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012; Shumskaya y col., 2013). Estas interacciones serían claves en la actividad de estas enzimas (Cunningham y Gantt, 1998; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012).

### **1.3. La enzima fitoeno sintasa en plantas**

PSY es una enzima agrupada dentro de la subfamilia de enzimas trans-isoprenil pirofosfato sintasa cabeza-cabeza (TIPPSHH), la cual media la formación de 15-cis fitoeno a partir del precursor GGPP. Esta etapa consta de dos reacciones: la primera es la condensación cabeza-cabeza de dos moléculas de GGPP que conduce a la formación de prefitoeno pirofosfato (PPPP), seguido de la remoción del grupo pirofosfato resultando en 15-cis fitoeno (**figura 2**; Fraser y Bramley, 2004).

Se ha detectado actividad de fitoeno sintasa en fracciones solubles de cromoplastos de tomate (Schofield y Paliyath, 2005) y de pimiento (Dogbo y col, 1988). Sin embargo, existe mayor evidencia mostrando a PSY de manera activa como parte de un complejo enzimático junto a IPI y GGPPS, a su vez asociado periféricamente a membranas de plastidios (Schledz y col., 1996; Fraser y col., 2000; Fraser y Bramley, 2004; Li y col., 2008, Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012; Wang y col., 2013). En el caso de cloroplastos, PSY se encontraría de manera activa asociada a membranas tilacoidales; mientras que en amiloplastos PSY estaría asociada a la membrana de la envoltura plastidial (Li y col, 2008). PSY también puede encontrarse de manera inactiva

formando complejos en el estroma (Schletz y col., 1996) o asociadas a cuerpo prolamelares en etioplastos (Welsch y col, 2000).



**Figura 2. Síntesis de 15-cis-fitoeno.** MEP, metileritrol 4-fosfato; MVA, mevalonato; IPP, isopentenil pirofosfato; DMAPP, dimetilalil difosfato; IPI, isopentenil pirofosfato isomerasa; GGPPS, geranylgeranyl pirofosfato sintasa; GGPP, geranylgeranyl pirofosfato; PPPP, prefitoeno pirofosfato; PSY, fitoeno sintasa.

La presencia de parálogos de genes carotenogénicos es común en plantas y se ha reportado en especies de tomate, arroz, maíz y zanahoria, entre otras. Además, se ha descrito que puede existir una regulación distinta entre cada parálogo, lo que llevaría a roles especializados entre estos (Ahrazem y col., 20010; Welsch y col., 2010). En el caso de *Solanum lycopersicum* se ha descrito que PSY1 es responsable principalmente de la síntesis de carotenoides en frutos, mientras que PSY2 lo es en

hoja. En tanto, en *Zea mays* y *Oryza sativa* se ha descrito que de los tres parálogos de PSY existentes, PSY1 y PSY2 participan en la síntesis de carotenoides en toda la planta y sólo PSY3 está involucrado en la síntesis de ABA en respuesta a estrés (Welsch y col., 2008, Li y col., 2008).

El nivel de expresión de PSY se ha asociado al aumento en el nivel de carotenoides durante el desarrollo de frutos (Ronen y col., 1999; Fraser y col., 1999; Giovannoni, 2001; Kato y col., 2004; Tao y col., 2007) y flores (Hirscheberg, 2001; Moehs y col., 2001; Zhu y col., 2002). Por otro lado, en el proceso de fotomorfogénesis en plántulas de *Sinapis alba* y *Arabidopsis thaliana*, durante el cual se incrementan los niveles de carotenoides y clorofilas, existe un aumento en la expresión de PSY asociado a luz y que es mediado por fitocromo A (PHYA) (von Lintig y col., 1997). Por otro lado, se ha reportado en *O. sativa* un aumento en la expresión de PSY3 mediado por ABA, mientras que en *A. thaliana* la sobreexpresión de PSY lleva al aumento en el nivel de transcrito de Desoxixilulosa 5-fosfato sintasa (DXS), mediando de esta forma un aumento en el nivel de los precursores de la ruta carotenogénica en la vía del MEP (Cazzonelli y Pogson, 2010). Lo anterior se condice con estudios del promotor de PSY de *A. thaliana* y *Daucus carota*, donde se han encontrado elementos de respuesta a luz y ABA (Welsch, y col., 2003; Fuentes, 2012)

Sin embargo, el aumento en el nivel de transcrito no implica un aumento en la actividad de PSY. En plántulas de *A. thaliana* y *S. alba* el aumento en la actividad de PSY, ocurre cuando además existen condiciones que permitan la síntesis de clorofila (luz blanca). Bajo estas condiciones PSY pasa de una forma inactiva asociada a cuerpos prolamelares, a una forma activa asociada a membrana tilacoidales (Welsch y col., 2000). A lo anterior se suman estudios que indican que la expresión de PSY es limitante en tejidos no fotosintéticos, donde la acumulación de carotenoides ocurre en

estructuras cristalinas; sin embargo, en tejidos fotosintético donde existe una activación de PSY que depende de un proceso de desarrollo de los cloroplastos, la expresión de PSY no tendría un papel limitante dentro de la ruta carotenogénica (Maass y col., 2009)

Existen variedades de maíz (*Zea mays*) capaces de acumular carotenoides en el endospermo y de yuca (*Manihot esculenta*) que acumulan carotenoides en la raíz; en ambos casos la acumulación de carotenoides se debe a que presentan alelos de PSY en que sólo un nucleótido cambia respecto a los alelos presentes en variedades blancas que no acumulan carotenoides (Welsch y col., 2010; Shumskaya, y col, 2012). A estos antecedentes se suma el trabajo de Gady (Gady y col., 2012) en que a través de una mutación puntual que llevó a la sustitución de un residuo en PSY1 de tomate (*S. lycopersicum*), obtuvieron una disminución en el nivel de carotenoides en el fruto de tomate. Si bien el cambio en un residuo aminoacídico puede implicar un cambio en la actividad de la enzima, como se vio en el caso de *M. esculenta* (A191D) (Welsch y col., 2010), esto no siempre implica que exista un cambio en los niveles de carotenoides. En este sentido, el tipo de plastidio y la localización de PSY dentro de éstos, es tanto o más determinante en la acumulación de carotenoides (Schledz y col., 1996; Welsch y col., 2000; Shumskaya y col., 2013). Lo anterior se observó en *Z. mays* donde la sustitución de un residuo (Thr257Pro) en ZmPSY2 llevó a un cambio en su localización, a la modificación en la estructura de los plastoglóbulos y a la falta de carotenoides en el endospermo (Shumskaya y col., 2012). Considerando estos antecedentes, en el presente seminario de título realizamos el modelamiento *in silico* de MdPSY3 y las variantes polimórficas de MdPSY2 para predecir posibles cambios conformacionales producto de la sustitución Tyr358Phe, que puedan afectar a la interacción de MdPSY2 con el sustrato.

Es por su importancia dentro de la ruta carotenogénica y por codificar una enzima altamente regulada, que *PSY* ha sido usada en programas de mejoramiento genético en plantas en conjunto con otros genes carotenogénicos para aumentar la cantidad de carotenoides, en especial  $\beta$ -caroteno (Maass y col., 2009; Cazzonelli y col., 2010; Welsch y col., 2010; Couso y col., 2011).

#### **1.4. *Malus domestica* y los genes carotenogénicos.**

La manzana doméstica (*Malus domestica*) es una especie arbórea perteneciente a la familia *Rosaceae* y agrupadas dentro de la subfamilia *Amygdaloideae* donde se incluyen además peras, membrillos y nísperos. Su flor es autoincompatible y el fruto recibe el nombre de pomo, el que se caracteriza por tener de 2 a 5 carpelos encerrados en una cubierta carnososa (hipanto). Son plantas diploides ( $2n=34$ ) y su genoma, secuenciado en el 2010, es de 750 Mb (Hofer y col., 2010; Velasco y col., 2010). El ancestro común de las variedades actuales de manzano es *Malus sieversii*, el cual es originario de Asia central, en la región de Kazajistán (Janick y col., 1996; Cornille y col., 2012). La historia evolutiva del género *Malus* se encuentra estrechamente relacionada con la historia del hombre. Existe evidencia arqueológica de su cultivo de hace 3.000 años por parte de los Romanos; sin embargo, su recolección se remonta hace 11.200 años y fueron los primeros pueblos nómades en Asia central los responsable de dispersar semillas de manzana hacia regiones de Europa y Asia oriental (Harris, 2002; Cornille y col., 2012). Las variedades actuales de manzana son el resultado de un largo proceso de domesticación que ha involucrado procesos de hibridación e introgresión (Harris, 2002; Cornille y col., 2012) y que ha

llevado a un extenso flujo génico entre variedades cultivadas y silvestres (Cornille y col., 2014).

Actualmente, su fruto es uno de los más ampliamente consumidos en el mundo principalmente por la variedad de formas en que puede ser consumido y por su alto valor nutricional que incluye flavonoides, vitamina C y alto contenido de fibra (Janick y col., 1996). Sin embargo, el contenido de carotenoides en el hipanto del fruto es muy bajo (6  $\mu\text{g/g}$  peso seco). A pesar de ello, en *M. domestica* se expresan todos los genes involucrados en la ruta carotenogénica (Ampomah-Dwamena y col., 2012; Cerda, 2013) y se observa la presencia de genes parálogos que muestran una expresión tejido específica. Por otro lado, resultados obtenidos en nuestro grupo muestran que de los dos genes de licopeno  $\beta$ -ciclasea identificados, *MdLCYB1* muestra una expresión preferente en hojas, mientras que *MdLCYB2* muestra una expresión principalmente en frutos; y de los cuatro posibles genes de *PSY* identificados, *MdPSY1* y *MdPSY2* se expresan preferentemente en frutos, a diferencia de *MdPSY3* y *MdPSY4* que lo hacen en hojas. Cabe destacar que la expresión de *MdPSY1* y *MdPSY4* es 2 y 3 ordenes menor, respectivamente, en comparación al resto de los genes carotenogénicos. Sumado a esto, logramos evaluar a través de complementación heteróloga la funcionalidad de *MdLCYB1* y *MdLCYB2*, siendo solo *MdLCYB1* capaz restituir la ruta carotenogénica en una cepa de *E. coli* mutante en *LCYB* (Díaz, 2013).

En el último tiempo ha existido un creciente interés en la generación de nuevas variedades vegetales, que entre otras cosas sean capaces de acumular altos niveles de carotenoides, supliendo de esta forma las necesidades nutricionales de una creciente población (Beyer, 2010; Welsch y col., 2010, Ampomah-Dwamena y col., 2012; Bhullar y Gruissem, 2013; Shumskaya y col., 2013). Lo anterior sumado al alto consumo de manzanas en el mundo y al impacto de Chile dentro de la exportación

mundial de éstas, hace de *M. domestica* un excelente candidato en la aplicación de técnicas biotecnológicas que permitan un enriquecimiento de su valor nutricional.

Enmarcado en el proyecto FONDEF D1011022, nuestro grupo está interesado en entender la biosíntesis de carotenoides en frutos de *M. domestica* con el fin de generar variedades de manzanas capaces de acumular altos niveles de carotenoides en el hipanto del fruto.

### 1.5. *Escherichia coli* como modelo de complementación heteróloga

*Escherichia coli* es un modelo ampliamente usado a nivel experimental, médico e industrial. Algunas de las razones son su fácil manejo, bajo costo de manipulación, rápida tasa de crecimiento, facilidad de transformación, secuenciación de su genoma y el acceso a mutantes (Blattner y col, 1997). Entre las tecnologías asociadas a *E. coli* se encuentran el diseño de sistemas de expresión que permiten el clonamiento de genes de interés en *E. coli* y que además redireccionan el flujo metabólico de la bacteria hacia la expresión y posterior síntesis del producto génico. Uno de los sistemas de expresión es el sistema pET (Novagen) basado en el promotor de la ARN polimerasa del bacteriofago T7, el cual es inducible por Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

Modelos mutantes de *Rhodobacter capsulatus* (Bartley y col., 1990) y el clonamiento de la ruta carotenogénica de *Erwinia uredovora* en *E. coli* (Misawa y col., 1990) han permitido evaluar la funcionalidad de genes carotenogénicos a través de complementación heteróloga (Bartley y col., 1992; Cunningham y Gantt, 2000; Niklitschek y col., 2008; Song y col., 2013; Díaz, 2013). Entre las ventajas de evaluar genes carotenogénicos en sistemas bacterianos, se puede mencionar la simplicidad en



la ruta carotenogénica de bacterias puesto que no posee puntos de ramificación como en plantas y además la ruta involucra tan solo 5 enzimas que median el paso desde GGPP hasta zeaxantina (Misawa y col., 1990). Estas razones nos permitieron elegir este sistema para evaluar en el presente trabajo la funcionalidad de los genes PSY de manzana: *MdPSY3* y *MdPSY2*, incluyendo dos mutantes de *MdPSY2*: *MdPSY2\_CG*, *MdPSY2\_F*.

## 1.6. Objetivos

### 1.6.1. Objetivo general

- Estudiar la funcionalidad de los genes *MdPSY3* y *MdPSY2* de *M. domestica*, incluyendo las mutantes de *MdPSY2* (*MdPSY2\_CG* y *MdPSY2\_F*)

### 1.6.2. Objetivos específicos

1. Generar vectores de expresión que contengan los marcos abierto de lectura de *MdPSY3*, *MdPSY2* y de las mutantes *MdPSY2\_CG* y *MdPSY2\_F*, para evaluar su funcionalidad mediante complementación heteróloga.
2. Evaluar la composición de carotenoides a través de RP-HPLC en la cepa recombinante de *E. coli* pDS1B  $\Delta crtB$ , transformada con las construcciones obtenidas en (1).
3. Modelar la estructura terciaria de *MdPSY3*, *MdPSY2* y la mutante *MdPSY2\_F* a través de modelamiento por homología, con el fin de entender cómo la mutación Tyr358Phe puede afectar la actividad de *MdPSY2*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Reactivos

Se emplearon reactivos de calidad adecuada para las técnicas de biología molecular desarrolladas a lo largo del presente trabajo. Estos fueron obtenidos de empresas y marcas registradas como Invitrogen, Thermo Scientific, Sigma-Aldrich, Promega, US Biological, MO BIO Laboratories Inc., Axygen, BioRad, Novagen y Merck.

### 2.2. Material Biológico

#### 2.2.1. Partidores

Los partidores diseñados en las reacciones de PCR realizadas durante el presente seminario de título se listan en la tabla I.

Tabla I. Partidores diseñados y usados en este seminario.

Partidor	Secuencia (5'-3')	Descripción	Referencia
MdPSY2 sentido	GGA TCC ATG TCA GGT GTT CTA CTC TGG	Ambos partidores fueron diseñados para la amplificación del marco abierto de lectura (ORF) de todas las variantes de <i>MdPSY2</i> , desde ADNc de <i>M. domestica</i> . Fragmento de amplificación: 1206pb	Cerde, 2013
MdPSY2 antisentidos	GTC GAC TCA TCT AAG CAC CAA CTG C		
MdPSY3 sentido	GGA TCC ATG TCT GTG GCA TTA GTT TGG T	Ambos partidores fueron diseñados para la amplificación del marco abierto de lectura (ORF) de <i>MdPSY3</i> , desde ADNc de <i>M. domestica</i> . Fragmento de amplificación: 1401pb	Cerde, 2013
MdPSY3 antisentido	TCA AAG ATT GTA TTT TCT AAG CTC TGG AGA GGT		Cerde, 2013

## 2.2.2. Vectores, plásmidos y cepas

En el presente trabajo se usaron cepas de *E. coli* transformadas con diferentes plásmidos, en las tablas II y III se encuentra un detalle de estos.

**Tabla II. Plásmidos utilizados y construidos en el presente trabajo.**

Plásmido	Descripción	Referencia
pCR8/GW/TOPO	(pCR8) Vector de clonamiento abierto, con extremos 3' cohesivos de desoxitimidina y topoisomerasa I unida covalentemente. Posee origen de replicación pUC y resistencia a espectinomicina.	Invitrogen
pET28a	Vector de expresión inducible por IPTG. Posee el promotor T7, el operador lac y un sitio de unión a ribosoma. Además posee el inhibidor <i>lacI</i> , origen de replicación f1 y resistencia a Kanamicina.	Novagen
pDS1B	Plásmido con 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. uredoovora</i> . Posee resistencia a cloranfenicol.	Niklitschek y col., 2008
pDS1B $\Delta$ <i>crtB</i>	Plásmido con los genes de la ruta carotenogénica de <i>E. uredoovora</i> presentando una escisión de 522 pb en el gen <i>crtB</i> (ortólogo de <i>PSY</i> de plantas). Posee resistencia cloranfenicol.	Niklitschek y col., 2008
pCR8/ <i>MdPSY2_CG</i>	pCR8 clonado con el ADNc del marco abierto de lectura del gen mutante <i>MdPSY2_CG</i> , el cual presenta una escisión de 18 pb entre las bases 91 y 110, y tres sustitución de adenina, guanina y timina en las posiciones 121, 468 y 1073 respectivamente (91_110del, 121G>A, 468A>G, 1073A>T). Posee resistencia a espectinomicina.	Cerda, 2013 (no publicado)
pCR8/ <i>MdPSY2_F</i>	pCR8 clonado con el ADNc del marco abierto de lectura del gen mutante <i>MdPSY2_F</i> , el cual presenta una sustitución de timina en la posición 1073 (1073A>T). Posee resistencia a espectinomicina.	Cerda, 2013 (no publicado)
pCR8/ <i>MdPSY2</i>	pCR8 clonado con el ADNc del marco abierto de lectura del gen <i>MdPSY2</i> . Posee resistencia a espectinomicina.	Cerda, 2013 (no publicado)
pET28/ <i>MdPSY3</i>	pCR8 clonado con el ADNc del marco abierto de lectura del gen <i>MdPSY3</i> . Posee resistencia a kanamicina.	Cerda, 2013 (no publicado)
pET28/ <i>MdPSY2_CG</i>	pCR8 clonado con el ADNc del marco abierto de lectura del gen mutante <i>MdPSY2_CG</i> . Posee resistencia a kanamicina.	Presente trabajo
pET28/ <i>MdPSY2_F</i>	pCR8 clonado con el ADNc del marco abierto de lectura del gen mutante <i>MdPSY2_F</i> . Posee resistencia a kanamicina.	Presente trabajo
pET28/ <i>MdPSY2</i>	pCR8 clonado con el ADNc del marco abierto de lectura del gen <i>MdPSY2</i> . Posee resistencia a kanamicina.	Presente trabajo

Tabla III. Cepas de *E. coli* utilizadas y obtenidas en el presente trabajo.

Cepa	Descripción	Referencia
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> .	Sambrook y col., 1989
BL-21 pDS1B	Cepa BL-21 de <i>E. coli</i> transformada con el plásmido pDS1B, el cual posee los genes de la ruta de síntesis de $\beta$ -caroteno de <i>E. uredoavora</i> . Presenta coloración naranja por la acumulación de $\beta$ -caroteno.	Niklitschek y col., 2008
BL-21 pDS1B $\Delta$ <i>crtB</i>	Cepa BL-21 de <i>E. coli</i> transformada con el plásmido pDS1B $\Delta$ <i>crtB</i> , el cual posee una escisión en el gen <i>crtB</i> , ortólogo del gen <i>PSY</i> de plantas. Presenta coloración blanca por no presentar $\beta$ -caroteno.	Niklitschek y col., 2008
pCR8/MdPSY2_CG	Cepa DH5 $\alpha$ transformada con el plásmido pCR8/MdPSY2_CG. Posee resistencia a espectinomicina.	Cerda A., 2013 (no publicado)
pCR8/MdPSY2_F	Cepa DH5 $\alpha$ transformada con el plásmido pCR8/MdPSY2_F. Posee resistencia a espectinomicina.	Cerda A., 2013 (no publicado)
pCR8/MdPSY2	Cepa DH5 $\alpha$ transformada con el plásmido pCR8/MdPSY2. Posee resistencia a espectinomicina.	Cerda A., 2013 (no publicado)
3	Cepa DH5 $\alpha$ transformada con el plásmido pET28/MdPSY3. Posee resistencia a Kanamicina.	Cerda A. 2013
CG2	Cepa DH5 $\alpha$ transformada con el plásmido pET28/MdPSY2_CG. Posee resistencia a Kanamicina.	Presente trabajo
F1	Cepa DH5 $\alpha$ transformada con el plásmido pET28/MdPSY2_F. Posee resistencia a Kanamicina.	Presente trabajo
Y1	Cepa DH5 $\alpha$ transformada con el plásmido pET28/MdPSY2. Posee resistencia a Kanamicina.	Presente trabajo
G2.1	Cepa BL-21 pDS1B $\Delta$ <i>crtB</i> transformada con el plásmido pET28/MdPSY2_CG. Posee resistencia a Kanamicina y cloranfenicol.	Presente trabajo
F1.1	Cepa BL-21 pDS1B $\Delta$ <i>crtB</i> transformada con el plásmido pET28/MdPSY2_F. Posee resistencia a Kanamicina y cloranfenicol.	Presente trabajo
Y1.1	Cepa BL-21 pDS1B $\Delta$ <i>crtB</i> transformada con el plásmido pET28/MdPSY2. Posee resistencia a Kanamicina y cloranfenicol.	Presente trabajo
3.1	Cepa BL-21 pDS1B $\Delta$ <i>crtB</i> transformada con el plásmido pET28/MdPSY3. Posee resistencia a Kanamicina y cloranfenicol.	Presente trabajo

### 2.2.3. Medio de cultivo bacteriano

Los cultivos bacterianos fueron realizados en medio Luria-Bertani (LB) líquido, compuesto por NaCl 0,8% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), triptona 1% (p/v) y suplementado con el antibiótico de selección correspondiente (tabla III). En el caso de

cultivos en placa se usó LB con agar-agar 1,6% (p/v) también suplementado con el antibiótico de selección adecuado. Los cultivos fueron incubados a 37 °C durante 16 h y con agitación constante de 200 rpm en el caso de los cultivos líquidos.

### **2.3. Metodologías**

A continuación se detallarán los procedimientos llevados a cabo en el presente seminario, con el fin de evaluar la funcionalidad de *MdPSY3*, *MdPSY2* y de las secuencias mutantes *MdPSY2\_F* y *MdPSY2\_CG* de *M. domestica*.

#### **2.3.1. Métodos de Biología Molecular**

##### **2.3.1.1. Extracción de ADN plasmidial**

Para la extracción de ADN plasmidial se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante del kit Axyprep™ (Axygen). El ADN plasmidial fue utilizado en los ensayos de digestión enzimática, ligación y transformación.

La pureza y concentración de las muestras de ADN plasmidial obtenidas, fueron determinadas a través del espectrofotómetro NanoVue™ Plus.

##### **2.3.1.2. Digestión enzimática**

Se realizaron ensayos de digestión enzimática con las enzimas *Bam*HI y *Sal*I con el fin de liberar el fragmento de interés desde las construcciones derivadas de pCR8 (tabla II) y para linealizar el vector pET28. Posteriormente, se confirmó la orientación y presencia del fragmento de interés clonado en el vector pET28 con la

enzima *Ava*I. Todas las reacciones de digestión se hicieron según las indicaciones del proveedor (Thermo Scientific).

### **2.3.1.3. Electroforesis en geles de agarosa y purificación de bandas de ADN desde geles**

La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1,5% (p/v) diluidos en TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8) a 90 V durante 50 min. Previamente a ser cargadas en el gel, las muestras se mezclaron en una relación 5:1 con un tampón de carga (10 mM tris-HCl a pH 7,6, azul de bromofenol 0,03%, xilen cianol FF 0,03%, glicerol 60% y EDTA 60 mM). Se usó Gene Ruler de 1 Kb (Invitrogen) como estándar de peso molecular. Posteriormente, los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio 1 µg/mL durante 20 min y se visualizaron en el transiluminador GeneGenius Classic (SynGene).

Con el fin de clonar las bandas de interés, éstas fueron escindidas y purificadas desde el gel de agarosa con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **2.3.1.4. Clonación de *MdPSY3*, *MdPSY2* incluyendo las mutantes *MdPSY2\_F* y *MdPSY2\_CG*, en el vector de expresión pET28a**

Una vez que los fragmentos de interés fueron liberados desde pCR8 (sección 2.3.1.2) y posteriormente purificados (sección 2.3.1.3), éstos fueron ligados al vector de expresión pET28a en los sitios de restricción *Bam*HI y *Sal*I. La reacción de ligación se llevó a cabo con la enzima T4 ADN ligasa (New England Biolabs) según las indicaciones del proveedor y usando una relación molar entre vector e inserto de 1:5.

Posteriormente, el producto de ligación fue usado para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante golpe térmico (sección 2.3.1.7). Luego, las bacterias se sembraron en placas de LB en presencia de kanamicina como agente de selección del vector pET28a (tabla II). Las colonias fueron seleccionadas por PCR de colonia (sección 2.3.1.5) y la direccionalidad del fragmento de interés fue verificada por digestión enzimática con Aval.

### 2.3.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó PCR de colonias con el fin de verificar la presencia del fragmento de interés en las colonias transformadas con las construcciones pET28/MdPSY2\_CG, pET28/MdPSY2\_F, pET28/MdPSY2 y pET28/MdPSY3. Para esto se usó la enzima *Taq* ADN polimerasa (Sigma-Aldrich) y los partidores indicados en la tabla I. Como plantilla se usó 1  $\mu$ L de colonias que se tomaron y diluyeron en 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril. Todas las reacciones se llevaron a cabo según las indicaciones del proveedor en el termociclador MyCycler™ de BioRad. El programa usado para todas las reacciones se detalla en la tabla IV.

**Tabla IV. Programa de PCR de colonia usado.**

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Denaturación inicial	95	5	1
Denaturación	95	0,5	35
Hibridación	54	0,5	
Extensión	68	1,5	
Extensión final	68	5	1
	10	$\infty$	1

### 2.3.1.6. Preparación de cepas de *E. coli* quimiocompetentes

Se prepararon células quimiocompetentes de cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  y pDS1B  $\Delta crtB$  (tabla III) con el fin de propagar las construcciones derivadas de pET28 y realizar los ensayos de complementación, respectivamente. Para esto se inoculó 1 mL de un cultivo de 16 h en 250 mL de LB y se dejó creciendo a 37 °C con agitación moderada hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,3. Posteriormente, el cultivo fue separado en tubos falcon de 50 mL y centrifugado a 3.000 g por 10 min. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue suspendido cuidadosamente en 5 mL de CCMB80 frío (KCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub> 10 mM a pH 7, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 80 mM, MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 10 mM, glicerol 10% y ajustado a pH 6,4 con HCl), una vez suspendido se llevó a un volumen final de 20 mL y se incubó 20 min en hielo. Se centrifugó a 2.000 g por 8 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y luego el precipitado fue cuidadosamente suspendido en 10 mL de CCMB80 frío. Se midió la DO<sub>600</sub> de 200  $\mu$ L más 800  $\mu$ L de LB y se agregó CCMB80 frío hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> entre 1 y 1,5. Finalmente, las células fueron incubadas 20 min en hielo y se prepararon alícuotas de 100  $\mu$ L en tubos Eppendorf fríos de 1,6 mL. Las células se mantuvieron a -80 °C hasta su uso.

### 2.3.1.7. Transformación de cepas de *E. coli* quimiocompetentes

Células quimiocompetentes de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , fueron descongeladas en hielo y se agregaron 2  $\mu$ L del producto de ligación (sección 2.3.1.4). Luego se incubaron en hielo durante 30 min, seguido de un golpe de calor de 1 min a 42 °C y luego se incubaron en hielo durante 2 min. Se agregó 900 mL de LB a cada tubo y se dejó incubando durante 1 h a 37 °C bajo agitación moderada. El cultivo fue centrifugado a 6.500 rpm por 5 min, el sobrenadante fue descartado y el precipitado fue

suspendido en 100  $\mu$ L de LB para luego ser sembrado sobre LB sólido suplementado con kanamicina 50  $\mu$ g/mL. Las placas fueron incubadas de forma invertida durante 16 h a 37 °C.

Se verificó la presencia de la construcción y orientación del gen a través de PCR de colonias (sección 2.3.1.5) y ensayos de digestión con *Ava*I (sección 2.3.1.2). Finalmente, se seleccionó una colonia portadora de cada una de las construcciones pET28/*MdPSY2\_CG*, pET28/*MdPSY2\_F* y pET28/*MdPSY2*.

### 2.3.1.8. Complementación de la cepa de *E. coli* BL-21 pDS1B $\Delta$ *crtB*

Células quimiocompetentes de *E. coli* BL-21 pDS1B  $\Delta$ *crtB* fueron transformadas de acuerdo a lo descrito en la sección 2.3.1.7, con los plásmidos pET28/*MdPSY2\_CG*, pET28/*MdPSY2\_F*, pET28/*MdPSY2* obtenidos desde los clones seleccionados y pET28/*MdPSY3* facilitado por Ariel Cerda (Cerda A., 2013). Como control positivo de la complementación, se usaron cepas de *E. coli* BL-21 pDS1B que poseen los genes de la ruta de síntesis de  $\beta$ -caroteno de *E. uredo*vora y como control negativo se usaron células de *E. coli* BL-21 pDS1B  $\Delta$ *crtB*, transformadas con el vector pET28 vacío. Para esto se usó la cepa de *E. coli* BL21 pDS1B  $\Delta$ *crtB*, la cual contiene el vector pDS1B con la ruta carotenogénica de *E. uredo*vora y una escisión de 522 pb en el gen *crtB*, ortólogo bacteriano de *PSY* (Niklitschek y col, 2008). El fenotipo de *E. coli* BL21 pDS1B  $\Delta$ *crtB* es blanco puesto que no es capaz de acumular carotenoides; sin embargo, al complementar la ruta con una copia funcional de *PSY*, la cepa es capaz de acumular carotenoides cambiando su fenotipo a una coloración anaranjada.

Las células transformadas fueron sembradas en placas con medio LB sólido suplementado con kanamicina 50  $\mu$ g/mL, cloranfenicol 34  $\mu$ g/mL e IPTG 1 mM y se

incubaron en oscuridad a 28 °C durante 48 h. Fueron seleccionadas aquellas colonias que presentaron una coloración anaranjada

### **2.3.2. Extracción y análisis de carotenoides**

#### **2.3.2.1. Preparación del cultivo.**

Se preparó un preinóculo de los clones seleccionados y del control negativo en LB suplementado con kanamicina 100 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL, en el caso del control positivo el medio fue suplementado sólo con cloranfenicol 34 µg/mL. Todos los preinóculos fueron incubados a 37 °C, durante 16 h y con agitación moderada. Se agregó 3 mL del preinóculo a 200 mL de medio LB y se incubó a 37 °C con agitación moderada hasta alcanzar una  $DO_{600}$  entre 0,5 y 0,8. Luego, los cultivos fueron separados en dos matraces y a uno de los dos se le agregó IPTG hasta una concentración de 1 mM. Los cultivos fueron incubados en oscuridad a 28 °C durante 42 h y con agitación de 200 rpm. Todo el procedimiento fue realizado en triplicado.

#### **2.3.2.2. Determinación del peso seco**

De los 100 mL de cultivo (con y sin IPTG) se tomaron 15 mL en tubos falcon de 15 mL previamente pesados y se centrifugaron a 3.500 g durante 15 min. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue secado a 50 °C durante 24 h. Posteriormente, se pesaron los tubos con los precipitados secos y se determinó el peso de éstos, restándoles el peso de los tubos vacíos.

### 2.3.2.3. Extracción de carotenoides

Los 85 mL del cultivo restante, fueron separados en dos tubos falcon de 50 mL y centrifugados a 3.500 g durante 15 min. Luego, el sobrenadante fue descartado y el precipitado fue suspendido en 7 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> por agitación en vortex. Se traspasó a tubos falcon de 15 mL, se centrifugó a 4.000 g por 10 min y luego el sobrenadante fue descartado. Luego, se agregó 0,5 mL de perlas de vidrio de 0,5 mm, 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y se agitó en vortex a máxima velocidad por 5 min. A continuación se agregó 1 mL de acetona, se agitó en vortex a máxima velocidad por 5 min y se centrifugó a 4.000 g durante 10 min para luego recolectar el sobrenadante en tubos falcon de 15 mL (éste paso se repitió 3 veces). Se agregó 2 mL de acetona a la fase colectada, se agitó en vortex a máxima velocidad, se centrifugó a 4.000 g por 5 min y se rescató la fase superior (este paso se repitió 3 veces). El sobrenadante colectado fue traspasado a tubos pyrex con tapa y se agregó 2 mL de éter de petróleo, luego fue agitado en vortex a máxima velocidad y se centrifugó a 4.000 g durante 5 min. La fase orgánica superior que contenía β-caroteno fue rescatada y traspasada a tubos de vidrio para posteriormente ser secada con N<sub>2</sub> gaseoso. Finalmente, los pigmentos fueron suspendidos en 1 mL de acetona y guardados a -80 °C hasta su uso.

### 2.3.2.4. Cuantificación y determinación de la composición de carotenoides

La cuantificación de carotenoides totales fue realizada a través de espectrofotometría, según lo descrito por Lichtenthaler H. y Buschmann C., 2001.

La determinación de la composición de carotenoides en las muestras de cultivo bacterianos se realizó a través de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) utilizando una columna cromatográfica 100 RP 18-5μ 150 x 4,6 mm

(MultiHigh®) con una bomba de flujo LC-20AT (Shimadzu) y un detector con arreglo de fotodiodos SPD-M20A (Shimadzu). Se utilizó una fase móvil compuesta de acetonitrilo, metanol e isopropanol en una razón de 17:2:1 con un flujo de 1,5 mL/min durante 60 min a temperatura ambiente y en condiciones isocráticas. El análisis de los carotenoides se realizó a 474 nm y fueron identificados en función de su tiempo de retención y espectro de absorción. Los datos registrados fueron analizados con el programa Labsolutions 5.42 SP3 (Shimadzu).

#### **2.3.2.5. Análisis estadístico**

El valor de la cuantificación de carotenoides corresponde al promedio de siete réplicas experimentales para el caso de los clones transformados con *pET28/MdPSY2*, *pET28/MdPSY2\_F*, *pET28/MdPSY3*; seis replicas para el clon transformado con *MdPSY2\_CG*; cuatro replicas para el control positivo y 3 réplicas para el control negativo. Los gráficos y análisis estadísticos de los datos, fueron realizados con el programa GraphPad Prism versión 6.01. Se usó ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls, con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ .

### 2.3.3. Bioinformática

#### 2.3.3.1. Análisis de la secuencias de MdPSY3, MdPSY2 y las mutantes MdPSY2\_F y MdPSY2\_CG

El alineamiento múltiple entre las secuencias aminoacídicas de PSY se realizó a través de ClustalO (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y su posterior edición se realizó a través del programa Jalview 2.8 (Waterhouse A. y col, 2009) e Illustrator CS6.

Por otro lado, la predicción del péptido de transito se llevó a cabo con ayuda de los programas ChloroP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) y TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>).

#### 2.3.3.2. Modelamiento *in-silico* de las secuencias aminoacídicas de MdPSY3, MdPSY2 y la mutantes MdPSY2\_F

La predicción de la estructura terciaria de las secuencias estudiadas se realizó a través de modelamiento por homología.

Para el modelamiento fueron identificados a través de PSI-BLAST ([blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)), tres moldes con estructura terciaria determinada por cristalografía de rayos-x, disponibles en la base de datos de PDB ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). Estas fueron: escualeno sintasa de *Alicyclobacillus acidocaldarius*, 4HD1 (Chang C. y col., 2012); dehidroescualeno sintasa de *Staphylococcus aureus*, 2ZCO (Liu C. I. y col., 2008) y escualeno sintasa de *Homo sapiens*, 3VJ8 (Liu C. I. y col., 2012). El porcentaje de identidad entre los moldes y las secuencias de MdPSY2 son: 28% para 4HD1, 25% para 2ZCO y 22% para 3VJ8; en el caso de MdPSY3: 29% para 4HD1, 26% para 2ZCO y 20% para 3VJ8.

El modelamiento fue realizado tomando el alineamiento múltiple realizado a través de ClustalO (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) entre los moldes y cada una de las secuencias de interés (MdPSY2, MdPSY2\_F y MdPSY3), sin considerar la región amino terminal correspondiente al péptido de tránsito. Los modelos fueron generados mediante el programa Modeller (versión 9.13)

Los modelos obtenidos para cada secuencia fueron posteriormente refinados a través de los servidores 3Drefine (<http://sysbio.met.missouri.edu/3Drefine>) y KoBaMIN (<http://csb.stanford.edu/kobamin>); por un lado 3Drefine optimiza los puentes de hidrógeno y realiza una minimización de energía a través de la modificación de parámetros que involucran la torsión, ángulo y giro de enlaces (Bhattacharya y Cheng, 2013), mientras que KoBaMIN considera esto último y además realiza una minimización de energía potencial (Summa y Levitt, 2007; Chopra y col. 2010). Los modelos refinados fueron evaluados a través del servidor ModFOLD4 (<http://www.reading.ac.uk/bioinf/ModFOLD>) el cual realiza una aproximación al mejor modelo a partir de las características estructurales y perfiles de energía de todos los modelos generados (aproximación de agrupamiento) (McGuffin y col., 2013) y finalmente fue seleccionado uno para cada secuencia en función del puntaje obtenido. Posteriormente, se evaluaron las regiones funcionales de los modelos obtenidos y éstas fueron comparadas con las regiones de los moldes a través del servidor Verify3D, el cual realiza una evaluación en función de la compatibilidad entre la secuencia y la estructura del modelo (Eisenberg y Bowie, 1997). Un esquema con los pasos realizados se muestra en la **figura 3**.

Los modelos seleccionados fueron visualizados y editados a través de VMD y se realizó una superposición de éstos a través del programa Multiseq, incluido en VMD. Se comparó la estructura tridimensional de MdPSY2\_F y MdPSY3 respecto a MdPSY2

a través del valor de desviación media cuadrática (RMSD) entre cada residuo superpuesto y para la secuencia completa a través de VMD.

Finalmente, la edición de los gráficos y figuras de los modelos generados fue realizada a través del programa Illustrator CS6.

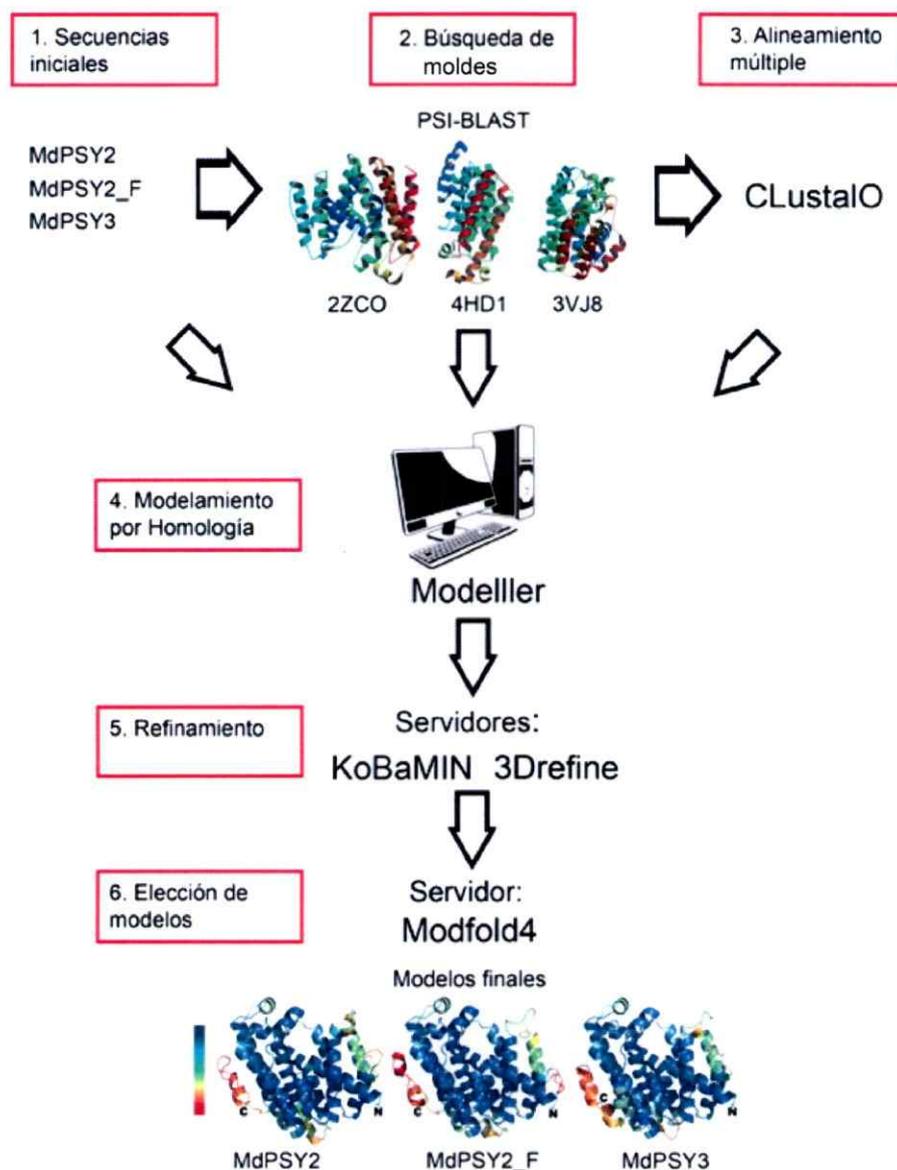


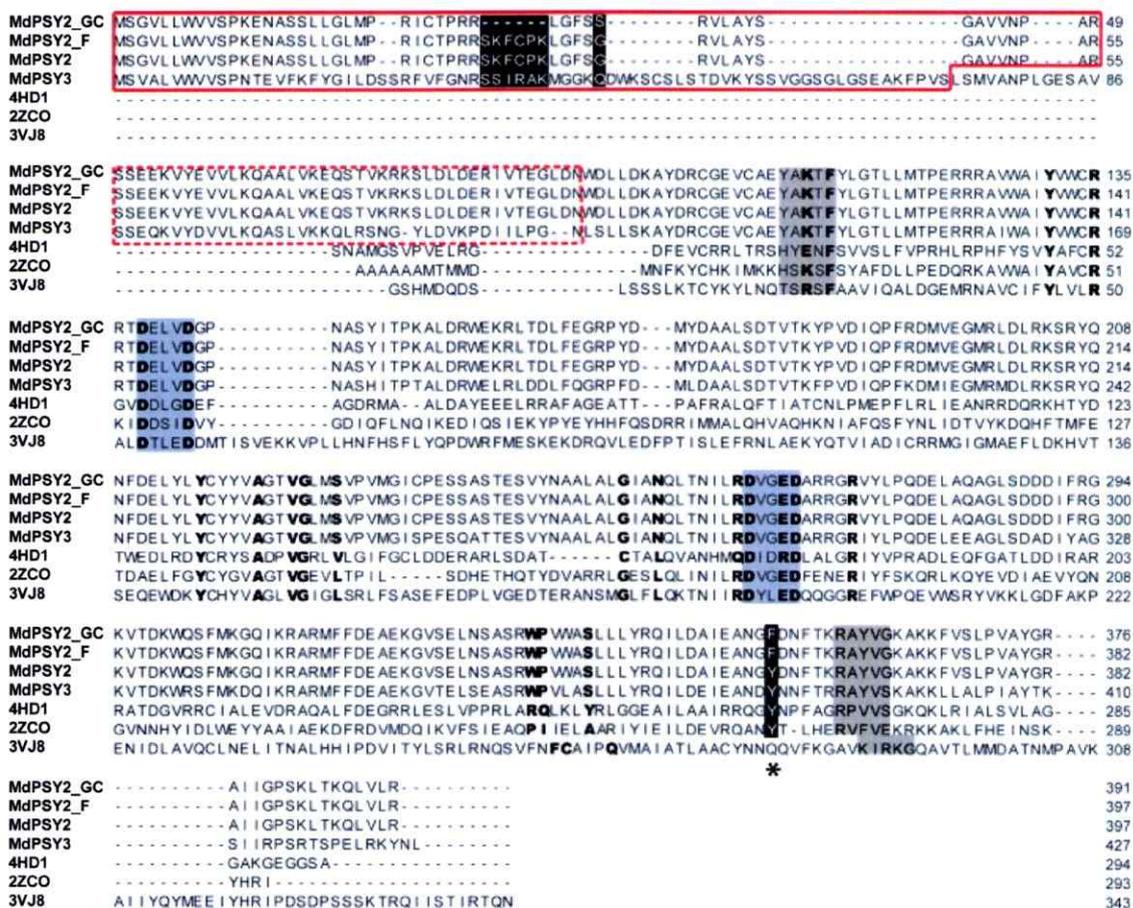
Figura 3. Esquema de los pasos realizados en la obtención de los modelos a través de modelamiento por homología.

## RESULTADOS

### 3.1. Análisis de las secuencias aminoacídicas de MdPSY3, MdPSY2 y las mutantes MdPSY2\_F y MdPSY2\_CG

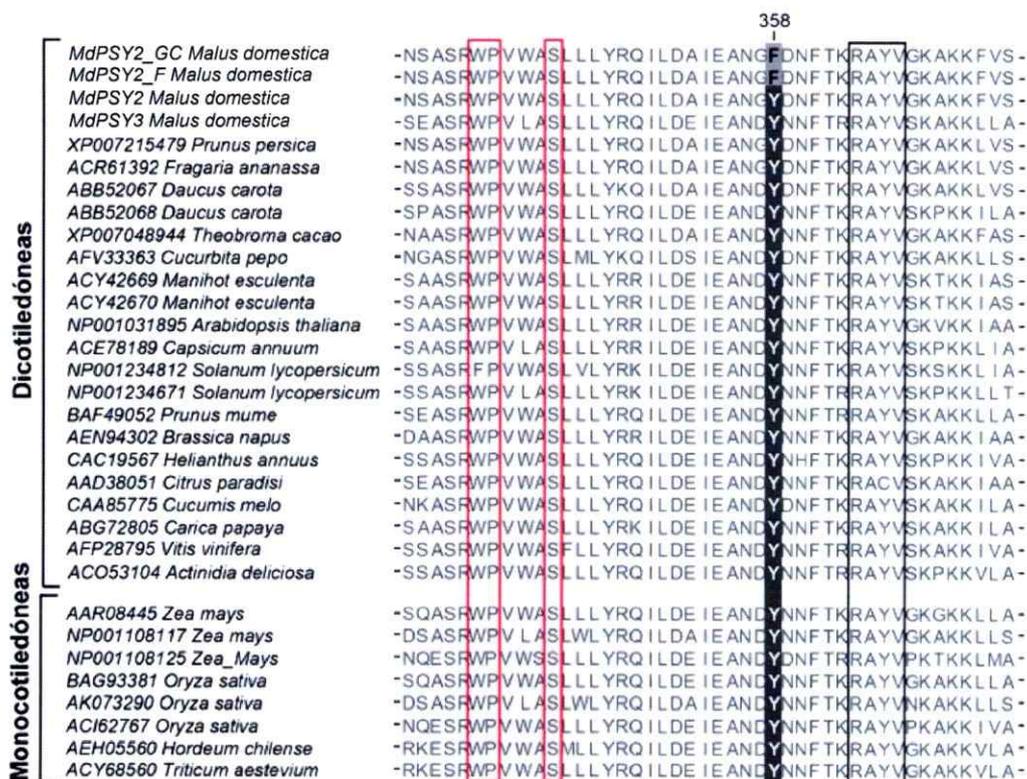
Previamente se logró clonar en el vector pCR8 las secuencias de ADNc de *MdPSY2* y *MdPSY3* obtenidas a partir de hojas de *M. domestica* (Cerde A., 2013). La secuenciación de *MdPSY2* desde ocho clones seleccionados, dio como resultado seis secuencias distintas en las que identificamos 3 mutaciones puntuales (ADNc.121G>A, 468A<G y ADNc.1073A<T), una de ellas neutra (ADNc.468A<G), y dos escisiones (ADNc.91\_110del y ADNc.841\_844del) en que una daba origen a una proteína trunca (ADNc.841\_844del). Sólo ADNc.841\_844del estuvo presente en uno de los clones secuenciados, el resto de las mutaciones se encontraron en 3 o más clones (ADNc.91\_110del: 3 clones; ADNc.121G>A: 3 clones; ADNc.468A<G: 4 clones; ADNc.1073A<T: 5 clones). Para los posteriores estudios consideramos aquellas variantes que presentaban mutaciones que generaban un cambio a nivel aminoacídico en las regiones conservadas de *MdPSY2* y la escisión en la región predicha como péptido de tránsito. De ésta manera estudiamos la secuencia silvestre *MdPSY2* que posee Tyr358 y las secuencias mutantes *MdPSY2\_CG* y *MdPSY2\_F*: *MdPSY2\_CG* posee una escisión de 6 residuos entre la posición 30 y 37 (Arg30\_Leu37del) y la sustitución Gly41Ser, estas últimas dentro de la región predicha como péptido de tránsito a plastidio, y además posee la sustitución Tyr358Phe; en el caso de *MdPSY2\_F* posee la sustitución Tyr358Phe.

En el caso de MdPSY3, la secuenciación de 4 clones seleccionados permitió identificar dos secuencias que se diferenciaban en la presencia de una valina (Val8) o una fenilalanina en el residuo 8 (Phe8). Esta mutación no fue considerada en los posteriores ensayos por encontrarse en la región predicha como péptido de tránsito y se continuó el análisis con la secuencia que poseía Val8.



**Figura 4. Alineamiento múltiple de las secuencias de PSY de *M. domestica* y de sus ortólogos bacterianos.** En el diagrama se destaca en rectángulos negros, las mutaciones en la secuencia de MdPSY2: escisión de 6 residuos en MdPSY2\_GC, sustitución de una glicina por una serina; destacado en asterisco, sustitución de una tirosina por una fenilalanina. Dominios funcionales y motivos conservados dentro de la subfamilia trans-isoprenil pirofosfato sintasa cabeza-cabeza (TIPPSHH): rectángulos grises, regiones que conforman la tapa del sitio activo; en negrita se destacan los residuos de los sitios catalítico y de unión a sustrato; rectángulos celeste, regiones de unión a sustrato-Mg<sup>2+</sup>; rectángulo rojo, región predicha como péptido de tránsito; rectángulo punteado rojo, región no alineada con ortólogo bacterianos.

Las secuencias de MdPSY3 y las variantes de MdPSY2 poseen todos los dominios funcionales conservados dentro de la subfamilia trans-isoprenil pirofosfato sintasa cabeza-cabeza (TIPPSHH), grupo que incluye a las enzimas fitoeno sintasa y escualeno sintasa (figura 4). Cabe destacar que el residuo Tyr358 es altamente conservado dentro de ortólogos de PSY tanto en dicotiledóneas como en monocotiledóneas (figura 5), incluso en los ortólogos bacterianos 4HD1 y 2ZCO, usados como moldes en el modelamiento por homología. El residuo Tyr358 se encuentra entre dos regiones conservadas dentro de la subfamilia TIPPSHH: una que involucra residuos del sitio catalítico y de unión a sustrato, y una segunda que corresponde a una de las regiones que conforma la tapa del sitio activo (figura 5).



**Figura 5. Alineamiento múltiple entre parálogos de MdPSY y sus ortólogos en plantas.** En gris de destaca el residuo Phe358 y en negro el residuo Tyr358; rectángulos rojos, residuos que forman parte de los sitio catalítico y de unión a sustrato; rectángulo negro, residuos de la tapa del sitio activo. A la izquierda de la imagen se indica el código de acceso de la enzima y la especie en que se encuentra.



### 3.2. Generación de las construcciones pET28/*MdPSY2\_CG*, pET28/*MdPSY2\_F* y pET28/*MdPSY2*

Los fragmentos de interés fueron liberados desde los plásmidos pCR8/*MdPSY2\_CG*, pCR8/*MdPSY2\_F* y pCR8/*MdPSY2* (tabla II) mediante digestión doble con las enzimas *Bam*HI y *Sal*I, obteniéndose bandas de 1.176 pb correspondiente al marco abierto de lectura (ORF) de *MdPSY2\_CG* y de 1.194 pb correspondiente a los ORF de *MdPSY2\_F* y *MdPSY2* (figura 6). Las mismas enzimas fueron usadas para linealizar el vector de expresión pET28a el cual posee un tamaño de 5.369 pb (figura 6).



**Figura 6.** Digestión de pET28a, pCR8/*MdPSY2\_CG*, pCR8/*MdPSY2\_F* y pCR8/*MdPSY2* con las enzimas *Bam*HI y *Sal*I. Carril pET28a, la banda corresponde al vector de pET28a digerido de 5.369pb. En los carriles *MdPSY2\_CG*, las bandas inferiores corresponden al ORF de *MdPSY2\_CG* de 1.176 pb; carriles *MdPSY2\_F*, las bandas inferiores corresponden al ORF de *MdPSY2\_F* de 1.194 pb; carriles *MdPSY2*, las bandas inferiores corresponden al ORF de *MdPSY2* de 1.194. Las bandas superiores en estos carriles corresponden al otro segmento del vector pCR8 de 2.817 pb; PM, marcador de peso molecular de 1Kb.

Luego de liberar los fragmentos de interés desde pCR8, éstos fueron purificados desde el gel y posteriormente ligados al vector de expresión pET28a entre los sitios *Bam*HI y *Sal*I (figura 7), el cual también fue purificado desde el gel. El producto de ligación fue usado para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , las

que fueron sembradas en placas con medio LB suplementado con kanamicina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y seleccionadas por PCR de colonias (sección 2.3.1.5). Salvo por los clones G4 y F8, todos los demás clones mostraron una banda de aproximadamente 1.200 pb, lo que se ajusta al tamaño esperado de los genes *MdPSY2\_CG* (1.176 pb), *MdPSY2\_F* (1.194 pb) y *MdPSY2* (1.194) (figura 8).

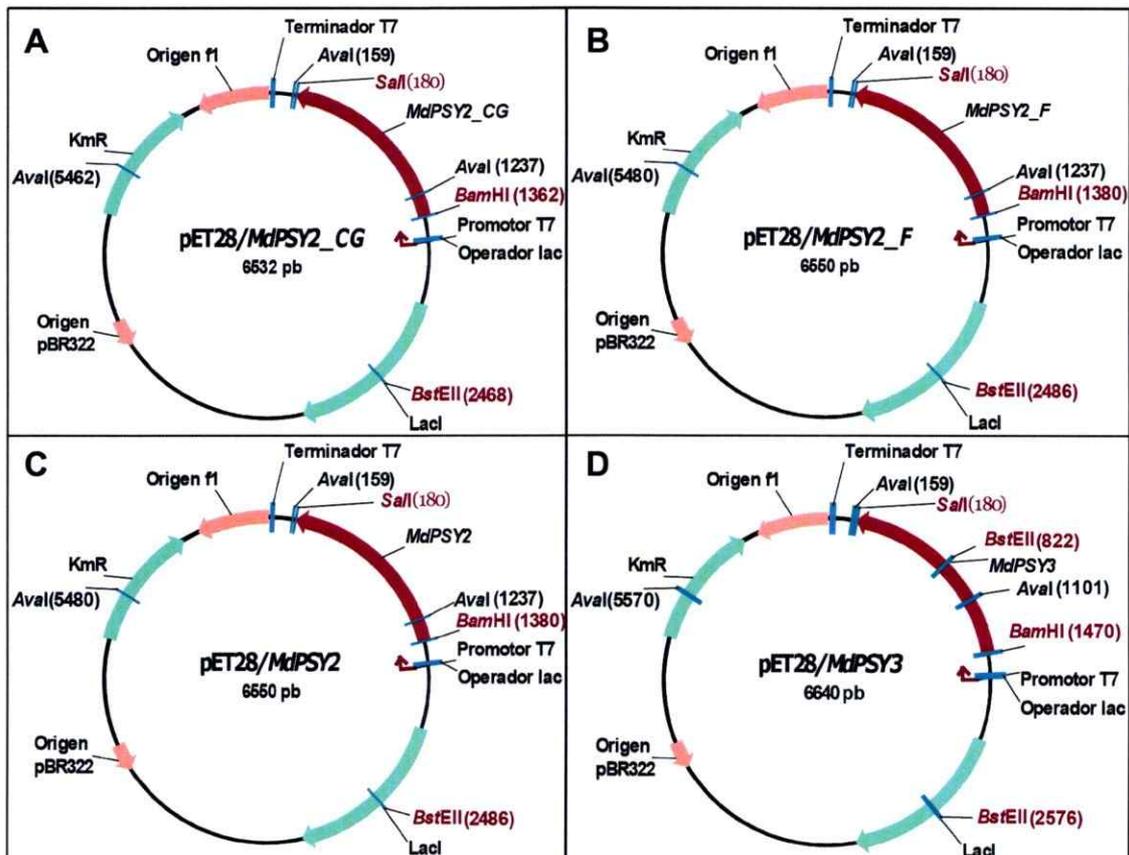
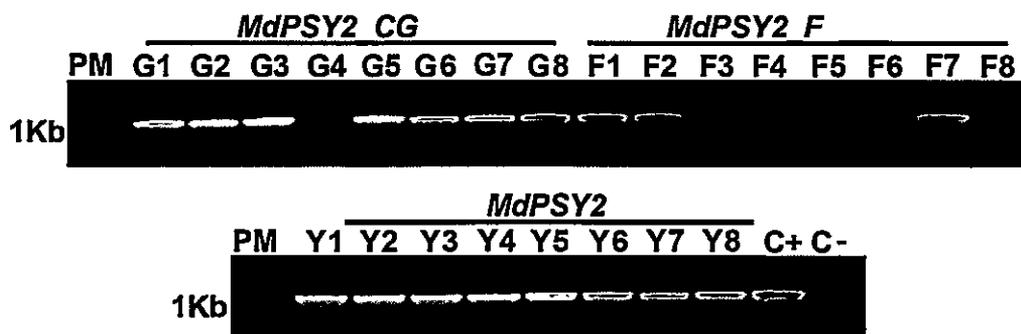
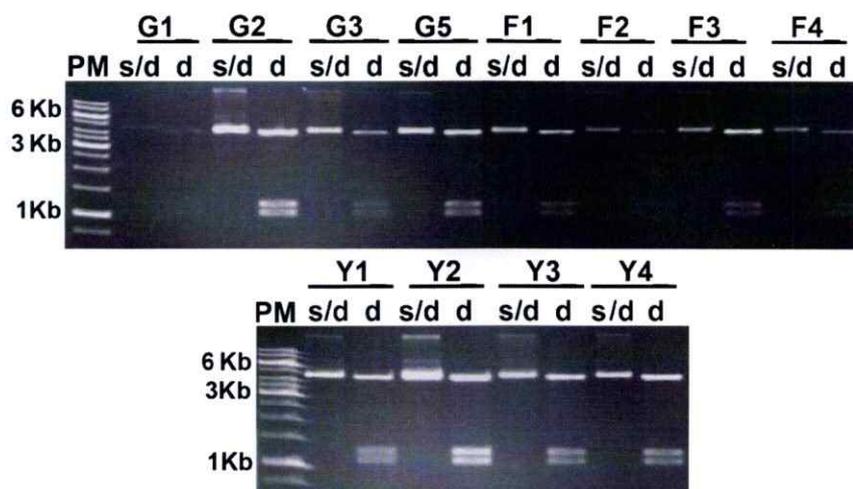


Figura 7. Esquema de las construcciones derivadas de pET28a y los marcos abiertos de lectura de *MdPSY*. A, pET28/*MdPSY2\_CG*; B, pET28/*MdPSY2\_F*; C, pET28/*MdPSY2*; D, pET28/*MdPSY3* (Cerde A., 2013).



**Figura 8.** PCR de las colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con los productos de ligación. Se amplificó la región codificante de los genes *MdPSY2\_CG*, *MdPSY2\_F* y *MdPSY2* de 1.176 pb, 1.194 pb y 1.194 pb respectivamente. Carriles G1-G5, corresponden a los clones transformados con pET28/*MdPSY2\_CG*, carriles F1-F8 corresponden a los clones transformados con pET28/*MdPSY2\_F* y los carriles Y1-Y8 pertenecen a los clones transformados con pET28/*MdPSY2*, respectivamente; C+, PCR desde pCR8/*MdPSY2\_CG* usado como control positivo; C-, control negativo de la reacción usando H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril como plantilla; PM, marcador de peso molecular de 1 Kb.

A partir de los resultados de PCR de colonia, se seleccionaron 4 colonias transformada con cada construcción y posteriormente se realizó una extracción de ADN plasmidial desde cultivos de cada una de éstas (sección 2.3.1.1.). Con el ADN plasmidial obtenido, se realizó una digestión con *Ava*I con el fin de confirmar la correcta orientación del fragmento de interés. Todos los clones mostraron tener el fragmento de interés en sentido respecto al promotor T7 dentro del vector pET28. En la **figura 9**, se puede apreciar el patrón de banda obtenido para la construcción *MdPSY2\_CG* de 4.225 pb, 1.229 pb y 1.078 pb, y en el caso de las construcciones *MdPSY2\_F* y *MdPSY2* el patrón esperado de 4.243 pb, 1.229 pb y 1.078 pb.



**Figura 9. Digestión con la enzima *Ava*I de clones que portan los marcos abiertos de lectura de *MdPSY* en el vector pET28a.** Carriles G1-G5, corresponden a la digestión de ADN plasmidial purificado desde clones transformados con pET28/*MdPSY2\_CG* mostrando el patrón de banda esperado para un clonamiento en sentido: 4.225 pb, 1.229 pb y 1.078 pb; carriles F1-F4 y carriles Y1-Y4 corresponden a la digestión de ADN plasmidial purificado desde clones transformados con pET28/*MdPSY2\_F* y pET28/*MdPSY2* respectivamente, mostrando el patrón de banda esperado para un clonamiento en sentido: 4.243 pb, 1.229 pb y 1.078 pb; s/d, plásmido sin digerir; d, plásmido digerido con *Ava*I; PM, marcador de peso molecular de 1 Kb.

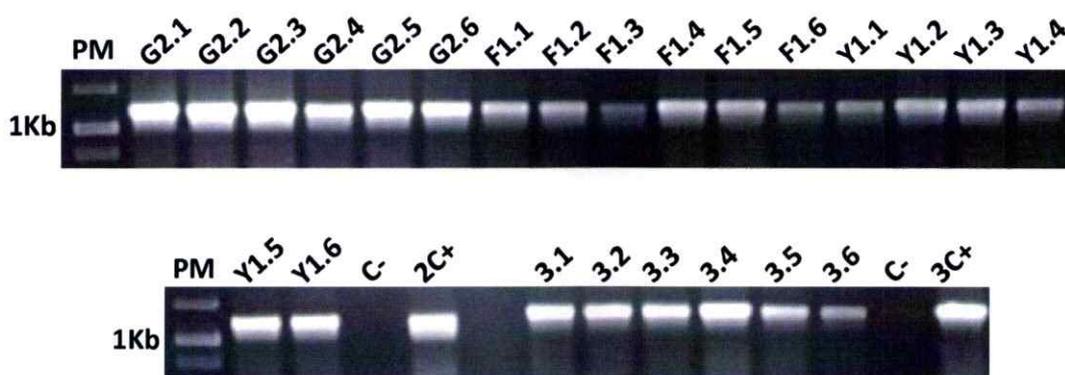
Se seleccionaron los clones G2, F1 e Y1, transformados con las construcciones obtenidas (figura 7) para continuar con los ensayos de complementación heteróloga. En el caso de la construcción pET28/*MdPSY3*, ésta fue obtenida en un trabajo previo realizado por Ariel Cerda, y fue usada en los posteriores ensayos de complementación.

### 3.3. Complementación heteróloga de la cepa de *E. coli* BL-21 pDS1B $\Delta$ *crtB*

Con el fin de evaluar la funcionalidad de los genes *MdPSY*, se realizó la complementación heteróloga en la cepa de *E. coli* BL-21 pDS1B  $\Delta$ *crtB* con las construcciones derivadas de pET28a y los ORF de *MdPSY2\_CG*, *MdPSY2\_F*, *MdPSY2* y *MdPSY3*. Esta cepa contiene todos los genes de la ruta de síntesis de carotenoides de *E. uredo*vora; sin embargo, presenta un fenotipo blanco por no ser

capaz de acumular carotenoides. Esto se debe a que posee una escisión de 522 pb en el gen *crtB* el cual codifica la enzima responsable de catalizar el primer paso de la ruta de síntesis de carotenoides (PSY en plantas).

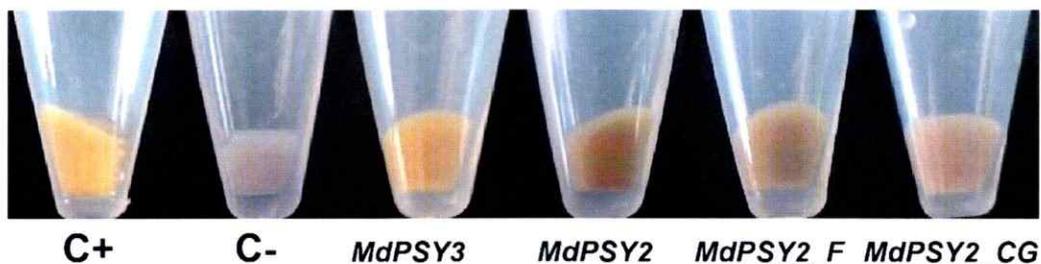
Cepas quimiocompetentes de *E. coli* BL-21 pDS1B  $\Delta$ *crtB* fueron transformadas con las construcciones obtenidas (figura 7) (sección 2.3.1.4). Las células transformadas fueron cultivadas en medio LB sólido suplementado con kanamicina 50  $\mu$ g/mL, cloranfenicol 34  $\mu$ g/mL e IPTG 1mM. Las colonias obtenidas fueron seleccionadas por PCR de colonias (figura 10) y por presentar una coloración amarillenta.



**Figura 10. PCR de colonias de BL-21 pDS1B  $\Delta$ *crtB* transformadas con las construcciones pET28/*MdPSY3*, pET28/*MdPSY2*, pET28/*MdPSY2\_F* y pET28/*MdPSY2\_CG*.** En la reacción se amplificó la región codificante de los genes *MdPSY2\_CG*, *MdPSY2\_F*, *MdPSY2* y *MdPSY3* de 1.176 pb, 1.194 pb, 1.194 pb y 1.311 pb, respectivamente. Carriles G2.1-G2.6, clones transformados con pET28/*MdPSY2\_CG*; carriles F1.1-F1.6, clones transformados con pET28/*MdPSY2\_F*; carriles Y1.1-Y1.6, clones transformados con pET28/*MdPSY2*; carriles 3.1-3.6, clones transformados con pET28/*MdPSY3*; 2C+ y 3C+, PCR desde pET28/*MdPSY2\_CG* y pET28/*PSY3* respectivamente, usados como control positivo; C-, control negativo de la reacción usando H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril como plantilla; PM, marcador de peso molecular de 1 Kb.

Se seleccionaron los clones G2.1, F1.1, Y1.1 y 3.1 (figura 10) transformados con las construcciones pET28/*MdPSY2\_CG*, pET28/*MdPSY2\_F*, pET28/*MdPSY2* y pET28/*MdPSY3* respectivamente, para realizar los ensayos de complementación. Los

clones obtenidos fueron incubados en condiciones que favorecían la acumulación de carotenoides (**sección 2.3.2.1**). Al comparar el fenotipo de los clones seleccionados con el de los controles, todos mostraron una coloración de tono amarillo similar a la del control positivo y que varía en intensidad dependiendo del clon (**figura 11**).

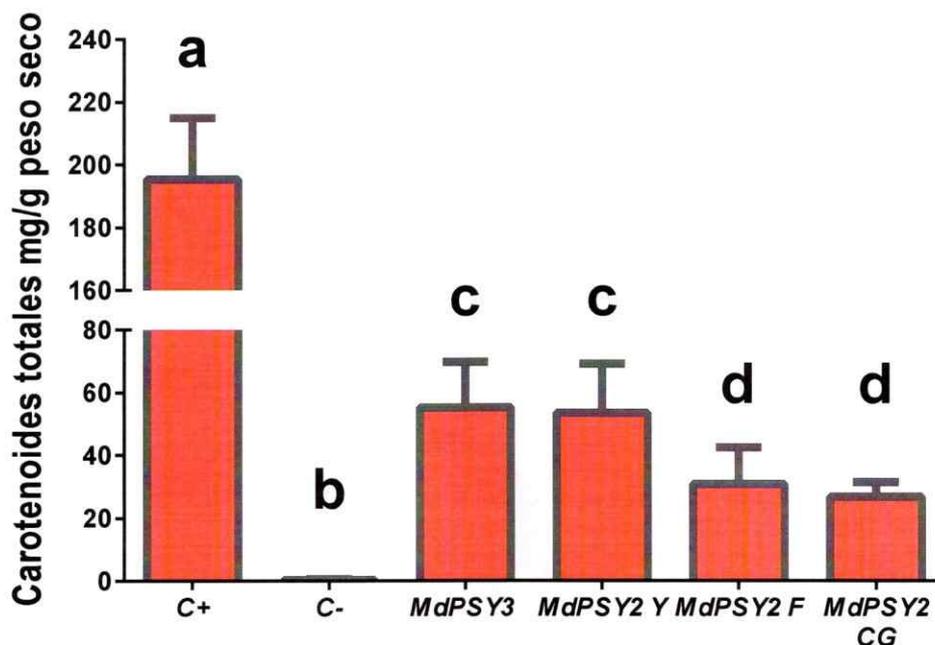


**Figura 11. Fenotipo de las cepas complementadas.** *MdPSY3*, clon 3.1 transformado con pET28/*MdPSY3*; *MdPSY2*, clon Y1.1 transformado con pET28/*MdPSY2*; *MdPSY2\_F*, clon F1.1 transformado con pET28/*MdPSY2\_F*; *MdPSY2\_CG*, clon CG2.1 transformado con pET28/*MdPSY2\_CG*; control positivo (C+), cepa BL-21 pDS1B; control negativo (C-), cepa BL-21 pDS1B  $\Delta crtB$  pET28a.

#### 3.4. Extracción y análisis de carotenoides desde las cepas complementadas

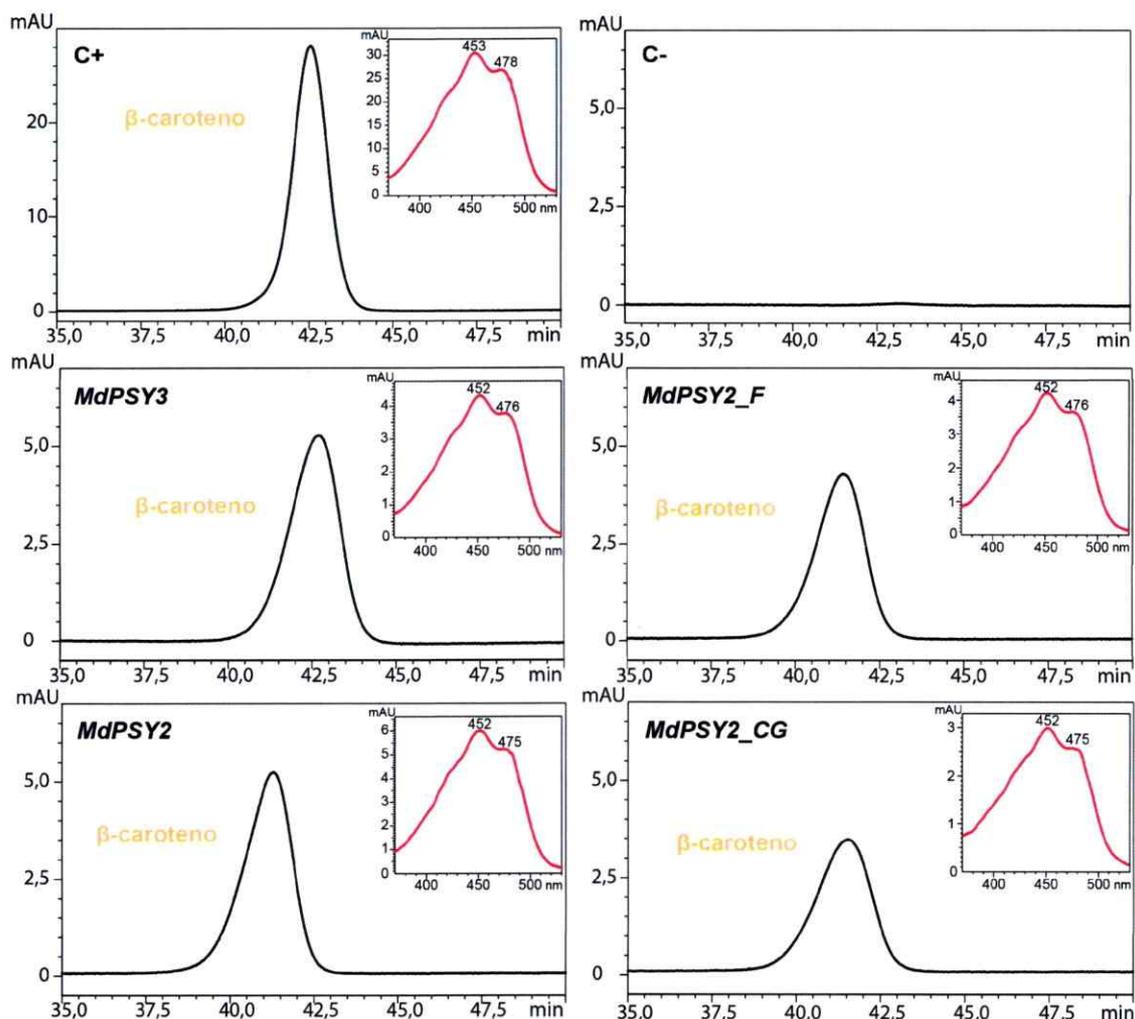
A partir de cultivos líquidos de cada uno de los clones seleccionados, se realizó la extracción de pigmentos (**sección 2.3.2.3**) los que fueron cuantificados a través de espectrofotometría y analizados por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) a una longitud de onda de 474 nm (**sección 2.3.2.4**).

La cantidad de carotenoides totales medidos por espectrofotometría fueron relativizados con el peso seco del cultivo correspondiente, previo a la extracción. Los resultados se muestran en la **figura 12**. Todas las cepas obtenidas mostraron acumulación de carotenoides; sin embargo, las cepas transformadas con *MdPSY3* y *MdPSY2* mostraron hasta dos veces más carotenoides respecto a las cepas transformadas con *MdPSY2\_CG* y *MdPSY2\_F*.



**Figura 12. Carotenoides totales de las cepas complementadas con PSY de *M. domestica*.** *MdPSY3*, clon 3.1 transformado con pET28/*MdPSY3*; *MdPSY2*, clon Y1.1 transformado con pET28/*MdPSY2*; *MdPSY2\_F*, clon F1.1 transformado con pET28/*MdPSY2\_F*; *MdPSY2\_CG*, clon CG2.1 transformado con pET28/*MdPSY2\_CG*; control positivo (C+), cepa BL-21 pDS1B; control negativo (C-), cepa BL-21 pDS1B  $\Delta crtB$  pET28a. ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. Idéntica letra indica que los datos no son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Posteriormente se realizó el RP-HPLC para determinar la composición de los carotenoides en los cultivos bacterianos obtenidos. Los cromatogramas mostraron un solo pico con un tiempo de retención que varió de 40 a 42,5 min cuyos espectros de absorción mostraron el patrón que se ajusta al espectro de  $\beta$ -caroteno (**figura 13**). Todos los resultados fueron comparables al control positivo.

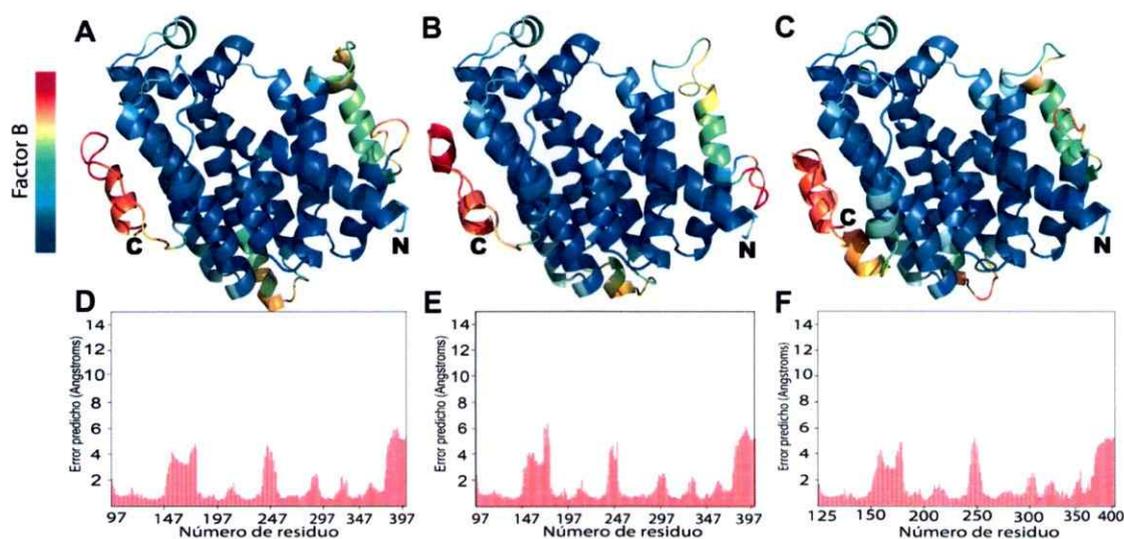


**Figura 13. Cromatogramas y espectros de absorción de los carotenoides obtenidos desde las cepas con PSY de *M. domestica*.** Composición de carotenoides del clon 3.1 de la construcción pET28/MdPSY3; MdPSY2, clon Y1.1 transformado con pET28/MdPSY2; MdPSY2\_F, clon F1.1 transformado con pET28/MdPSY2\_F; MdPSY2\_CG, clon CG2.1 transformado con pET28/MdPSY2\_CG; control positivo (C+), cepa BL-21 pDS1B; control negativo (C-), cepa BL-21 pDS1B  $\Delta crtB$  pET28a. Cromatogramas en negro, eje horizontal: tiempo de retención (min); eje vertical: unidades arbitrarias de absorbancia (mAU). Espectro de absorción (recuadro interno en rojo), eje horizontal: longitud de onda (nm); eje vertical: unidades arbitrarias de absorbancia (mAU).

### 3.5. Modelamiento *in-silico* de MdPSY3, MdPSY2 y la mutante MdPSY2\_F

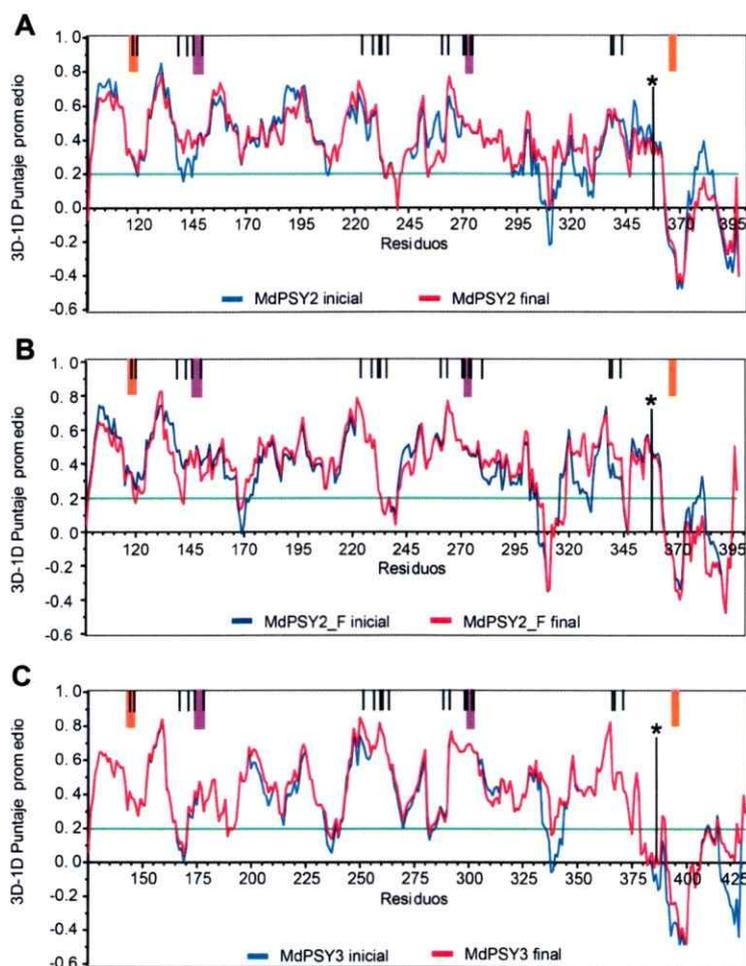
Con el fin de obtener un modelo de la estructura terciaria de las secuencias de MdPSY, a través de modelamiento por homología (sección 2.3.3.2) se obtuvieron

inicialmente 10 posibles estructuras para MdPSY2, MdPSY2\_F y MdPSY3. MdPSY2\_CG no fue considerado en el modelamiento puesto que los cambios respecto a MdPSY2\_F se encontraron dentro de la región predicha como péptido de tránsito, la que no es parte de la proteína madura. Las estructuras predichas fueron refinadas a través de los servidores 3Drefine y KoBaMIN (sección 2.3.3.2) obteniéndose 50 modelos para cada secuencia. Estos fueron evaluados a través del servidor Modfold4 siendo seleccionado el mejor modelo en función del puntaje obtenido. Las estructuras predichas no fueron resolutivas en el extremo carboxilo terminal, donde se observó el mayor grado de incertidumbre reflejado en el valor del factor B (figura 14). Esto debido principalmente a que los moldes usados no cubrieron esta región.



**Figura 14. Modelos de MdPSY3, MdPSY2 y MdPSY2\_F.** En A, MdPSY2; B, MdPSY2\_F; C, MdPSY3, modelos seleccionados a partir del servidor Modfold4. Para cada modelo el nivel de incertidumbre de cada residuo se encuentra reflejado en el valor del factor B, regiones con menor error se indican en azul mientras que en rojo se indican las regiones con mayor grado de error. En D, MdPSY2; E, MdPSY2\_F; F, MdPSY3, se muestran gráficamente los valores del error predicho para cada residuo.

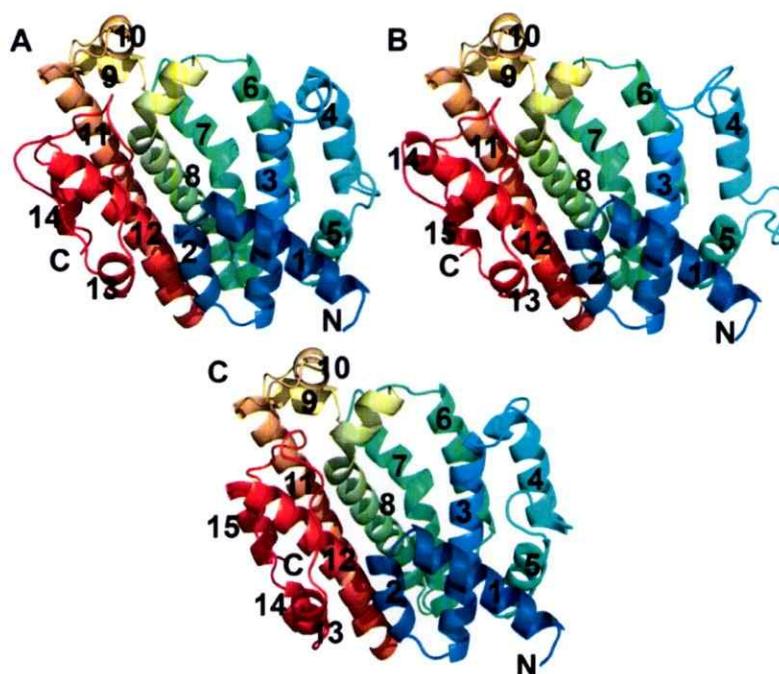
Se realizó una evaluación de los modelos generados a través del servidor Verify3D, el cual entrega un perfil de energía éstos (sección 2.3.3.2). Respecto al perfil de energía obtenido, se observó que la mayor parte de las regiones funcionales se encuentran evaluadas por sobre 0,2, correspondiente al límite considerado aceptable (figura 15), con excepción de la región carboxilo terminal donde se encuentra la mutación Tyr/Phe358 y una región identificada como tapa del sitio activo.



**Figura 15. Evaluación de los dominios funcionales de MdPSY.** En A, MdPSY2; B, MdPSY2\_F; C, MdPSY3. Se muestra gráficamente los resultados obtenidos de Verify3D comparando entre el modelo inicial generado por Modeller (en azul) y el modelo final refinado a través de Kobamin y 3Drefine (en rojo). Las regiones funcionales se representan en la parte superior del gráfico: en naranja, regiones de la tapa del sitio activo; en magenta, regiones de unión a sustrato y Mg<sup>2+</sup>; líneas negras, residuos de unión a sustrato y del sitio catalítico. En asterisco se destaca la posición del residuo Tyr/Phe358. Cada valor corresponde al promedio de 10 residuos.

Además se comparó el perfil de energía entre los moldes usados y modelos obtenidos, con el fin de identificar posibles regiones con alto nivel energético que estuvieran conservadas entre estos. Sin embargo, no fue posible encontrar una correlación clara (datos no mostrados).

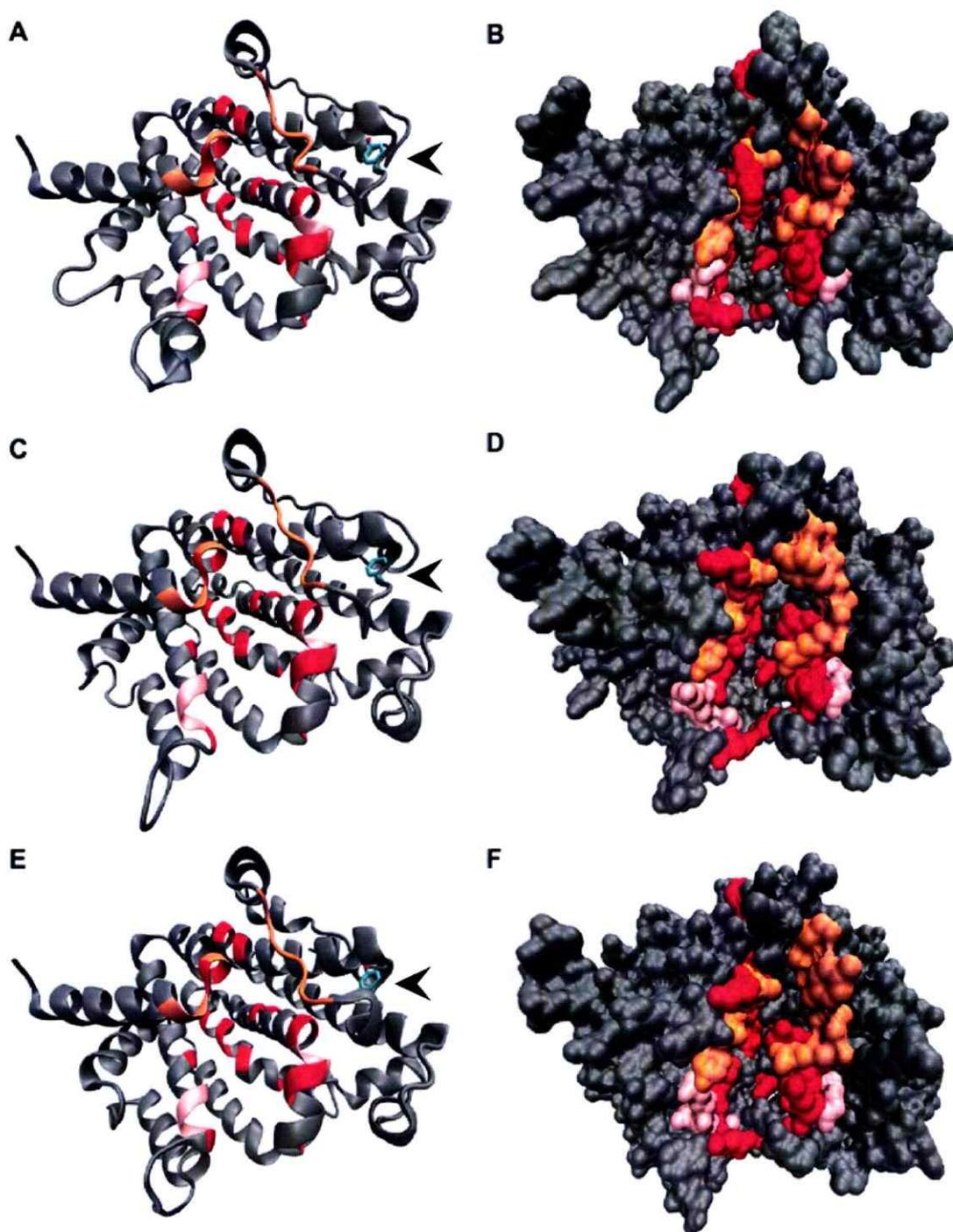
En los tres modelos fue posible apreciar una estructura conformada por catorce (MdPSY2) a quince  $\alpha$ -hélices (MdPSY2\_F y MdPSY3). De estas, las  $\alpha$ -hélices 2, 3, 7, 8 y 12 (**figura 16**) se encontraron formando una cavidad central y se caracterizaron por contener residuos involucrados en el sitio catalítico y de unión a sustrato. En el caso de MdPSY3 y MdPSY2\_F, la hélice adicional (hélice 14) se ubica en la región carboxilo terminal.



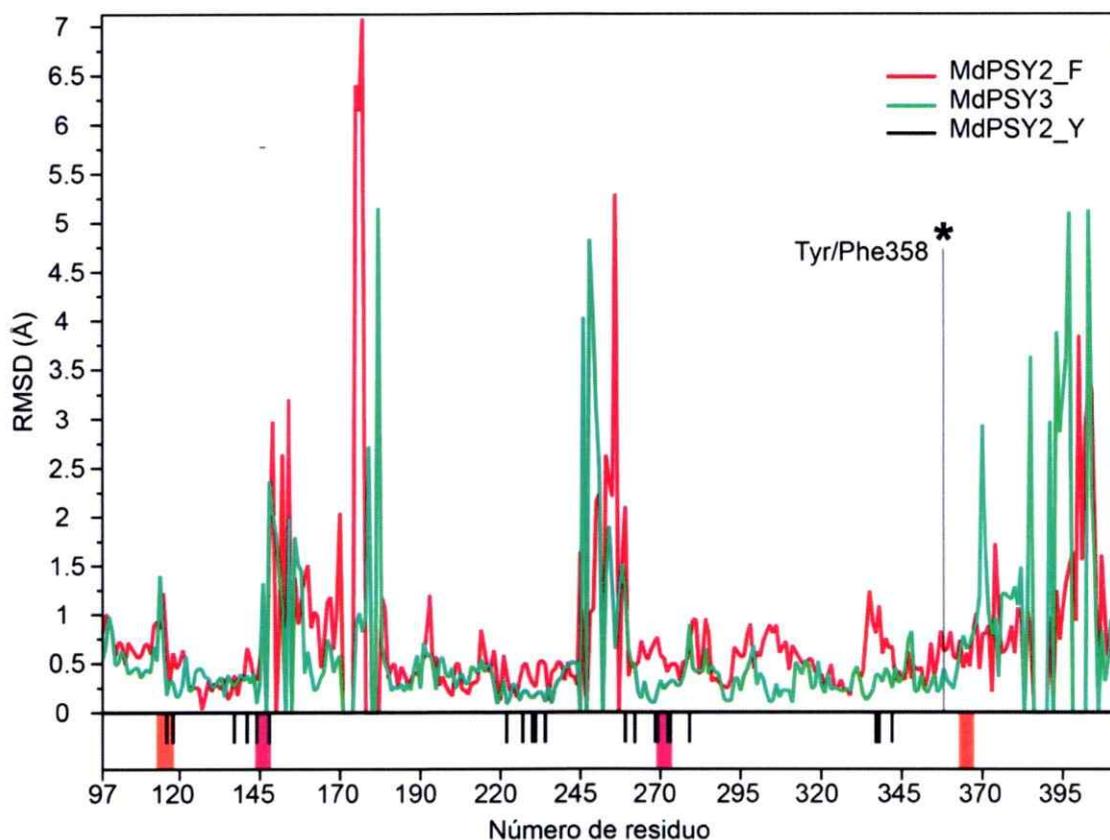
**Figura 16. Modelos predichos de MdPSY.** En A, MdPSY2; B, MdPSY2\_F; C, MdPSY3, en negrita se destaca el amino terminal (N) y carboxilo terminal (C). El orden de cada estructura de  $\alpha$ -hélice a lo largo de la secuencia se indica con números desde la región amino terminal en azul hasta la región carboxilo terminal en rojo. Cada hélice tiene un tono de coloración distinto con el fin de diferenciarla.

Al visualizar la superficie de los modelos obtenidos, se aprecia que todas conservan una estructura altamente compacta frente al solvente, manteniendo una cavidad central donde se encuentran los residuos involucrados en el sitio catalítico y de unión a sustrato. En la parte externa de esta cavidad se encuentran las regiones que mantienen al intermediario prefitoeno pirofosfato aislado del solvente (tapa del sitio activo) y las regiones ricas en aspartato (**figura 17**), éstas últimas son capaces de acomplejar sustrato-Mg<sup>2+</sup> y llevar a cabo la primera reacción que conduce a la formación de prefitoeno pirofosfato (PPPP) (**sección 1.3**).

Con el fin de comparar la estructura tridimensional de los modelos obtenidos, se realizó la superposición de éstos tres y se determinó el valor de la desviación media cuadrática (RMSD) para cada residuo (**figura 18**), a través del cual fue posible apreciar que las enzimas mantienen una estructura conservada a lo largo de su secuencia, lo cual es reflejado en su bajo valor de RMSD respecto a MdPSY2: 2,01 Å y 3,07 Å para MdPSY2\_F y MdPSY3 respectivamente, considerando que para proteínas con una estructura similar se espera valores de RMSD cercanos a 2 Å (Martí-Renom y col., 2000; Maiti y col., 2004). Sólo en cuatro regiones el valor de RMSD es mayor al promedio (entre 2 y 7 Å). Sin embargo, estas regiones se limitan a estructuras predichas como bucles y a la región carboxilo terminal, donde no es de extrañar estos valores por corresponder a conformaciones menos rígidas y con un mayor nivel de incertidumbre respectivamente.



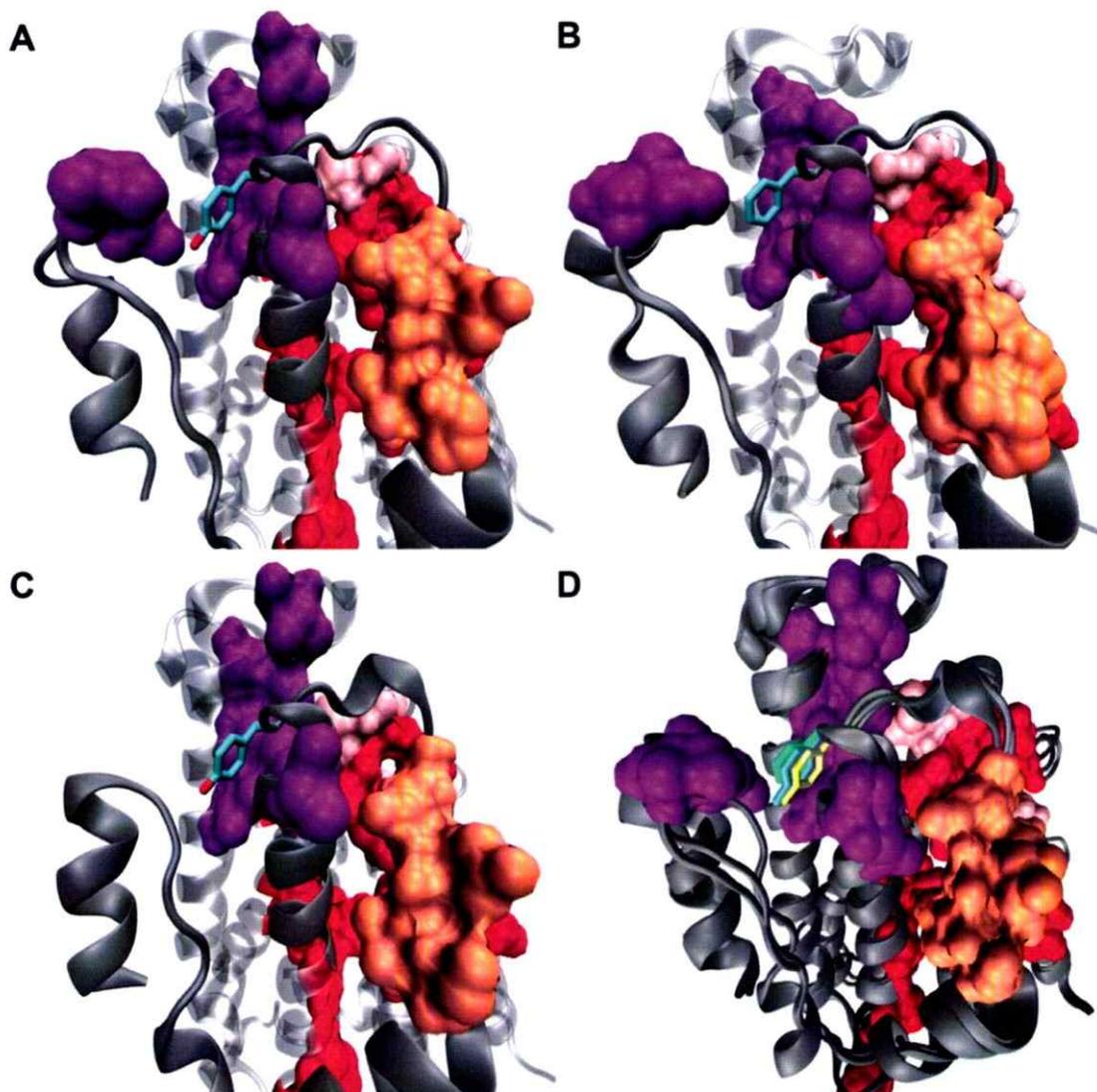
**Figura 17. Regiones funcionales de los modelos predichos de MdPSY.** A y B, MdPSY2; C y D, MdPSY2\_F; E y F, MdPSY3. A la izquierda (A, C y E) representación en estructuras de  $\alpha$ -hélice y a la derecha (B, D y F) representación en superficie de la enzima. En rojo, residuos del sitio catalítico y de unión a sustrato; naranja, tapa del sitio activo; rosado, regiones de unión a sustrato- $Mg^{2+}$ ; flechas negras y en cian, residuos Tyr358 (MdPSY2), Phe358 (MdPSY2\_F) y Tyr386 (MdPSY3).



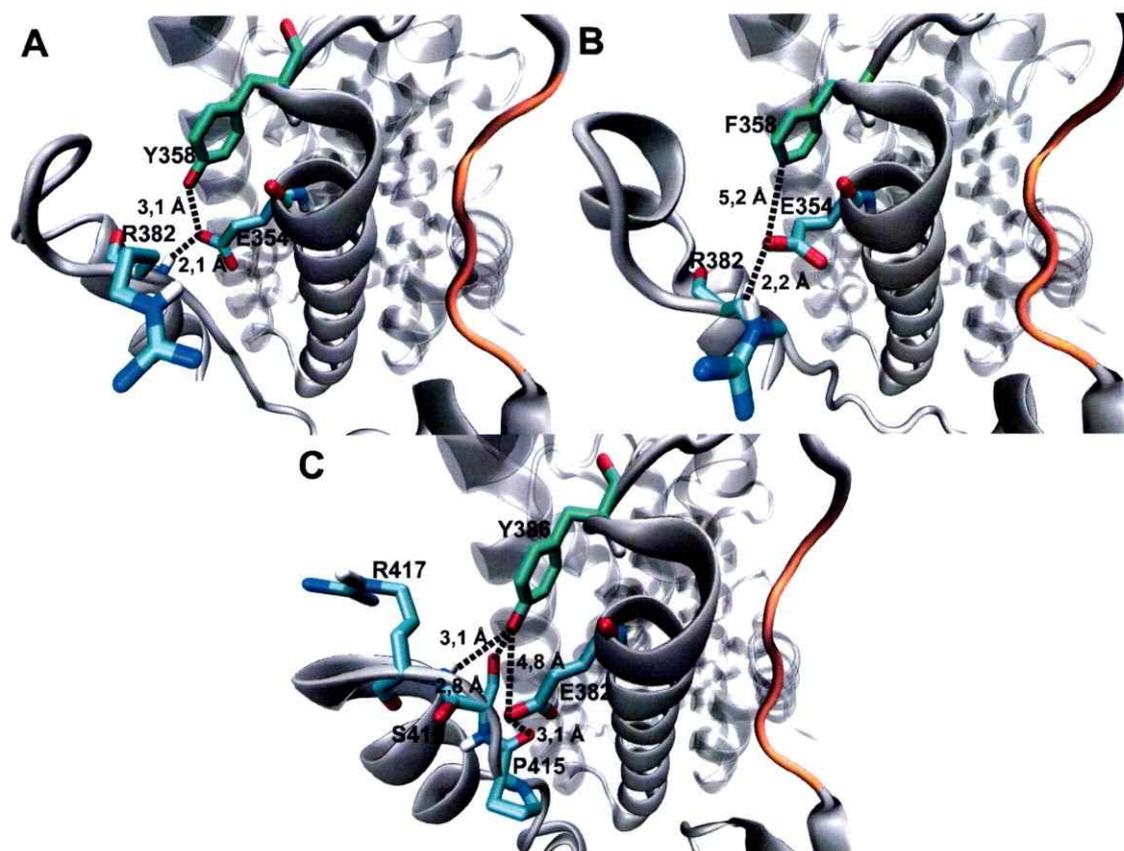
**Figura 18. Valor de RMSD por residuo.** En rojo, MdPSY2\_F; verde, MdPSY3; negro, MdPSY2. En asterisco se destaca la posición del residuo Tyr/Phe358. Las regiones funcionales de las enzimas se representan en la parte superior del eje de números de residuos: en naranja, regiones de la tapa del sitio activo; en magenta, regiones de unión a sustrato y  $Mg^{2+}$ ; líneas negras, residuos de unión a sustrato y del sitio catalítico.

Al visualizar el entorno de 5Å en que se encuentra el residuo Tyr/Phe358 se observa que éste se ubica entre las hélices 8, 11, 12 (**figura 17**), y parte del extremo C-terminal en medio de una zona hidrofóbica (**figura 19**). Sin embargo, también es posible reconocer la presencia de residuos polares cargados, en el caso de MdPSY2 se encuentra cercano a Arg286 y Glu354, mientras que Tyr386 (MdPSY3) se encuentra próximo a Glu382 y Ser292 (**figura 20**). A través del programa VMD no fue posible predecir la formación de puentes de hidrogeno entre Tyr358 (MdPSY2) o

Tyr386 (MdPSY3); sin embargo, por ubicarse dentro de una región predicha como bucle y la cercanía con Glu354 y Glu382, respectivamente, hacen suponer una interacción de tipo puente de hidrogeno, entre estos residuos.



**Figura 19. Entorno hidrofóbico del residuo Tyr/Phe358 (MdPSY2) y Tyr386 (MdPSY3).** En A, MdPSY2; B, MdPSY2\_F; C, MdPSY3; D, sobreposición de los tres parálogos de MdPSY. En morado se destacan los residuos apolares ubicados a menos de 5Å de Tyr/Phe 358. En naranja, tapa del sitio activo; rojo, residuos de unión a sustrato y del sitio catalítico; rosado, región de unión a sustrato-Mg<sup>2+</sup>.



**Figura 20. Residuos cercanos a Tyr/Phe358 (MdPSY2) y Tyr386 (MdPSY3).** En A, MdPSY2; B, MdPSY2\_F; C, MdPSY3. En forma de bastones se representan los residuos a una distancia menor a 5Å de Tyr/Phe 358 y Tyr386 (verde); en línea discontinua, se destaca la distancia de los residuos Glu354 y Arg382 en MdPSY2 y MdPSY2\_F (A y B) y Glu354, Pro358, Ser416 y Arg417 en MdPSY3 (C). En cian, átomos de carbonos; rojo, átomos de oxígeno; azul, átomos de nitrógeno; amarillo, átomos de azufre. En naranja, tapa del sitio activo; rojo, residuos de unión a sustrato y del sitio catalítico; rosado, región de unión a sustrato-Mg<sup>2+</sup>.

## DISCUSIÓN

En trabajos previos en nuestro laboratorio se identificaron cuatro posibles genes de *MdPSY*, dos de *MdLCYB* y uno de *MdPDS* en el genoma de *M. domestica* var. *fuji*. Se determinó que los genes *MdPSY1*, *MdPSY2* y *MdLCYB2* se expresan preferentemente en frutos, mientras que *MdPSY3*, *MdPSY4* y *MdLCYB1* lo hacen en hojas (Cerda, 2013). Ensayos que dan cuenta de la expresión génica es una aproximación de su funcionalidad en la planta pero no nos entrega un resultado directo respecto a la actividad del producto génico. Para esto se requieren de ensayos que permitan evaluar la actividad enzimática *in-vitro* o a través de la expresión en modelos vegetales o bacterianos. Con el fin de evaluar la funcionalidad de los posibles genes de *MdLCYB* se realizaron ensayos de complementación heteróloga en una cepa recombinante de *E. coli* productora de carotenoides con una mutación en el gen *crtY*. Lo que permitió apreciar que solo la enzima codificada por *MdLCYB1* tiene actividad licopeno ciclasa capaz de restituir el fenotipo de dicha cepa (Díaz, 2013). Sin embargo, aún quedaba por evaluar la funcionalidad de los probables genes de *MdPSY*, trabajo que se desarrolló en el presente seminario de título

### **4.1. Análisis de las secuencias aminoacídicas MdPSY3, MdPSY2 y las mutantes MdPSY2\_F y MdPSY2\_CG**

De los genes parálogos de *MdPSY* identificados previamente (Cerda, 2013), fue posible clonar en el vector de clonamiento pCR8, sólo las secuencias de ADNc de *MdPSY2* y *MdPSY3* (Realizado por Ariel Cerda). No se obtuvo ADNc de los

genes *MdPSY1* y *MdPSY4*, probablemente debido a su menor nivel de expresión respecto a *MdPSY3* y *MdPSY2* (dos órdenes de magnitud menor, Cerda, 2013).

A partir de los clones transformados con *MdPSY2* se obtuvieron 6 variantes de un conjunto de 8 secuencias (posibles polimorfismos), lo que evidencia una amplia variabilidad en *PSY2* de *M. domestica*. Cabe destacar, que las tres mutaciones seleccionadas estuvieron presentes hasta en 5 clones. Además, en el caso de las sustituciones ADNc.1073A<T (que lleva a Tyr358Phe) y ADNc.468A<G (neutra), están anotadas dentro de la secuencia génica de *MdPSY2* (GI: 103443641) como W (T o A) y R (A o G) respectivamente (anexo 3).

Si bien la propagación de especies comerciales es principalmente vegetativa (esquejes) con el fin de mantener inalterable su identidad genética, el proceso de domesticación de las variedades vegetales actuales ha sido resultado de una presión selectiva sobre caracteres de interés para el humano (Wright y col, 2005; Zeder, 2006; Purugganan y Fuller, 2009), esto ha llevado a una rápida evolución y a la aparición de polimorfismo en las plantas domesticadas, como se ha reportado en plantas anuales tales como rábano (*R. sativus L.*) (Ellstrand y Marshall, 1985), frijol (*P. vulgaris L.*) (Sonnante y col, 1994), maíz (*Z. mays*) (Wright y col, 2005) y arroz (*O. sativa*) (Caicedo y col, 2007). En el caso de manzana, su domesticación y generación de nuevas variedades ha sido resultado de procesos de hibridación e introgresión que a su vez llevaron a un extenso flujo genético entre variedades domesticadas y silvestres (Cornille y col., 2014). Aunque existe poca información respecto a los efectos en la domesticación a nivel génico en especies de plantas anuales, como árboles frutales (Cornille y col, 2012), la presencia de polimorfismo en manzana puede ser uno de los efectos del flujo genético entre especies de manzana, a lo largo de su extenso proceso de domesticación.

PSY es una enzima clave y altamente regulada dentro de la síntesis de carotenoides (Maass y col., 2009; Cazzonelli y col., 2010; Welsch y col., 2010; Couso y col., 2011) y se ha visto que cambios de un solo residuo puede alterar su actividad o su localización dentro de cloroplastos. Lo anterior se ha observado en variedades de maíz y yuca que no son capaces de acumular carotenoides en el endosperma y la raíz respectivamente, y con respecto a las variedades que si lo hacen, solo existe el cambio de un residuo en PSY (Welsch y col., 2010; Shumskaya y col., 2012). En el trabajo de Shumskaya (Shumskaya y col., 2012) a través de modelamiento por homología observaron que la mutación Thr257Pro llevaba al cambio en la posición de un bucle cercano a una de las regiones de unión a sustrato-Mg<sup>2+</sup> (regiones ricas en aspartato), sugiriendo que esto podría modificar la localización subplastidial de ZmPSY1 explicando la falta de carotenoides en la variedad de maíz. Respecto a los cambios en la actividad de PSY debido a la sustitución de un residuo, Welsh y cols. (2010) observaron en a través de ensayos *in-vitro* que la sustitución Ala191Asp en MePSY2 conduce a un aumento en la actividad enzimática, encontrando resultados similares en PSY mutante de narciso, maíz y arabidopsis con la mutación Ala191Asp. En PSY1 de tomate (Gady y col., 2012) la sustitución Pro192Leu llevó a una disminución en la actividad enzimática, reflejado en los menores niveles de carotenoides en el fruto. Además al realizar una predicción de la estructura secundaria de la enzima, asociaron la sustitución Pro192Leu con la presencia de una estructura de alfa hélice adicional. El cambio en actividad enzimática y funcionalidad también ha sido descrito para otros genes claves en la ruta de síntesis de carotenoides, como LCYB de melón (*C. lanatus*) en que la coloración amarilla de la pulpa estaría asociada un marcador de tipo SNP (polimorfismo de nucleótido único), el cual genera la sustitución Phe226Val (Bang y col., 2007). Otro ejemplo es el caso de LCYE de lechuga (*L. sativa*) donde la

sustitución His457Leu lleva a la producción de  $\epsilon$ -caroteno (dos anillos  $\epsilon$ ) a partir de licopeno y en ausencia de esta sustitución, LCYE solo es capaz de ciclar uno de los extremos de licopeno (Cunningham y col., 2001).

En nuestro trabajo se seleccionaron 2 variantes de MdPSY2, cada una con mutaciones puntuales y dos escisiones. Ellas poseen la sustitución ADNc.1073A<T que genera el cambio de una Tyr por una Phe en la posición 358 (Tyr358Phe) y la escisión ADNc.91\_110del (Arg30\_Leu37del) ubicada dentro de la región predicha como péptido de tránsito (**sección 3.1**).

Si bien Tyr358, presente en MdPSY2, no es un residuo que forme parte de los sitios funcionales que son conservados entre las enzimas PSY (sitio activo, sitio de unión a sustrato, regiones de unión a sustrato-Mg<sup>2+</sup> y tapa del sitio activo), este residuo es ampliamente conservado entre dicotiledóneas y monocotiledóneas. Además, de ubicarse en una región altamente conservada, Tyr358 se encuentra entre una región involucrada en mantener al intermediario prefitoeno pirofosfato (PPPP) alejado del solvente (tapa del sitio activo) y otra que involucra a tres residuos que forman parte de los sitios catalítico y de unión a sustrato. Lo anterior es posible reconocerlo al observar la secuencia aminoacídica (**figura 4**); sin embargo, la estructura terciaria de la misma puede arrojar mayor información respecto a la interacción de Tyr358 con sitios funcionales de MdPSY2, y como la sustitución de Tyr358 por una Phe puede afectar a la estructura o actividad de la misma.

#### 4.2. Evaluación de la funcionalidad de MdPSY3, MdPSY2 y las mutantes MdPSY2\_F y MdPSY2\_CG

Se usó el sistema de expresión pET por ser un sistema inducible, en que se inhibe la expresión basal a través del inhibidor *LacI* y que al ser inducido por IPTG, es capaz de direccionar el flujo metabólico hacia la expresión del gen de interés (tabla II). Por otro lado, *E. coli* fue seleccionado como modelo de estudio, puesto que ha sido ampliamente usado en ensayos de complementación heteróloga con el fin de evaluar la funcionalidad de genes carotenogénicos (Misawa y col., 1990; Bartley y col., 1991; Cunningham y col. 1991; Gallagher y col., 2003) (tabla III).

Las células transformadas con las construcciones pET28/MdPSY3, pET28/MdPSY2, pET28/MdPSY2\_F y pET28/MdPSY2\_CG mostraron una coloración amarilla de diferente intensidad (figura 11) y que se ajusta al fenotipo de la cepa usada como control positivo (*E. coli* pDS1B). Las cepas que fueron transformadas con pET28/MdPSY3 y pET28/MdPSY2 contienen hasta dos veces más carotenoides respecto a las que fueron transformadas con pET28/MdPSY2\_F y pET28/MdPSY2\_CG (Figura 12). Resulta interesante el hecho que MdPSY2 y MdPSY3 comparten el residuo Tyr358, el cual los diferencia de las mutantes MdPSY2\_F y MdPSY2\_CG.

Si bien ninguna de las cepas alcanzó el nivel de carotenoides del control positivo, el simple hecho de acumularlos da cuenta de la presencia de una enzima con actividad fitoeno sintasa capaz de revertir el fenotipo mutante de la cepa de *E. coli*. El bajo nivel de carotenoides respecto al control se debe a que la actividad de las enzimas carotenogénicas está determinado por su interacción con estructuras de membranas y otras proteínas, y en el caso de MdPSY en un sistema que no es vegetal, estas interacciones pueden verse afectadas. (Bonk y col., 1997; Ruiz-Sola y

Rodríguez-Concepción, 2012; Song y col., 2013; Shumskaya y col., 2013). Lo anterior se ejemplifica en un trabajo realizado por Welsh (Welsh y col, 2010), en el cual se realizaron ensayos *in-vitro* con PSY de yuca (*M. esculenta*); sin embargo, no fue posible realizar la reacción *in-vitro* en ausencia de GGPPS. Lo anterior da cuenta de la importancia de la interacción proteína-proteína entre PSY y GGPPS, la cual ha sido ampliamente reportada y en la que además participaría IPI (Cunningham y Gantt, 1998; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012; Shumskaya y col., 2013). De ésta manera, la mutación Tyr358Phe puede llevar a cambios estructurales de MdPSY2 que afecten a las interacciones de tipo proteína-proteína y/o proteína-membrana, lo que explicaría la menor actividad (medida en cantidad de  $\beta$ -caroteno y carotenoides totales producido) de la mutante MdPSY2\_F respecto a MdPSY2.

El modelamiento por homología de la estructura terciaria de MdPSY3, MdPSY2\_F y MdPSY2 permitió visualizar el entorno en que se encuentra el residuo Tyr/Phe358. Esto permitió predecir posibles interacciones con su vecindad, que podrían verse afectadas por la sustitución Tyr358Phe.

#### **4.3. Modelamiento *in-silico* de MdPSY3, MdPSY2 y la mutante MdPSY2\_F**

A la fecha no ha sido posible obtener estructuras cristalizadas de PSY de plantas, sin embargo, como aproximación se ha realizado el modelamiento por homología (Sharma y col., 2010; Shumskaya y col., 2012) o la predicción de su estructura secundaria (Gady y col., 2012). El modelamiento por homología ha sido realizado a partir de las estructuras cristalizadas de enzimas de la familia TIPPSHH, disponibles en la base de datos de PDB. Estas últimas fueron usadas en el presente

trabajo como moldes para obtener un modelo de la estructura terciaria de las enzimas MdPSY (**figura 3**).

Al realizar la superposición de los modelos de MdPSY2, MdPSY2\_F y MdPSY3 se observó que todos comparten una estructura central conformada por cinco  $\alpha$ -hélices, las que rodean una cavidad central donde se aloja el sustrato. Esta estructura es similar a las de otras enzimas de la subfamilia TIPPSHH que han sido cristalizadas (Pandit y col., 2000; Liu y col., 2008). El bucle en el que se encuentra Tyr/Phe358 incluye además uno de los dos sitios involucrados en la entrada al sitio activo (**figura 17**). Estas regiones están involucradas en la primera reacción que media la formación y estabilización del intermediario prefitoeno (**sección 1.3, figura 2**) impidiendo que moléculas de agua interactúen con este (Pandit y col., 2000).

Si bien el residuo Tyr358 no interactuaría directamente con el sustrato o con alguno de los sitios conservados, el cambio de Tyr por un residuo apolar como Phe, podría afectar la posible formación de puentes de hidrógenos con Glu354 (**figura 20**) y favorecer una interacción de tipo Van der Waals con el entorno hidrofóbico (**figura 19**). Estas interacciones podría afectar la movilidad de la región involucrada en la estabilización del intermediario, llevando a una disminución en la actividad enzimática. Sin embargo, para validar este supuesto y tener una mejor aproximación, se hacen necesarios mayores análisis a través de dinámica molecular y/o "Docking" de manera que permitan entender como el cambio de un residuo dentro del bucle que incluye a la tapa del sitio activo, puede afectar la interacción entre la enzima y el sustrato o intermediario.

## CONCLUSIONES

- Existen variantes de *MdPSY2* que presentan tres mutaciones puntuales, una de ellas neutra y una escisión. Las enzimas codificadas presentan una escisión Arg30\_Leu37del y una sustitución Glu41Ser, ambas en la región amino terminal y una sustitución Tyr358Phe en una región altamente conservada de la enzima.
- *MdPSY3* y las mutantes de *MdPSY2* (*MdPSY2\_CG* y *MdPSY2\_F*) codifican enzimas con actividad fitoeno sintasa, las cuales son capaces de restituir el fenotipo de la cepa recombinante de *E. coli* pDS1B  $\Delta crtB$ .
- En *E. coli*, la sustitución Tyr358Phe en *MdPSY2* conduce a una menor efectividad enzimática, que es reflejado en el menor nivel de  $\beta$ -caroteno acumulado en la cepa mutantes complementada.
- La estructura terciaria de *MdPSY3*, *MdPSY2*, *MdPSY2\_F* es altamente conservada y la sustitución Tyr358Phe no genera cambios dramáticos dentro de la estructura de *MdPSY2*.



## BIBLIOGRAFÍA

- Ahrazem O., Rubio-Moraga A., López R. C. y Gómez-Gómez L. (2010).** The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors. *Journal of experimental botany*. **61**: 105 – 119.
- Akiyama K. y Hayashi H. (2006).** Strigolactones: Chemical Signals for Fungal Symbionts and Parasitic Weed in Plant Roots. *Annals of Botany* **97**: 925 – 931.
- Ampomah-Dwamena C., Dejnopratt S., Lewis D., Sutherland P., Volz R. y Allan A. (2012)** Metabolic and gene expression analysis of apple (*Malus x domestica*) carotenogenesis. *J Exp Bot* **63**: 4497 – 4511.
- Armstrong G. y Hearst J. (1996).** Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* **10**: 228 – 237.
- Auldridge M., McCarty D., y Klee J. (2006).** Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Current opinion in plant biology*. **9**: 315 – 321.
- Bang H., Kim S., Leskovar D., y King, S. (2007).** Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in lycopene  $\beta$ -cyclase (LCYB) gene. *Molecular Breeding*, **20**(1), 63-72
- Besserer A., Puech-Pagès V., Kiefer P., Gomez-Roldan V., Jauneau A., Roy S., Portais JC., Roux C., Bécard G y Séjalon-Delmas N. (2006).** Strigolactones Stimulate Arbuscular Mycorrhizal Fungi by Activating Mitochondria. *Plos Biology*. **4**: e226.
- Beyer, P. (2010).** Golden Rice and 'Golden'crops for human nutrition. *New biotechnology*. **27**: 478 – 481.
- Bhullar N., y Gruissem W. (2013).** Nutritional enhancement of rice for human health: the contribution of biotechnology. *Biotechnology advances*. **31**: 50 – 57.
- Britton G. (1995).** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* **9**: 1551 – 1558.
- Bruce B. (2001).** The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1541**: 2 – 21.
- Caicedo A. L., Williamson S. H., Hernandez R. D., Boyko A., Fledel-Alon A., York T. L., Olsen K. M., Nielsen R., McCouch S. R., Bustamante C. D. y Purugganan, M. D. (2007).** Genome-wide patterns of nucleotide polymorphism in domesticated rice. *PLoS genetics*, **3**: 1289-1299.
- Cazzonelli C. y Pogson B. (2010).** Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*. **15**: 266 – 274.

- Cerda A. (2013).** Identificación y evaluación de la expresión de genes carotenogénicos y determinación de la composición de carotenoides en manzanos (*Malus domestica* cv. Fuji). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Chang C, Bearden J, Li H, Joachimiak (2012).** A Crystal Structure of Squalene Synthase HpnC From *Alicyclobacillus Acidocaldarius*. DOI:10.2210/pdb4hd1/pdb
- Chen Y., Li F. y Wurtzel E. (2010).** Isolation and characterization of the Z-ISO gene encoding a missing component of carotenoid biosynthesis in plants. *Plant Physiology*. **153**: 66 – 79.
- Clotault J., Peltier D., Berruyer R., Thomas M., Briard M., y Geoffriau E. (2008).** Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *Journal of experimental botany*. **59**: 3563 – 3573.
- Cooper D. (2004).** Carotenoids in health and disease: Recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *The Journal of Nutrition*. **1**: 2215 – 2245.
- Cornille A., Gladieux P., Smulders M., Roldán-Ruiz I., Laurens F., Le Cam B., Nersesyan A., Clavel J., Olonova M., Feugey L., Gabrielyan I., Zhang X., Tenailon M. y Giraud T. (2012).** New insight into the history of domesticated apple: secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLoS genetics*. **8**: e1002703.
- Cornille A., Giraud T., Smulders M. J., Roldán-Ruiz I., y Gladieux P. (2014).** The domestication and evolutionary ecology of apples. *Trends in Genetics*, **30**: 57-65.
- Couso I., Vila M., Rodriguez H., Vargas M. y León R. (2011).** Overexpression of an exogenous phytoene synthase gene in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* leads to an increase in the content of carotenoids. *Biotechnology progress*, **27**: 54 – 60.
- Cunningham F., Pogson B., Sun Z., McDonald K., DellaPenna D., y Gantt E. (1996).** Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *The Plant Cell Online*. **8**: 1613 – 1626.
- Cunningham F. y Gantt E. (1998).** Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 557 – 583.
- Cunningham F. X., y Gantt E. (2001).** One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene  $\epsilon$ -cyclases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(5), 2905-2910
- Cunningham F. (2002).** Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure Appl. Chem.* **74**: 1409 – 1417.
- Demmig-Adams B. y Adams W. (1996).** The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trend in plant science*. **1**: 21 – 26.
- Den Dunnen J. T., y Antonarakis S. E. (2000).** Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Human mutation*, **15**: 7-12
- Díaz G. (2013).** Identificación de genes que codifican para la enzima licopeno  $\beta$ -ciclase en *Malus domestica* y su evaluación por expresión heteróloga en *Escherichia coli*. Universidad de Chile, Santiago, Chile

- Dogbo O., Laferrière A., d'Harlingue A., y Camara B. (1988).** Carotenoid biosynthesis: Isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **85**: 7054 – 7058.
- Ducieux L. J., Morris W. L., Hedley P. E., Shepherd T., Davies, H. V., Millam S., y Taylor M. A. (2005).** Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of  $\beta$ -carotene and lutein. *Journal of experimental botany*, **56**: 81 – 89.
- Ellstrand N. C., y Marshall D. L. (1985).** The impact of domestication on distribution of allozyme variation within and among cultivars of radish, *Raphanus sativus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, **69**: 393-398.
- Frank H. y Cogdell R. (1996).** Carotenoid in Photosynthesis. *Photochemistry and Photobiology*. **63**: 257 – 264.
- Fraser P., Kiano J., Truesdale M., Schuch W., y Bramley P. (1999).** Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant molecular biology*. **40**: 687 – 698.
- Fraser P., Schuch W., y Bramley P. (2000).** Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts – partial purification and biochemical properties. *Planta*. **211**: 361 – 369.
- Fraser P., Romer S., Shipton C., Mills P., Kiano J., Misawa N., Drake R., Schuch W. y Bramley P. (2002).** Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **99**: 1092 – 1097.
- Fraser P. y Bramley P. (2004).** The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*. **43**: 228 – 265.
- Fuentes P., Pizarro L., Moreno J., Handford M., Rodriguez-Concepcion M. y Stange C. (2012).** Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant molecular biology*. **79**: 47 – 59.
- Gady A. L., Vriezen W. H., Van de Wal M. H., Huang P., Bovy A. G., Visser R. G., y Bachem, C. W. (2012).** Induced point mutations in the phytoene synthase 1 gene cause differences in carotenoid content during tomato fruit ripening. *Molecular Breeding*. **29**: 801-812.
- Giorio G., Stigliani A. y D'Ambrosio C. (2007).** Agronomic performance and transcriptional analysis of carotenoid biosynthesis in fruits of transgenic HighCaro and control tomato lines under field conditions. *Transgenic Res*. **16**: 15 – 28.
- Giuliano G., Giliberto L., y Rosati C. (2002).** Carotenoid isomerase: a tale of light and isomers. *Trends in plant science*. **7**: 427 – 429.
- Giovannoni, J. (2001).** Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual review of plant biology*. **52**: 725 – 749.
- Harris S. A., Robinson J. P., y Juniper B. E. (2002).** Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics*, **18**: 426-430.
- Hirschberg J., Cohen M., Harker M., Lotan T., Mann V., y Pecker I. (1997).** Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *GENE*. **10**: 2151 – 2158.

- Höfer M. y Meister A. (2010). Genome size variation in *Malus* species. *Journal of Botany*. **2010**: e480873
- Huang F., Molnár P., y Schwab W. (2009). Cloning and functional characterization of carotenoid cleavage dioxygenase 4 genes. *Journal of experimental botany*. **60**: 3011 – 3022.
- Hirschberg J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 210 – 218.
- Howitt C. y Pogson B. (2006). Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment* **29**: 435 – 445.
- Isaacson T., Ohad I., Beyer P. y Hirschberg J. (2004). Analysis in vitro of the enzyme CRTISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants. *Plant physiology*. **136**: 4246 – 4255.
- Iwata-Reuyl D., Math S., Desai S. y Poulter C. (2003). Bacterial phytoene synthase: molecular cloning, expression, and characterization of *Erwinia herbicola* phytoene synthase. *Biochemistry*. **42**: 3359 – 3365.
- Janick, J. y Moore, J. N. (1996). Apples. *En John Wiley & Sons* (eds), Fruit breeding, tree and tropical fruits. pp 1 – 77
- Kato M., Ikoma Y., Matsumoto H., Sugiura M., Hyodo H., y Yano, M. (2004). Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology*. **134**: 824 – 837.
- Li F., Vallabhaneni R., Yu J., Rocheford T., y Wurtzel, E. (2008). The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant physiology*. **147**: 1334 – 1346.
- Liu C. I., Liu G. Y., Song Y., Yin F., Hensler M. E., Jeng W. Y., Nizet V., Wang A., y Oldfield, E. (2008). A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *Science*. **319**: 1391 – 1394.
- Liu C. I., Jeng W. Y., Chang W. J., Ko T. P., y Wang A. H. J. (2012). Binding modes of zaragozic acid A to human squalene synthase and staphylococcal dehydrosqualene synthase. *Journal of Biological Chemistry*. **287**: 18750-18757
- López-Ráez J. A., Charnikhova T., Gómez-Roldán V., Matusova R., Kohlen W., De Vos R., Verstappen F., Puech-Pages V., Bécard G., Mulder P. y Bouwmeester H. (2008). Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytologist*. **178**: 863 – 874.
- Maass D., Arango J., Wust F., Beyer P. y Welsch R. (2009). Carotenoid Crystal Formation in *Arabidopsis* and Carrot Roots Caused by Increased Phytoene Synthase Protein Levels. *Plos One*. **4**: e6373.
- Mayne S. (1996). Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J*. **10**: 690 – 701.
- Moehs C., Tian L., Osteryoung K. y DellaPenna D. (2001). Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant molecular biology*. **45**: 281 – 293.

- Naik P., Chanemougasoundharam A., Paul S. y Kalloo G. (2003).** Genetic manipulation of carotenoid pathway in higher plants. *Current Science*. **85**: 1423 – 1430.
- 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.
- Paine J., Shipton C., Chaggar S., Howels R., Kennedy M., Vernon G., Wright S., Hinchliffe E., Adams J., Silverstone A. y Drake R. (2005).** Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology*. **4**: 482 – 487.
- Pandit J., Danley D. E., Schulte G. K., Mazzalupo S., Pauly T. A., Hayward C. M., Hamanaka E., Thompson J. y Harwood H. J. (2000).** Crystal Structure of Human Squalene Synthase A key enzyme in cholesterol biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. **275**: 30610-30617.
- Park H., Kreunen S., Cuttriss A., DellaPenna D., y Pogson B. (2002).** Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. *The Plant Cell Online*. **14**: 321 – 332.
- Pizarro L. y Stange C. (2009).** Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plant. *Ciencia e investigación agraria*. **36**: 143 – 162.
- Purugganan M. D., y Fuller D. Q. (2009).** The nature of selection during plant domestication. *Nature*, **457**: 843-848.
- Rao A. y Rao L. (2007).** Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*. **55**: 207 – 216.
- Rodriguez-Concepcion M. y Stange, C. (2013).** Biosynthesis of carotenoids in carrot: An underground story comes to light. *Archives of biochemistry and biophysics* **539**: 110 – 116.
- Rodermel S. (2001).** Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends in plant Science*. **6**: 471 – 478.
- Ronen G., Cohen M., Zamir D. y Hirschberg J. (1999).** Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *The Plant Journal*, **17**: 341 – 351.
- Ruiz-Sola M., y Rodríguez-Concepción M. (2012).** Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, **10**: e0158.
- Sandmann G., Romer S. y Fraser P. (2006).** Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metabolic Engineering*. **8**: 291 – 301.
- Sajilata M., Singhal R. y Kamat M. (2008).** The carotenoid pigment zeaxanthin – A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. **7**: 29 – 49.
- Schledz M., Al-Babili S., Lintig J. V., Haubruck H., Rabbani S., Kleinig H., y Beyer P. (1996).** Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering. *The Plant Journal*. **10**: 781 – 792.

**Schofield A. y Paliyath G. (2005).** Modulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening through phytochrome regulation of phytoene synthase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*. **43**: 1052 – 1060.

**Sharma A., Punetha A., Grover A., y Sundar D. (2010).** Insights into the key enzymes of secondary metabolites biosynthesis in *Camellia sinensis*. *J Bioinform Seq Anal*. **2**: 53-68.

**Shewmaker C., Sheehy J., Daley M., Colburn S. y Dang, Y. (2002).** Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *The Plant Journal*. **20**: 401 – 412.

**Shumskaya M., Bradbury L., Monaco R. y Wurtzel T. (2012).** Plastid localization of the key carotenoid enzyme phytoene synthase is altered by isozyme, allelic variation, and activity. *The Plant Cell Online*. **24**: 3725 – 3741.

**Shumskaya M. y Wurtzel E. (2013).** The carotenoid biosynthetic pathway: thinking in all dimensions. *Plant Science*. **208**: 58 – 63.

**Sonnante G., Stockton T., Nodari, R. O., Velásquez V. B., y Gepts P. (1994)** Evolution of genetic diversity during the domestication of common-bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Theoretical and Applied Genetics*, **89**: 629-635.

**Stange C. y Flores C. (2011).** Carotenoids and Photosynthesis-Regulation of Carotenoid Biosynthesis by Photoreceptor. *En Intech* (eds.), *Advances in Photosynthesis-Fundamental Aspects*. pp 77 – 96.

**Tao N., Hu Z., Liu Q., Xu J., Cheng Y., Guo L., Guo W. y Deng X. (2007).** Expression of phytoene synthase gene (*PSY*) is enhanced during fruit ripening of Cara Cara navel orange (*Citrus sinensis Osbeck*). *Plant cell reports*. **26**: 837 – 843.

**Taylor I., Burbidge A. y Thompson A. (2000).** Control of abscisic acid synthesis. *Journal of Experimental Botany*. **51**: 1563 – 1574.

**Vleessschauwer D., Yang Y., Vera Cruz C. y Hofte M. (2010).** Abscisic Acid-Induced Resistance against the Brown Spot Pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in Rice Involves MAP Kinase-Mediated Repression of Ethylene Signaling. *Plant Physiology*. **152**: 2036 – 2052.

**Yoneyama K., Xie X., Yoneyama K y Takeuchi Y. (2008).** Strigolactones: structure and biological activities. *Pest Manag Sci*. **65**: 467 – 470.

**Vranová E., Coman D., y Gruissem W. (2013).** Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annual review of plant biology*. **64**: 665-700.

**Velasco R., Zharkikh A., Affourtit J., Dhingra A., Cestaro A., Kalyanaraman A., Fontana P., Bhatnagar S., 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 L., Gutin N., Lanchbury J., Macalma T., Mitchell J., 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 V., King S., Vick J., Tao Q., Mraz A., Stormo A., Stormo K., Bogden R., Ederle D., Stella A., Vecchietti A., Kater M., Masiero S., Lasserre P., Lespinasse Y., Allan A., Bus V., Chagne D., Crowhurst R., Gleave A., Lavezzo E., Fawcett J., Proost S., Rouze P., Sterck L., Toppo S., Lazzari B., Hellens R., Durel C.,**

**Gutin A., Bumgarner R., Gardiner S., Skolnick M., Egholm M., Van de Peer Y., Salamini F. y Viola R. (2010).** The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nat Genet* **42**: 833 – 839.

**von Lintig, J. y Wyss, A. (2001).** Molecular analysis of vitamin A formation: cloning and characterization of  $\beta$ -carotene 15, 15'-dioxygenases. *Archives of biochemistry and biophysics*. **385**: 47 – 52.

**Walter H., Floss D., y Strack D. (2010).** Apocarotenoids: hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles. *Planta*. **232**: 1 – 17.

**Wang Y., Yang Y., Fei Z., Yuan H., Fish T., Thannhauser T., Mazourek M., Kochian L., Wang X. y Li L. (2013).** Proteomic analysis of chromoplasts from six crop species reveals insights into chromoplast function and development. *Journal of experimental botany*. **64**: 949 – 961.

**Welsch R., Beyer P., Huguene y P., Kleinig H., y von Lintig J. (2000).** Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta*, **211**: 846 – 854.

**Welsch R., Medina J., Giuliano G., Beyer P. y von Lintig, J. (2003).** Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. **216**: 523-534.

**Welsch R., Arango J., Bär C., Salazar B., Al-Babili S., Beltrán J., Chavarriaga P., Caballos H., Tohme J. y Beyer P. (2010).** Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene. *The Plant Cell Online*, **22**: 3348 – 3356.

**Woodall A., Lee S., Weesie R., Jackson M. y Britton G. (1997).** Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1336**: 33 – 42.

**Wright S. I., Bi I. V., Schroeder S. G., Yamasaki M., Doebley J. F., McMullen M. D., y Gaut B. S. (2005).** The effects of artificial selection on the maize genome. *Science*, **308**(5726), 1310-1314.

**Zeevaart J. y Creelman R. (1988).** Metabolism and Physiology of Abscisic Acid. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**: 439 – 473.

**Zeder M. A. (2006).** Central questions in the domestication of plants and animals. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, **15**: 105-117.

**Zhu C., Yamamura S., Koiwa H., Nishihara M., y Sandmann G. (2002).** cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea*. *Plant molecular biology*, **48**: 277 – 285.

## ANEXOS

### 7.1. Anexo 1: Secuencias aminoacídicas de las enzimas MdPSY

#### MdPSY2:

MSGVLLWVVS PKENASSLLGLMPRICTPRRSKFCPKLGFSGRVLAYS GAVVNPARSSEEKVYEV  
VLKQAALVKEQSTVKRKS L D L D E R I V T E G L D N W D L L D K A Y D R C G E V C A E Y A K T F Y L G T L L M T P E  
RRRAVWAIYVWCRRTDELVDGPNASYITPKALDRWEKRLTDLFEGRPYDMYDAALS D T V T K Y P V  
DIQPF R D M V E G M R L D L R K S R Y Q N F D E L Y L Y C Y Y V A G T V G L M S V P V M G I C P E S S A S T E S V Y N A A L  
ALGIANQLTNILRDVGEDARRGRVYLPQDELAQAGLS D D D I F R G K V T D K W Q S F M K G Q I K R A R M F  
FDEAEKGVSELNSASRWPVWASLLLYRQILD A I E A N G Y D N F T K R A Y V G K A K K F V S L P V A Y G R A I  
IGPSKLT K Q L V L R

#### MdPSY2\_F:

MSGVLLWVVS PKENASSLLGLMPRICTPRRSKFCPKLGFSGRVLAYS GAVVNPARSSEEKVYEV  
VLKQAALVKEQSTVKRKS L D L D E R I V T E G L D N W D L L D K A Y D R C G E V C A E Y A K T F Y L G T L L M T P E  
RRRAVWAIYVWCRRTDELVDGPNASYITPKALDRWEKRLTDLFEGRPYDMYDAALS D T V T K Y P V  
DIQPF R D M V E G M R L D L R K S R Y Q N F D E L Y L Y C Y Y V A G T V G L M S V P V M G I C P E S S A S T E S V Y N A A L  
ALGIANQLTNILRDVGEDARRGRVYLPQDELAQAGLS D D D I F R G K V T D K W Q S F M K G Q I K R A R M F  
FDEAEKGVSELNSASRWPVWASLLLYRQILD A I E A N G F D N F T K R A Y V G K A K K F V S L P V A Y G R A I  
IGPSKLT K Q L V L R

#### MdPSY3:

MSVALVWVVS P N T E V F K F Y G I L D S S R F V F G N R S S I R A K M G G K Q D W K S C S L S T D V K Y S S V G G S G L  
GSEAKFPVSLSMVANPLGESAVSSEQVYDVVLKQASLVKKQLRSNGYLDVKPDIILPGNLSLL  
SKAYDRCGEVCAEYAKTFYLG T L L M T P E R R R A I W A I Y V W C R R T D E L V D G P N A S H I T P T A L D R W E  
LRLDDL F Q G R P F D M L D A A L S D T V T K F P V D I Q P F K D M I E G M R M D L R K S R Y Q N F D E L Y L Y C Y Y V A G  
TVGLMSVPVMG I S P E S Q A T T E S V Y N A A L A L G I A N Q L T N I L R D V G E D A R R G R I Y L P Q D E L E E A G L  
SDADIYAGKVTDKWRSFMKDQIKRARMFFDEAEKGVTEELSEASRWPV LASLLLYRQILDEIEAN  
DYNFNTRRAYVSKAKKLLALPIAYTKSII R P S R T S P E L R K Y N L

## 7.2. Anexo 2: Alineamientos usado en el modelamiento por homología.

```

MdPSY2  ---WDL LDKAYDR GEVCAEYAKT YLGTLLMTPERRAWWAI YWCRRTDELVDGPNASYITP----- 61
4HD1    MGSVPVELRGDFEVCRRLLTRSHYENFSVSLFVPRHLRPHFYSVYAFCRGVDDLGDEFAGDR--M----- 63
2ZCO    ---MTMMDMNFKYCHKIMKKHKSFSYAFDLLPEDQRKAWWAIYAVCRKIDDSIDVYGDIQFLNQIKEDI 67
3VJ8    -----SLSSSLKTKYKYLNQTSRSFAAVIQALDGMENAVCIFLVLBALDTLEDDMTISVE-----KKV 60

MdPSY2  KALDRWE-----KRLTDLFEGRPYD-----MYDAALSDTVTKYPVDIQ---PFRDMVEGMRLDLRKSRY 117
4HD1    AALDAYE-----EELRRAFAGEATT-----PAFRALQFTIATCNLPM-----PFLRLIEANRRDQRKHTY 119
2ZCO    QSIKQYP-----YEYHFFQSD---R-----RIMMALQHVAQHKNIAFQ---SFYNLIDTVYKQDQHTMF 120
3VJ8    PLLHNFHFSFLYQPDWRFMESKEKDRQVLEDFPTISLEFRNLAEKYQTVIADICRRMGIGMAEFLDKHVTSE 131

MdPSY2  QNFDEL LYL YCYVYVAGTVGLMSVPMVGMICPESSASTESVYNAALALGIANQLTNI LRDVGEDARRGRVYLPQ 188
4HD1    DTWEDLRDYCRYSADPVGRRLVGLIFGCLDDERARLSDAT-----CTALQVANHMQIDRDLALGRIVYVPR 184
2ZCO    ETDALFGLYCYVYVAGTVGEVLTPI LSDH-----ETHQTYDVARRLGESLQLINILRDLVGEDFENERIYFSK 186
3VJ8    Q---EADKYCHYVAGLVGIGLSRFLSASEFEDPLVGEDTERANSMGLFLQKTNIIIRDYLEDDQQGREFWQP 199

MdPSY2  DELAQAGLSDDDI FRGKVTD---KWQSFMKGQIKRARMFDEAEKGVSELN--SASRWPWASLLLYRQI 253
4HD1    ADLEQFATLDDIRARRATD---GVRRCIALEVDRAQALFDEGRRLLES LVP--PRLARQLKLYRLGGEA 249
2ZCO    QRLKQYEVDAEYVQNGVNNHYIDLWEYYAAIAEKDFRDVMDQIKVFSIEAQ-----PIIELAARLYIE 251
3VJ8    EWSRYVKKLGDFAKPENID---LAVQCLNELITNALHHIPDVI TYLSRLRNQSVFNFCAPQVMAIATL 266

MdPSY2  LDAIEANGYDNFTKRAYVQKAKKF-VSLPVA-----YGRAI-IGPSKL-TKQLVLR-- 301
4HD1    LAAIRRQGYNPFAGRPVYSGKQKLRIALSVL-----AGGAKGEGGSA----- 291
2ZCO    LDEVROANYTL-HERVFEKRKKAKLFHEIN-----SK-----Y----- 284
3VJ8    AACYNNQVFKGAVKIRKGOAVTLMMDATNMPAVKAIYQYMEEIYHRIPDSDPSSSKTRQIISTIRTO 335

```

Figura 21. Alineamiento entre MdPSY2 y los moldes 4HD1, 2ZCO y 3VJ8.

```

MdPSY2_F ---WDL LDKAYDR GEVCAEYAKT YLGTLLMTPERRAWWAI YWCRRTDELVDGPNASYITP----- 61
4HD1    MGSVPVELRGDFEVCRRLLTRSHYENFSVSLFVPRHLRPHFYSVYAFCRGVDDLGDEFAGDR--M----- 63
2ZCO    ---MTMMDMNFKYCHKIMKKHKSFSYAFDLLPEDQRKAWWAIYAVCRKIDDSIDVYGDIQFLNQIKEDI 67
3VJ8    -----SLSSSLKTKYKYLNQTSRSFAAVIQALDGMENAVCIFLVLBALDTLEDDMTISVE-----KKV 60

MdPSY2_F KALDRWE-----KRLTDLFEGRPYD-----MYDAALSDTVTKYPVDIQ---PFRDMVEGMRLDLRKSRY117
4HD1    AALDAYE-----EELRRAFAGEATT-----PAFRALQFTIATCNLPM-----PFLRLIEANRRDQRKHTY119
2ZCO    QSIKQYP-----YEYHFFQSD---R-----RIMMALQHVAQHKNIAFQ---SFYNLIDTVYKQDQHTMF120
3VJ8    PLLHNFHFSFLYQPDWRFMESKEKDRQVLEDFPTISLEFRNLAEKYQTVIADICRRMGIGMAEFLDKHVTSE131

MdPSY2_F QNFDEL LYL YCYVYVAGTVGLMSVPMVGMICPESSASTESVYNAALALGIANQLTNI LRDVGEDARRGRVYLPQ188
4HD1    DTWEDLRDYCRYSADPVGRRLVGLIFGCLDDERARLSDAT-----CTALQVANHMQIDRDLALGRIVYVPR184
2ZCO    ETDALFGLYCYVYVAGTVGEVLTPI LSDH-----ETHQTYDVARRLGESLQLINILRDLVGEDFENERIYFSK186
3VJ8    Q---EADKYCHYVAGLVGIGLSRFLSASEFEDPLVGEDTERANSMGLFLQKTNIIIRDYLEDDQQGREFWQP199

MdPSY2_F DELAQAGLSDDDI FRGKVTD---KWQSFMKGQIKRARMFDEAEKGVSELN--SASRWPWASLLLYRQI 253
4HD1    ADLEQFATLDDIRARRATD---GVRRCIALEVDRAQALFDEGRRLLES LVP--PRLARQLKLYRLGGEA 249
2ZCO    QRLKQYEVDAEYVQNGVNNHYIDLWEYYAAIAEKDFRDVMDQIKVFSIEAQ-----PIIELAARLYIE 251
3VJ8    EWSRYVKKLGDFAKPENID---LAVQCLNELITNALHHIPDVI TYLSRLRNQSVFNFCAPQVMAIATL 266

MdPSY2_F LDAIEANGYDNFTKRAYVQKAKKF-VSLPVA-----YGRAI-IGPSKL-TKQLVLR-- 301
4HD1    LAAIRRQGYNPFAGRPVYSGKQKLRIALSVL-----AGGAKGEGGSA----- 291
2ZCO    LDEVROANYTL-LHERVFEKRKKAKLFHEIN-----SK-----Y----- 284
3VJ8    AACYNNQVFKGAVKIRKGOAVTLMMDATNMPAVKAIYQYMEEIYHRIPDSDPSSSKTRQIISTIRTO 335

```

Figura 22. Alineamiento entre MdPSY2\_F y los moldes 4HD1, 2ZCO y 3VJ8.

```

MdPSY3  ---LSSLKAYDRGGEVCAEYAKTYLGLTLLMTPERRAIWAIYWCFRTEDELVDGPNASHIT-----PTA 63
4HD1    MGSVPVELRGDFEVCRRRLTRSHYENFSVVS L FVPRHLRPHFYSVYAFCRGVDDLGDFAAGDR-----MAA 65
2ZCO    ---MTMMDMNFKYCHKIMKKHSKFSYAFDLLPEDQPKAWWAIYAVCRKIDDSIDVYGDIQFLNQIKEDIQS 69
3VJ8    -----S LSSSLKTYKYLNQTSRSFAAVIQALDGE MNAVCI F LVLVHALDTLED DMTISVEK-----KVPL 62

MdPSY3  LDR---WELR---LDDLFGQRP-----FDML---DAAL-----SDTVTKFPVDIQPFKDMI EGM RMDLR 113
4HD1    LDA---YEEE--LRRAFAGEA-----TPA---FRAL-----QFTIATCNLPMEPFLRLIEANRRDQR 115
2ZCO    IEK---YPYE--YHHFQSD-----RRI---MMAL-----QHVAQHKNI AFQSFYNLIDTVYKQDH 116
3VJ8    LHNHFSFLYQPDWRFMESKEKDRQVLEDFPTISLEFRNLAEKYQTVIADICRRMIGMA-----EFLDKH 127

MdPSY3  KSR YQNFD ELYL YCY YVAGT YGLMSVPVMG I SPESQATTESVYNAALALGIANQLTNI LR DVGEDARRGR IYL 186
4HD1    KHTYD T WEDLRD YCRYSADPYGR LVLGI FGCLDDERARLSDAT-----CTALCVANHMQDIDRDLALGR IYV 182
2ZCO    FTMFETDAELFGYCYGVAGT YGEVLTPI LSDHE-----THQTYDVARRLGESLQLINILRDVGEDFENER IYF 184
3VJ8    VTSEQ---EWDK YCHYVAGLVG IGLSRLFSASEFEDPLVGEDTERANSMGLFLCKTN IIRDYLEDQGGREFW 197

MdPSY3  PQDEL EEAGLSDAD IYAGK VTDK ---VRSFMKDQIKRARMFFDEAEKGVTELS--EASRWPV LASLLLYRQ I 253
4HD1    PRADLEQFGATLDDIRARRATDG---VRRCI ALEVDR AQALFDEGRRLLES LVP--PRLARQLKLYR LGGEA I 249
2ZCO    SKORL KQYEVD IAEVYQNGVNNHYIDLWEY YAAIAEKDFRDVMDQIKVFSIEAQ-----PI IELAARIYIE I 251
3VJ8    PQEVMRSRYVKKLGDFAKPENIDL---AVQCLNEL I TNALHHIPDVIYLSRLRNQSVFNFCAIPQVMAIATL 266

MdPSY3  LDE I EANDYNNFTRRAYYSKAKKLLALPIAYTKS IIR-----PSR--TSPELRKYNL--- 303
4HD1    LAA IRRQGYNPFAGR P VYSGKQKLR I ALSVLAGGA-K-----GEG--GSA----- 291
2ZCO    LDEV RQAN YTLH-ERVFYEKRKKAKLFHEIN SKY----- 284
3VJ8    AACYNNQVFKGAVKIRKQAVTLMMDATNMPAVKAIYQYMEE IYHRIPDSDPSSSKTRQI I STIR TQ 335

```

Figura 23. Alineamiento entre MdPSY3 y los moldes 4HD1, 2ZCO y 3VJ8.

7.3. Anexo 3: Secuencia de *MdPSY2* y *MdPSY3* anotada desde el borrador del genoma de *M. domestica*. En negrita aparecen destacados los nucleótidos asociados a las sustituciones ADNc.468A<G (R) y ADNc.1073A<T (W) en *MdPSY2*. De igual forma se destacan en *MdPSY3*, los residuos que pueden ser A o T (W) y G o A (R). Sitios de inicio (ATG) y término de la traducción (TGA) aparecen subrayados y en negrita.

**MdPSY2:** gi|651213248:c11203529-11200214 *Malus x domestica* cultivar Golden Delicious chromosome 9, MalDomGD1.0 Primary Assembly, whole genome shotgun sequence

```

TACTAGACACACATTTGCCAACTACCACTGCTTTCAAACTTTGCCTTACCCTCCAATCTCCATAAGAGA
RGCCACAACCTCACAGCTCACATACTCACACCCTCACACTCAAACCTAAAACCCAATGTCAGGTGTTCT
ACTCTGGGTGGTGAGCCCCAAAGAGAATGCCAGCTCCCTACTGGGTCTGATGCCCAGAATTTGCACCCCA
AGGAGGTCATAATCTGCCCAAAGCTGGGATTTTCAAGTAGGGTTTTGGCCTACTCGGGTGCAGTTGTAA
ACCCAGCAAGATCTTCAGAAGAGAAGGTGTATGAAGTGGTGCTGAAGCAGGCTGCGCTGGTGAAGAACA
GAGCACGGTAAAAAGGAAATCTCTGRATTTGGATGAACGGATTGTAAGTGAAGGTTTGGACAACCTGGGAT
TTACTGGATAAGGCTTATGATCGGTGTGGTGAAGTCTGTGCTGAGTATGCCAAAACCTTTTTACCTGGGTA
AGAACTTTTTCTGGATTTCTGCTGCTCCTCCTTCATCGATCTGTTTCTGTGGTGTGTTTTTGTCTGTCTGT
TTATCTGTTTATCTTTTTTTTTTAATGGGATCCAGTCATTTTCGTGGATATAGAATATACTAATTAAGT
ACACTATTTTAATAAAGTGGACAGAGCACTTGATTTTGTTCATTTTTTATTGTTCAAGCAGTTTAGTG
CACATCTTGGATTACTTTTTACTCCTAAAACGTTACACGCTGAGTCTTAAGTAGTTTATATCATCATTCA
CTCAATACTTAATTTGGAAGTCATGGGAAGAGAGAAGGAAATATAGTTAATCTAAGTATCTGTTCTGATT
TTTCAAGCATTGAATACGGATTTTAATATGGAATCTACACTGTTTTTTGTGGTCCCATATGTTAGTAAACA
CAAAAAGTCCGCAATTTGAATTAATAACCAACACTCATGTTTTAGTAAGCACACGGAAGTTAAGAATCTGA
CTAATTTCTAATTTTTCATTGTCATGCAAGTAAAGGGAAATGGAGAAATGGATTGGAATTTGAGGGCAATTA
GATTAATTTCTACTTTTTCTAACTATTATTGCAGGCAAGAAAACCTGGAATCGTTTTTCTTTCCATTTTTTA
CTTGAAATGGATGTTCTATTTAATTTGGCAAGACACTGTACTTATCAACTTCTTTCTGTGTGTTTTCAGGC
ACATTTGCTCATGACACCGGAGCGGCGACGAGCTGTTTGGGCAATCTATGGTTAGGATATGCCTAACGTTG
CAAATTTAGTCCACTTAAAACCTGATTTCTACATGCTCTTTACAACCTGAGGCAACAAATCCCTTTTGGAAA
AAGCATTTTTTTCTGCATTAACATCTACTTGACTCAAATTTTTCATTTGTAAGATTGCAAATGAGGGAA

```

CAAATTGTGGATAATCTTTGGGCTCAGAGATTATTTAATGATTTGGAATGGTAAATACTAAATGAAGAGT  
GCTTCTTTTTTTCTTTCTGTCAGTGTGGTGCAGAAGGACAGATGAGCTAGTGGATGGACCTAATGCTTCA  
TACATTACGCCCAAAGCTCTTGACAGATGGGAGAAAAGACTGACTGATCTCTTTGAAGGCCGACCTTACG  
ATATGTATGATGCTGCTCTATCTGATACTGTCACCAAGTACCCTGTTGACATTGAGGTACAAATACCGCA  
TGCTCACAAATCAGATATTAACCTCTTTTTTATCTATFCGAAATTCGAAAAGTACGGAATGATTACCATA  
ATTTTGTTTTTTTGACAGCCCTTCAGAGACATGGTAGAAGGAATGAGATTAGACTTGAGGAAGTCAAGAT  
ACCAGAACTTTGATGAACTTTACCTTTACTGCTACTATGTTGCTGGAAGTGTGGATTGATGAGTGTTC  
GGTAATGGGGATATGCCAGAATCAAGCGCTCAACAGAAAGCGTTTACAATGCTGCATTGGCCCTTGG  
ATTGCTAATCAGCTCACTAACATTTCTGAGAGATGTTGGAGAAGAGTAAGTTTATTCTTATAATAAATGAG  
TCATTTTAAACATTCCATGTTTTAGAAAACCTGCTGTCAGCAGTATGAGTATGAACCATTGATTAGTCTAG  
CCTTTTCTTGAACGTGGTCGAGATTCACAGTATGATAACATAAATATTTATTTGGCAAGACAACATTGCA  
CATCCAAAATAATATGGTTATTGTTTCATGTCTAACTAAAAATTTGCTCTTTGAATTGATCATTAAAGTCT  
AGGAGAGGAAGAGTATATCTCCCCAAGATGAGCTTGCCTCAAGCCGGCCTATCAGACGATGACATCTTTC  
GCGGGAAGGTGACTGACAAGTGGCAAAGTTTCATGAAGGGACAAATAAAGAGAGCTAGGATGTTCTTTGA  
TGAGGCTGAGAAGGTGTCTCAGAGCTCAACTCAGCCAGTAGATGGCCAGTATGGGCATCTTTGTTGCTG  
TATAGGCAGATTCAGATGCAATTGAAGCAAATGGTT**W**TGACAATTTCAAAAAAGGGCTTATGTGGGAA  
AAGCAAAGAAGTTTGTATCATTGCCTGTGGCTATGGAAGAGCCATTATAGGACCTCTAAATTAATAA  
GCAGTTGGTCTTAGAT**TGA**ATTAGATGTTTAAATTAGATGATATTTGAAGTCTCAATCTCTAAATTTT  
ACAAAGTCCAACCTTGAAGTTGGTCTCAAGTCGAAATATGTAAATTTTTTATACTAATTTTTTTGTTT  
GTCAATCTTTTAAATTACCTGCGTTTGGATGATGATATAAAAGTAGTAATTAGTGGTAGAGTTAATAGA  
TGTGTGGTGAGAGTGGTCGCCATGGAGTGGTTGATAGATGTGTGAGGGGCGGTAGAGTGTCTCTAGTGA  
TAAGATGGTAGCAATTGTGGTTGTGGCATTGGCGGTGGTGTGGTGTGGGAGGTGGTGTGACAGTGT  
GGTGGATACGGTCGGAATGATGGTGGCAATTGCAATGACATTGGGGTTTCATGGTAGTACTTATGGTCA  
GAGAATATGGAGGTTGTGGCATAGAAAACGACGATAGTGGTGAGGATGGCTGCAACGATGGTTGTGGGGA  
TGGTGGTGGCGACTACGGTGACAATAACATCGGATCTCATTAGCCAACGTCATCAAACCTCACCACAACA  
CTCGCCAACAGCAACACTCGTTCTGTCGCGGACCAAAAATTTCTCTTTGCTTCTTCTTATCTCTTCTT  
CTCTTTTTCATACCACATCCAACCAGATCTGTTGCATGCTTGTCTTCTTATGTGGTGTAAAGTTTTAAATGT  
AAATAGAAATTTCTTTAATCTGTAA

**MDPSY3:** gi|651213248:30583244-30587221 Malus x domestica cultivar  
Golden Delicious chromosome 9, MalDomD1.0 Primary Assembly, whole  
genome shotgun sequence

CAAGAAACAAATGAATCAGCCAAATCTCAGTTTAAAGGGTTAAAAATATATAAAACAAAATTAGAAAACCA  
GAAGAAAAACATTTTTGTAGGAAATGGAAAACAGAGAAAACAAGTTAAGAACCAAACGCATTGTAGTTA  
GAGAGAGAATCTAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGTCTGGAAGAGTGGAGAGGTGAGGTGTGCGGTTATGG  
AGGAAAACGCTTAAATGGCCGTTGTTAGTTTGTATTTTTTTAGGGGAAGATGGTGACSCTTTGAACCTGG  
TTTTTTGGAAGATGCTGATGCTGCTTTTTCTTTAAGTAGACAGTGAAGTGGGTCTCTAAGCAAAGCAG  
CATCTACAAACCAACAACAGGTAGAGAACCCGT**W**GTTCTACTTCCCCTCTTTGATGCTACAAAAGTG  
GGCACAGTTTTTTGCTTACAAATATTTGTTTCAGGCATTCAGTATTATCTGCTTGTCAAGTTGTTGACCA  
TTTTAGTTTCAATTTATGTTTGTGTTGTTGTTAATGCTTTTTTATTTACAAGTGAACAAAGATCGAGT  
TACAGGAGTTGAGTGGCGAAGTTTGAGTTTAAAGGGAGAAAGT**R**AGATTAATAATCGAGTTAGAGGGATTC  
GGGAGCCGAATAAAAAAGCCTTTGYTTTTCTGTTTTGGGTAAGTGAAGGAATCAAGTAGTTAGAGTTTGT  
CGGCTGTTTTTTTTCTCCATTTTTGTGGCTTATACTTCGCTTTCAAACAGGATGATGAACTGAATGAA  
ATGAGTTTTTGTGTGAATTAAGGTTTGAGAAAAGTGTAAAGACGACAAGGCATATCTGGCTAGAGTTT**R**  
TTTGGTTGGTGGGCTGAGGTTGGTGYTTTCAAGTTGAAACAAAC**ATG**TCTGTGGCATTAGTTTGGTTTGT  
TTCCCCAACACCGAGGTGTTCAAATCTATGGGATTTAGATTTCATCGAGGTTTGTTTTGGGGAATCAA  
AGTTCGATTAGAGCAAAGATGGGTGGGAAACAGGATTTGAAATCTTGCTCTCTCTGCACAGATGTGAAGT  
ATTCATCAGTAGGAGGTTCTGGTTAGGGAGTGAAGCCAAATTTCCAGTTTCATTAAGCATGGTGGCCAA  
CCCCTTGGAGAATCAGCTGTCTCGTCGGAACAGAAGGTGTATGACGTGGTGTGAAGCAGGCATCCCTG

GTTAAGAAGCAGTTGAGGTCTAATGGATATCTTGATGTGAAGCCGGATATTCTTCTCCCGGGAATCTGA  
GCTTGTGTTGAGTAAAGCTTATGATCGATGTGGAGAAGTATGTGCAGAGTATGCCAAGACTTTTTTACCTCGG  
TTGGTCCCTCTCTTGCATAAATTTTTATTTTGGCTGTTTAAAGGCATATTGGTTGAACTTTGCAGCTAAAGT  
AGTGGTCTAACTGCAATTACTAATCTTTTGGAGTCACTAATCTTATTCTTTTTCACTTTTCAGGTA  
CTGCTTATGACGCCCGAAAGAAGAAGGGCCATCTGGGCAATATATGGTGAAGTACTATAACTGTTATTCT  
GATACTTTGGACTGAATCCTAAATGAAGCGTTTATTCTTTTGGTAGCAAAAGTACATTCCATATATTTG  
GTAGGTTACCTTTAGCAGAGAGCGAACTGTGAGATCATAAAAGTAATACTTGTCCACTGAATCTGTGTT  
TACGAAGAATGATTTGATTTGCTTCAACTTGTCCGAATTCAAATTCAAATTAAGGACAAGAGGTCTTGAA  
AATTCATCATCTTCTAAATATTGAAGACCAGCCTTCACATGTCTATCTGAATGAACCAAAGTGAGAACA  
TGTATTTGTTCTCTTTCTCTTA**W**ATGATTAATTTTCTTGCAGTGTGTGAACCTCTGCATCGCTACAAA  
AATTTCTTCTCAAACCTCGAAAACACCATGCACTACCATCAATGTGAAGCGAAGTTAATGTACATCCTTT  
CTGTGAAGAGAGAGGGACAGAAAAGAGATTGAGAGGAGAAATAGGAGGAGTAGAAATTTGACTGCAGCGT  
ATATTATACTGATTTATTTGCTTGGAGTAGCATATGACAGAGGTGGTCAGGAGATTAGTCCTTTCTGTTCTT  
CTCAGATAATACATTTCTGTGAAACATATATTTCCATGGATGCTTACTCTTCACTTCAGCACAAGTGA  
CAAAACATATTTGCTTATGATCTCTTGCACATATAGTGTGGTGCAGGAGGACGGATGAGCTTGTGATGG  
GCCTAATGCTTCACACATAACACCCACAGCTTTAGATAGGTGGGAATTGAGATTGGACGATCTGTTCCAA  
GGTCTCCATTTGATATGCTTGGATGCTTGTGAGATACGGTCCACAAATTTCCGGTTGACATTCAGG  
TTAGAATTACTGCTCAAAGATTTTATAA**R**GTCAAAGGCCTAAGTTTTTCTTTCATCTTTAAAGACTT  
AGTTTTTGCATGTGTGATACTAATTTTGTCTTTTTATCTTTCTTTTGAACCTGTATCTTGAAATGTG  
AAAAGGAACCTTAGAAACATTTGAGTTGAATACGTATCCATTTTCATCCACCGAAAAGTTCCCTTTCCAAT  
TTGATTGATAGTTAAATCAAAACAACGGGAAAGCTTGTGAATTTAATTAAGGCTTTGCTTTTGGAGTAA  
CTTCTGAGTTCTGACTCCACCTTGTGCTTTTTCTGTAGCC**R**TTCAAAGATATGATAGAAGGAATGAGAAT  
GGACCTCAGGAAGTCAAGATACCAAACTTCGATGAACTATATCTTTACTGCTATTATGTTGCCGGAAC  
GTTGGATTAATGAGTGTTCAGTTATGGGCATTTCACTGAAATCGCAAGCAACAACGGAGAGTGTATATA  
ATGCTGCCTTGGCATTAGGGATTGCGAATCAGCTAACAAACATACTCCGTGATGTTGGGGAGGAGTAAGT  
ATACAACATTAACGATTTATAACTGAACATTTTAGTCATGTTAGCAACATTTGTTGAAACAAAAGTGCCCA  
AAGCTATAGAGTA**W**GCTGGTATAATCAATTGAAGATAGCTCTGACAAAAGTCTGATATTTTAGCTGCTTGC  
TTTTCGAAAGTCAATAAGACTGCAAGACACAATTTCTAATTTAGTTGAATTAGAGCGAGAGAAGAGAC  
AGAGATGCAATTGGAATCTTATAACAGACTTCATTCTCTCACTCTCTCTTGTATCTTACTCTCGATATT  
AGTACTAGGAGCAATCACTTTTATGAATGTTGTAGTTTGTATCCCACTGACAAACATTTCTTTGAGCAGT  
GCAAGGAGAGGAAGAATTTATTTACCCCAAGATGAGCTTGAAGAAGCAGGGCTCTCCGACGCTGATATAT  
ATGCTGAAAAGTTCACAGACAAATGGAGGAGTTTTCATGAAGGATCAAATTAAGAGGGCAAGGATGTTCTT  
CGACGAGGCAGAGAAGGGAGTGACAGAGTTGAGTGAAGCCAGCAGATGGCCGGTAAGCCTCGCAAGTTTA  
GTAAATATGAAACAAAACACTGACAAAGATATGAGATCCTACTTGGTTCTAGTTAA**W**CTTTTACGAAAAAT  
TATTTGTTCTATCCGATCAACCGTCCAAATTTTTCTAAAACATCTGATCAAACATTAACCGTTGCAGG  
TATTTGGCGTCSCTACTCTGTATCGCCAAATATTGGACGAGATAGAAGCTAACGATTACAACAACTTCAC  
AAGAAGGGCTTATGTAAGCAAAGCTAAGAACTACTTGCCTTGCCTATTGCGGTATACTAAATCGATAATT  
CGCCCCCAAGAACCTCTCCAGAGCTTAGAAAATACAATCTT**TG**ACAACAAAATGCTGGAGTTGCCTATA  
TATGCATAGAGATTGAAAAGCAKAATTTGTATATTATAAATTTCTATTGTTGCAGCCTGTATTTATAAAC  
TGAAAGGTTATATTTTATTTCCAGTTCAAAGCTATGCACCCATTGTTGTTGGTGTAA