

UCH-FC
Biotecnología
M843
C.1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

“Evaluación de la funcionalidad del gen licopeno β -ciclase de *Daucus carota* (zanahoria) mediante complementación heteróloga”

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

JUAN CAMILO MORENO BELTRÁN

Director de Seminario de Título: Dr. Claudia Stange Klein

Mayo, 2010
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.:

Juan Camilo Moreno Beltrán

“Evaluación de la funcionalidad del gen licopeno β -ciclasa de *Daucus carota* (zanahoria) mediante complementación heteróloga”

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

Dra. Claudia Stange K.
Directora Seminario de Título

Dr. Michael Handford
Co-Director

Comisión de Evaluación

Dr. Francisco Chávez
Presidente de la Comisión

Dra. Marcelo Baeza
Corrector



Santiago de Chile, 24 Mayo del 2010.



Nací un día martes 29 de Julio a la 1:30 pm, en la clínica del Bosque, en Santa Fé de Bogotá, Colombia. Yo fui el primero de muchos nietos que vendrían después a bendecir a las Familias Moreno Ortiz y Beltrán Camacho. Al ser yo el primero, en ambas familias, desde el minuto en que nací recibí toda la atención, el cariño y el amor de parte de todos ellos. Y eso marco mis primeros dos años de vida en la ciudad de Bogotá, rodeado de muchas personas que me amaban. Desde pequeño me gusto comer, siempre aprovechaba cualquier oportunidad para escabullirme a la cocina y entretener mi estomago con todo tipo de frutas tropicales, en especial el mango, y distintas clases de pan, lo que me llevo a alcanzar un peso de 20 kg desde los dos años de edad, el cual pude mantener hasta los cinco años de edad con ayuda de mi triciclo, con el cual pasaba el día entero recorriendo las calles del condominio. Pero eso estaría por cambiar, ya que estaba a punto de descubrir una de las pasiones que ha traído tanta alegría a mi vida, el FUTBOL. A los 5 años de edad, y todavía con 20 kg en el cuerpo, nació mi hermana María Beatriz, en la ciudad de Bucaramanga, y

hubo gran felicidad en la familia, aunque dicen que yo estuve un poquito celoso. Esta etapa estuvo marcada por todo el cariño y amor que mi bisabuela Tite nos dio a mí y a mis hermanos desde el momento que empezó a vivir con nosotros años antes.

En esos tiempos empecé a familiarizarme aún más con la pelota, aunque también me gustaba mucho jugar con autitos, me encantaban las tortugas ninja, los dinoplátibolos, y en especial los dinosaurios, por los que sentía una gran fascinación y curiosidad, tal vez desde esos momentos la CIENCIA me estaba haciendo un llamado. Una tarde de colegio cualquiera, mientras cursaba primer año de básica, fui elegido para jugar un partido contra el otro curso de primero. Yo estaba muy nervioso, me pusieron a jugar de defensa y no fue uno de mis mejores partidos, perdimos, y un gol fue por mi culpa. Lo que yo no sabía era que años más tarde volvería a tener mi revancha en esa misma cancha. En el transcurso de segundo básico mi papá decidió realizar un Postgrado en la ciudad de Bogotá, por lo cual debí decir adiós a mis amigos y mi colegio.

La llegada a Bogotá fue más sencilla de lo que imaginé, pues llegamos a la casa de mis abuelos maternos, que era una casa inmensa con muchos lugares interesantes que visitar, como "el cuartico", un cuarto secreto, que estaba cruzando una puerta del closet de mis abuelos, y que tenía una caja fuerte lo cual siempre ayudaba a dejar volar la imaginación y jugar toda clase de juegos policíacos.

Esos dos años en Bogotá marcaron mucho mi vida. En primer lugar me permitió estar rodeado de muchas personas que me querían mucho, mis abuelos y algunos tíos, además nació mi hermano menor Oscar Felipe. En segunda instancia, durante tercero y cuarto básico fui el mejor de la clase, las niñas se empezaron a fijar en mí, tuve mis primeras admiradoras, fui presidente del curso por dos años, y forme mi primer equipo de futbol, en realidad de "banquitas", se llamaba así porque los arcos eran muy pequeños, semejaban a las bancas de los parques, y sólo eran 5 jugadores. Esa fue mi primera alegría en el futbol, ya que me habían dejado en el equipo de los "malos" pero disputamos la final contra el equipo de los "buenos" y ganamos con un gol mío de penal en el último minuto. En ese momento me sentí como Oliver Atom, de la serie de los "Supercampeones", la cual me acompaño durante mis años de infancia. Además de eso, durante esos dos años, viaje dos veces a visitar a mis abuelos paternos al pueblito donde vivían. Este pueblo se llama Málaga, y ahí pasé dos de las mejores vacaciones de mi vida, explorando los potreros, cascadas, quebradas, teniendo todo tipo de aventuras y por supuesto jugando futbol, todo esto con mis primos Jota y Kuino, con los cuales pase momentos increíbles, y cuidados y mimados por mis abuelos Mario y Ana Rosa que siempre nos tenían cosas ricas para comer.

Al regresar a Bucaramanga con 10 años, y cursando quinto básico, participé en mi primer campeonato de microfútbol inter-escolar donde salimos campeones y además salí goleador del campeonato. Esto me ayudo a pasar la pena de la derrota de la final del campeonato de

microfútbol en el colegio, bueno eso y que además recibí el premio de goleador de ese campeonato también. Esta etapa de mi vida fue muy buena y estuvo marcada por mucho deporte, mi primer amor, admiradoras y los típicos problemas de adolescente. Esos años pasaron muy rápido y de repente estábamos viajando a Chile para reunirnos con mi papa después de 3 largos meses separados, ya que mi papá estaba consiguiendo departamento y trabajo, para poder tener todo listo aquí en Santiago.

Mi mama, hermanos y yo, llegamos el 11 de junio del 2001, uno de los inviernos más fríos registrados en Santiago. Empecé muy rápido el colegio, entre a tercero medio pero por tener tan solo 15 años, me bajaron a 2 medio 2 semanas después. En segundo al igual que en tercero, no tuve problema para adaptarme, obviamente con ayuda del futbol, una vez más, y con las buenas notas obtenidas, además de la obtención del premio de mejor compañero tres veces seguidas. Esos tres años de colegio fueron muy buenos ya que me dejaron 3 grandes amigos, Santiago, Pato y Nacho, con los que pasamos muchos momentos increíbles.

Al momento de decidirme por una carrera, solo pude guiarme por lo que más que había gustado a través de mis estudios primarios y de enseñanza media, la biología, aunque lo que más me apasionaba era la genética. Finalmente me decidí por Biología en la Universidad de Chile, donde estuve mis tres primeros años hasta que decidí cambiarme a Biotecnología donde pude explotar todas mis capacidades.

Esos 6 años de universidad fueron de los mejores de mi vida, los cuales estuvieron marcados por distintas glorias deportivas, como ser campeón interfacultades con la selección de futbol de la Facultad de Ciencias y quedar nueve veces seguidas goleador del torneo de futbolito de la Facultad de Ciencias, título que ocupe desde mi entrada hasta mi salida de la Facultad. Esos años también trajeron a mi primera polola en Chile, pero también mi primera decepción amorosa. Pero eso paso rápido ya que estaba rodeado de gente realmente valiosa con la cual pude compartir muchas cosas y momentos inolvidables, además de aprender muchas cosas de ellos. Especialmente a mi actual polola, mejor amiga y compañera de carrera, a la cual amo muchísimo y estoy muy feliz de que Dios la haya puesto en mi camino.

Estos años también trajeron a mí el mejor lugar de trabajo de la Facultad de Ciencias, el laboratorio de Biología Molecular Vegetal, en el cual supe que quería trabajar desde el 3 año cuando realicé mi tesilla del curso de Biología Molecular. Aquí he aprendido mucho, no solo en el ámbito científico sino también como persona, y he podido descubrir lo apasionante que es la CIENCIA.

Actualmente, estoy cursando mi Magister en Ciencias Biológicas, y no me queda nada más que agradecer a Dios y a mi familia, y en especial a mi papá y mi mamá (Oscar y Beatriz), a Dios por bendecirme con una familia como la mia, y a mi familia, por amarme incondicionalmente y formarme como la persona que soy hoy. Muchas gracias a todas las personas que pasaron por mi vida estos últimos seis años y que me marcaron de algún modo. Gracias por permitirme aprender de cada uno de ustedes.





Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mi tutora la Dra. Claudia Stange por depositar su confianza en mí y permitir que realizara este seminario de título bajo su dirección, y además por recibirme en su grupo de trabajo en momentos difíciles. Muchas gracias también por todas las experiencias y convivencias disfrutadas al máximo junto al resto del grupo en estos últimos dos años. También me gustaría agradecer a mi cotutor el Dr. Michael Handford por su excelente disposición para responder siempre a cualquier tipo de duda u ofrecer su ayuda para resolver algún problema.

Quiero agradecer a la profe Lore y a la profe Liliana por siempre estar dispuestas a preguntar y criticar de forma constructiva en los seminarios y ensayos de tesis presentados por mí.

Por otra parte, quisiera agradecer a mis compañeros de TEAM CSK, Lore P., Pauli F., Charles F., Guille W., Nally O., Romi C., Carola R. y Ariel Cerda. A Lore gracias por su visión "más allá" de los problemas que le planteaba. A la Pauli, "Gracias TOTALES" ya tendrá su propio párrafo más abajo. A Charles, gracias por su buena onda "dentro y fuera de la cancha", un honor jugar a su lado. A Guille, gracias por todos los consejos y sugerencias, fueron de gran ayuda a lo largo de mi estadía en el laboratorio. A la Nally, gracias por "su risa" hacia más llevaderos los experimentos. A la Romi, gracias por su "perseverancia" y ánimo cuando las cosas no resultaban como esperábamos. A Carola R., mi "partner de extracción" y "aprendiz", you know. Y por último a Ariel por ser un buen "discípulo" y trabajar ordenadamente.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, en especial a Dieguin, Francilla, Claudilla, Mati, Andrecillo, Pato "super" star, Yu, Pato Mandujano, Pato P., Carlitos, Carlos S., Sofi Z. por estar siempre ahí de alguna manera contribuyendo a hacer más llevadero el trabajo en el laboratorio.

Muchísimas gracias al Seba U. y a Ange que a lo largo de los años se han encargado de mantener el orden y la "calma" en el laboratorio. Seba gracias por tener música desde las 8 am en el LAB, eso sirvió harto para empezar el día con la mejor de las energías. Gracias también por "anotar las llegadas", estoy seguro que en más de una vez yo y las demás personas del laboratorio nos hemos reído muchísimo de eso.

Quisiera agradecer también a todo el equipo de "PLANTAS", Charles, Pato P., Diegol, Alex, Seba U. y Nico M. con los cuales pasamos los mejores momentos dentro y fuera de la cancha.

También quisiera agradecer al laboratorio de Genética, que en gran parte de mi seminario de título fue (y seguirá siendo) como mi segundo "LAB". Gracias a la Doni, al Salva, y en especial a "Maurus" por su buena disposición en todo momento, y por el conocimiento que adquirí de él en el ámbito de los pigmentos y el trabajo con estos.

Gracias a todos los integrantes de la selección de Fútbol de la facultad de CIENCIAS, y en especial a Isma, Herny, Marito, Piter con los cuales se ha podido ir desarrollando una bonita amistad. Gracias al Lucho, nuestro entrenador, pero más que entrenador, un verdadero amigo que siempre se la ha jugado por nosotros. Gracias por el campeonato histórico de la Facultad de Ciencias, cosa que no se había logrado en 44 años de historia de la Facultad. Gracias a Kury, por haber creado "PROVINCIANOS", equipo que me llevo a pasar muchos años de felicidad en la Facultad, y específicamente en "Calama". Gracias a todos los futboleros y compañeros de pichangas, tigrillo, Alex, Charlie, el mago Zapata,

Mago Pérez, el hombre del primer medio tiempo, y muchos otros más que siempre aportaron de alguna u otra forma a la diversión en la cancha.

También quiero agradecer y mencionar a mis amigos "Biólogos" con los cuales empecé a afianzarme en el mundo de la CIENCIA, Caren, Nancy, Beña, Darky, Norbert y Claudio, con los cuales pasamos muy buenos momentos y compartimos muy lindos recuerdos.

Estoy muy agradecido también de mis compañeros de carrera, con los que disfrutamos del karaoke en la casa de moroco, de carretes en la casa de la Sofi, asados, etc. Además de compartir el nerviosismo antes de cada prueba y la felicidad de una buena nota. Muchas gracias especialmente a la Vale V., la Natty, Chichi, Moroco, Brain, y Nacho por todos los buenos recuerdos.

Quisiera hacer una mención especial a mis dos partners y amigos en los últimos años de carrera: Ine y Diego. Ine muchas gracias por estar siempre alegre, riendo y "siempre atenta", ya tu sae, gracias por reírte de todos mis chistes y por apañarme en todos los chistes de doble sentido. Diego gracias por los buenos momentos y experiencias compartidas, gracias por ser tan gracioso y por las innumerables veces que nos hiciste reír. Gracias a los dos por las innumerables juntas a "estudiar", analítica, biofísicoquímica de macromoléculas, instru, etc, y gracias por estar ahí siempre. Gracias a "Naxin machin" por sus chistes locos y ñoños, y por las juntas a estudiar. Gracias también a "Diego bubuja" otro partner que surgió a mediados de la carrera con el cual también hubo muchas juntas a estudiar, informes, trabajos, deporte, etc.

Gracias a mis tres amigos y compañeros de colegio, Shago, Naxo y Pato, con los cuales compartí miles de experiencias, viajes y anécdotas graciosas.

Acercándonos al final, quisiera que en las siguientes líneas mi mejor amiga y actual polola pudiera darse cuenta de al menos una pequeña parte de la gratitud que tengo hacia ella, no sólo por ser la mejor polola del mundo, por ser tierna, cariñosa, comprensiva, sino porque además de ser como es y tener miles de cualidades y virtudes maravillosas, me ayudó siempre que lo necesité a través del desarrollo de este seminario de título no sólo dándome animo y apoyándome sino también aportándome ideas y críticas sobre mi trabajo. Gracias por ser tan linda.

Por último quiero agradecer a mi familia, abuelos, tíos, primos que a pesar de que no se encuentran en Chile yo se que van a estar muy orgullosos de mí. Y por supuesto gracias a mis papas y hermanos que siempre han estado ahí para mí, apoyándome y dándome animo en los momentos no tan buenos. Gracias por la confianza que me han depositado y por creer en mí, gracias por estos nueve años en otro país del cual ya somos parte. Pero sobre todo muchas gracias por darme lo más importante y valioso que tengo para enfrentar al mundo, gracias por hacerme y formarme así como soy, con lo mejor de ustedes dos, todo lo que yo soy y he logrado hasta ahora se lo debo a ustedes dos, y por eso no me queda nada más que decir. Gracias y los quiero mucho.



-Dedicado a mi familia-

"Daria todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro"



ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Biosíntesis, estructura y función de los carotenoides.....	4
1.2 Importancia del gen <i>Icyb</i> en la ruta de biosíntesis de los carotenoides.....	10
1.3 <i>Escherichia coli</i> como Sistema de Expresión Heteróloga.....	16
1.4 Hipótesis.....	19
1.5 Objetivos.....	19
1.5.1 Objetivo General.....	19
1.5.2 Objetivos Específicos.....	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
2.1 Reactivos.....	20
2.2 Cepas, plásmidos y medios de cultivo.....	20
2.2.1 Medios de Cultivo.....	22
2.3 Partidores.....	22
2.4 Métodos de Biología Molecular.....	23
2.4.1 Extracción del ARN de las plantas.....	23
2.4.2 <i>Transcripción reversa y Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)</i>	24
2.5 Extracción del ADN plasmidial.....	25
2.6 Digestiones enzimáticas para la selección de clones positivos y construcción de los vectores pCR8// <i>icyb1</i> y pET-Blue1// <i>icyb1</i>	26
2.7 Purificación del ADN desde los geles de agarosa o desde los productos de amplificación por PCR.....	26

2.8	Generación de la construcción pB1// <i>lcyb1</i>	26
2.8.1	Clonación del fragmento del gen <i>lcyb1</i> en el vector de entrada pCR8.....	26
2.8.2	Clonación del gen <i>lcyb1</i> en el vector de expresión pB1.....	27
2.9	Secuenciación.....	27
2.10	Electrocompetencia y transformación de células de <i>Escherichia coli</i>	28
2.10.1	Electrocompetencia de cepas bacterianas.....	28
2.10.2	Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α y BL-21 electrocompetentes.....	28
2.11	Experimentos de complementación.....	29
2.12	Extracción y cuantificación de los carotenoides.....	30
2.12.1.	Determinación del peso seco.....	30
2.12.2	Extracción de los carotenoides desde los cultivos bacterianos.....	31
2.12.3	Identificación y cuantificación de los carotenoides mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) en fase reversa.....	32
2.13	Análisis bioinformáticos de secuencias.....	33
2.14	Análisis estadísticos.....	33
3.	RESULTADOS	34
3.1	Clonación del gen <i>lcyb1</i> en el vector de entrada.....	37
3.1.1	Amplificación del gen <i>lcyb1</i> por PCR.....	34
3.1.2	Análisis de la construcción pCR8// <i>lcyb1</i>	35
3.2	Obtención del vector de expresión pDcl// <i>lcyb1</i>	36
3.2.1	Amplificación por PCR del gen <i>lcyb1</i> flanqueado por el iniciador y terminador de la traducción.....	36
3.2.2	PCR anidado y purificación de la banda del gen <i>lcyb1</i> desde el gel de agarosa.....	37
3.3	Obtención del vector de expresión pB1.....	38
3.3.1	Extracción del ADN plasmidial del vector pB1.....	38

3.3.2	Digestión y Purificación del vector pB1.....	38
3.4	Generación de la construcción pDc1//cyb1.....	39
3.4.1	Ligación y transformación de células <i>E. coli</i> DH5 α con el vector pDc//cyb1.....	39
3.4.2	Extracción del ADN plasmidial y PCR del clon pDc//cyb1.....	39
3.4.3	Digestión del vector pDc//cyb1.....	39
3.5	Complementación del gen de la licopeno β -ciclase.....	41
3.5.1	Transformación de células DS1B* electrocompetentes con el vector pDc//cyb1.....	41
3.6	Extracción y Cuantificación de carotenoides.....	43
3.6.1	Determinación de peso seco.....	43
3.6.2	Extracción de los carotenoides desde cultivos bacterianos.....	43
3.6.3	Identificación y cuantificación de los carotenoides mediante Cromatografía Líquida de alto rendimiento (HPLC) en fase reversa.....	45
4.	Análisis bioinformático de secuencias.....	52
5.	Discusión	53
5.1	Obtención del vector de entrada pCR \otimes 8//cyb1.....	53
5.2	Obtención del vector de expresión pET-Blue1//cyb1.....	53
5.3	Ensayos de complementación.....	54
5.4	Extracción y cuantificación de los carotenoides mediante HPLC.....	54
5.5	Comparación de la LCYB1 y LCYB2: Evolución y actividad.....	59
6.	Conclusiones	61
7.	Proyecciones	62
8.	Referencias	63



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I	Cepas usadas en este seminario de título.....	20
TABLA II	Plásmidos usados y contruidos en este seminario de título.....	21
TABLA III	Partidores usados en este seminario de título.....	23
TABLA IV	Programa estándar de amplificación por PCR utilizado en este seminario de título.....	25
TABLA V	Absorbancia a 450 nm de los carotenoides extraídos desde el clon 5 DS1B* <i>pDc/lcyb1</i> y desde el clon 9 DS1B* <i>pDc/lcyb2</i>	43
TABLA VI	Partes por millón de los carotenoides totales extraídos del clon 5 DS1B* <i>pDc/lcyb1</i> y del clon 9 DS1B* <i>pDc/lcyb2</i>	44
TABLA VII	Composición porcentual y en ppm de los carotenoides presentes en las muestras (clon 5 y 9) incubadas por 48 horas.....	49



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de los complejos enzimáticos formados por las enzimas carotenogénicas.....	6
Figura 2	Ruta de biosíntesis de los carotenoides en plantas.....	8
Figura 3	Ramificación de la ruta de biosíntesis de los carotenoides.....	12
Figura 4	Diagrama simplificado de la ruta de biosíntesis de carotenoides en <i>Erwinia uredovora</i>	18
Figura 5	Esquema de los vectores usados en este seminario de título.....	22
Figura 6	Amplificación del gen <i>lcyb1</i>	34
Figura 7	Digestión de la construcción pCR8/ <i>lcyb1</i> con <i>EcoRI</i>	36
Figura 8	Amplificación del gen <i>lcyb1</i>	36
Figura 9	Purificación del gen <i>lcyb1</i> para experimentos de complementación...	37
Figura 10	Digestión y purificación del vector de entrada pB1.....	38
Figura 11	Digestión del ADN plasmidial del clon pDcl/ <i>lcyb1</i>	40
Figura 12	Complementación de la cepa DS1B* con el vector pDcl/ <i>lcyb1</i>	42
Figura 13	Cromatogramas de los carotenoides presentes en la cepa DS1B* pB1 y pDcl/ <i>lcyb1</i>	46
Figura 14	Cromatogramas de los carotenoides presentes en la cepa DS1B* pB1 y pDcl/ <i>lcyb2</i>	48
Figura 15	Niveles de carotenoides producidos por las enzimas LCYB1 y LCYB2.....	51
Figura 16	Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de LCYB1 y LCYB2 de <i>D. carota</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	: Ampicilina
BLAST	: <u>Alineamiento de secuencias</u> de tipo local (Basic Local Alignment Search Tool)
BrEt	: Bromuro de etidio
Cm	: Cloranfenicol
ccs	: Capsantina capsorrubina sintasa
DEPC	: Dietilpirocarbonato
DNAsa	: Desoxi-ribonucleasa
dNTP	: Desoxinucleótido trifosfato
DO	: Densidad óptica
HPLC	: Cromatografía Líquida de alta resolución
IPTG	: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Spn	: Espectinomicina
Kb	: Kilobase
ppm	: Partes por millón
rpm	: Revoluciones por minuto
RNAsa	: Ribonucleasa
RT	: Transcripción Reversa
X-Gal	: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

Los carotenoides son compuestos isoprenoides sintetizados en las plantas, las algas, algunas levaduras y las bacterias, siendo esenciales tanto para los animales como las plantas. En los animales, actúan como antioxidantes y precursores de la vitamina A al ser incorporados en la dieta. En las plantas son sintetizados en los plastidios de las células vegetales y participan en la fotosíntesis, fotoprotección y como precursores de la hormona ácido abscísico. En su síntesis participan diferentes enzimas, dentro de las cuales es crucial la licopeno β -ciclase (LCYB), debido a que transforma el licopeno en β -caroteno, un carotenoide con alto poder antioxidante y precursor de la vitamina A. En nuestro sistema de estudio, *Daucus carota* L. (zanahoria) se han descrito dos genes *lcyb* (*lcyb1* y *lcyb2*) que codificarían para LCYB. Los estudios realizados en nuestro laboratorio indican que *lcyb1* y *lcyb2* se expresan en toda la planta durante el desarrollo. Por otro lado, *lcyb1* presenta el mayor aumento en los niveles de expresión a lo largo del desarrollo de la planta respecto a los otros genes carotenogénicos. Además, al silenciar el gen *lcyb1* se observó una disminución en los niveles totales de los carotenoides en las hojas y la raíz de las plantas. Esto indica que *lcyb1* es necesario para la síntesis de los carotenoides, pero no implica que este gen codifique para LCYB. Por ello, en este seminario de título se utilizó un sistema de complementación heteróloga para definir la función molecular del gen *lcyb1*. En los últimos años se han utilizado sistemas de expresión heteróloga para expresar distintas enzimas carotenogénicas con el fin de evaluar su actividad y funcionalidad, siendo *Escherichia coli* uno de los sistemas de expresión heteróloga más utilizados debido a su alta tasa de crecimiento y fácil transformación, entre otras características. Es por esto que en este seminario de título se generó la construcción pET-Blue1/*lcyb1* la cual se usó en paralelo a la construcción pET-Blue1/*lcyb2*, previamente generada, para transformar y complementar la cepa mutante de *E. coli* BL-21 $\Delta crtY$, la que posee los genes necesarios para la síntesis del β -caroteno, excepto el gen *lcyb* (*crtY*). Luego se comprobó dicha complementación mediante la determinación por HPLC de la producción del β -caroteno, corroborando que los genes *lcyb1* y *lcyb2* de zanahoria codifican para una enzima licopeno β -ciclase (LCYB) funcional.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biosíntesis, estructura y función de los carotenoides

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides naturales y liposolubles (Tanaka y col., 2008). Su estructura química consta de ocho unidades isoprenicas unidas en sus extremos para formar un esqueleto carbonado con una base de cuarenta carbonos. Poseen un sistema de dobles enlaces conjugados, que van desde tres a quince y que actúan como cromóforos, otorgándoles color y distintas propiedades. El rango espectral de absorción de los carotenoides varía entre 400 y 500 nm (Armstrong & Hearst, 1996; Giorio y col., 2007).

Actualmente, se han descrito más de 700 carotenoides estructuralmente distintos los cuales se subdividen en dos grandes grupos: los carotenos, que contienen solo átomos de carbono e hidrogeno y las xantófilas, que poseen además sustituyentes oxigenados (Giorio y col., 2007). Estos compuestos son sintetizados de manera natural por las plantas, las algas, los hongos y algunas bacterias y las levaduras (Fujisawa y col., 2008; Jayaraj y col., 2007). En las plantas, son acumulados principalmente en los plastidios (Cunningham & Gantt, 1998) y se almacenan en las membranas tilacoidales asociadas a los centros cosechadores de la luz en los cloroplastos (Pefer & Thornber, 1991; Cunningham & Gantt, 1998). También en las membranas y los cuerpos grasos de los cromoplastos y en las estructuras cristalinas dentro del estroma (Kirk & Tilney-Bassett, 1978; Cunningham & Gantt, 1998; Howitt & Pogson, 2006; Maass, 2009). Además, los carotenoides son componentes esenciales de las membranas fotosintéticas y participan en la fotoprotección de las células contra el daño provocado por la luz, canalizando el exceso de energía (Bassi y col., 1993; Young, 1993; Kuhlbrandt y col., 1994; Bartley & Scolnik, 1995; Demmig-Adams & Adams, 2002). Por otra parte estos compuestos, y específicamente la zeaxantina, actúan como

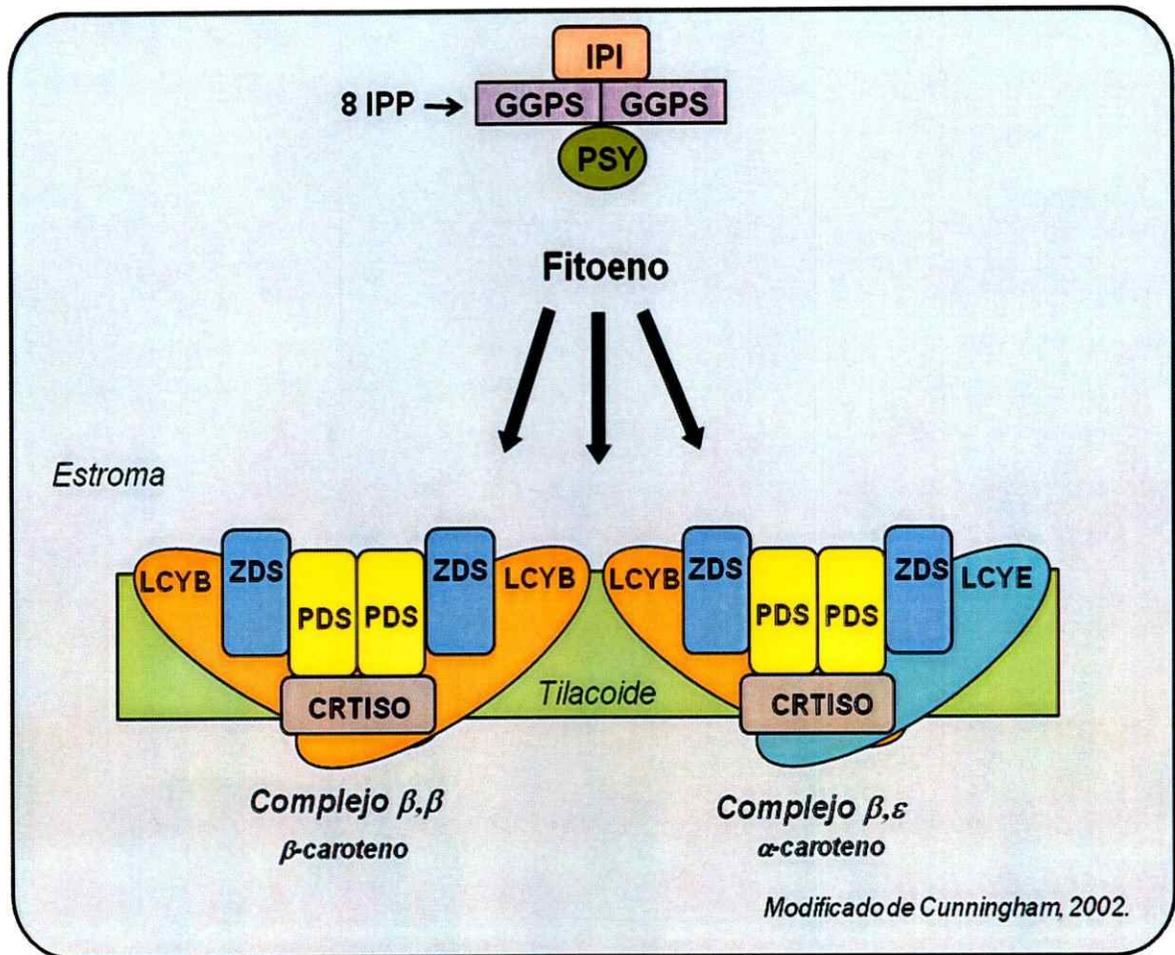
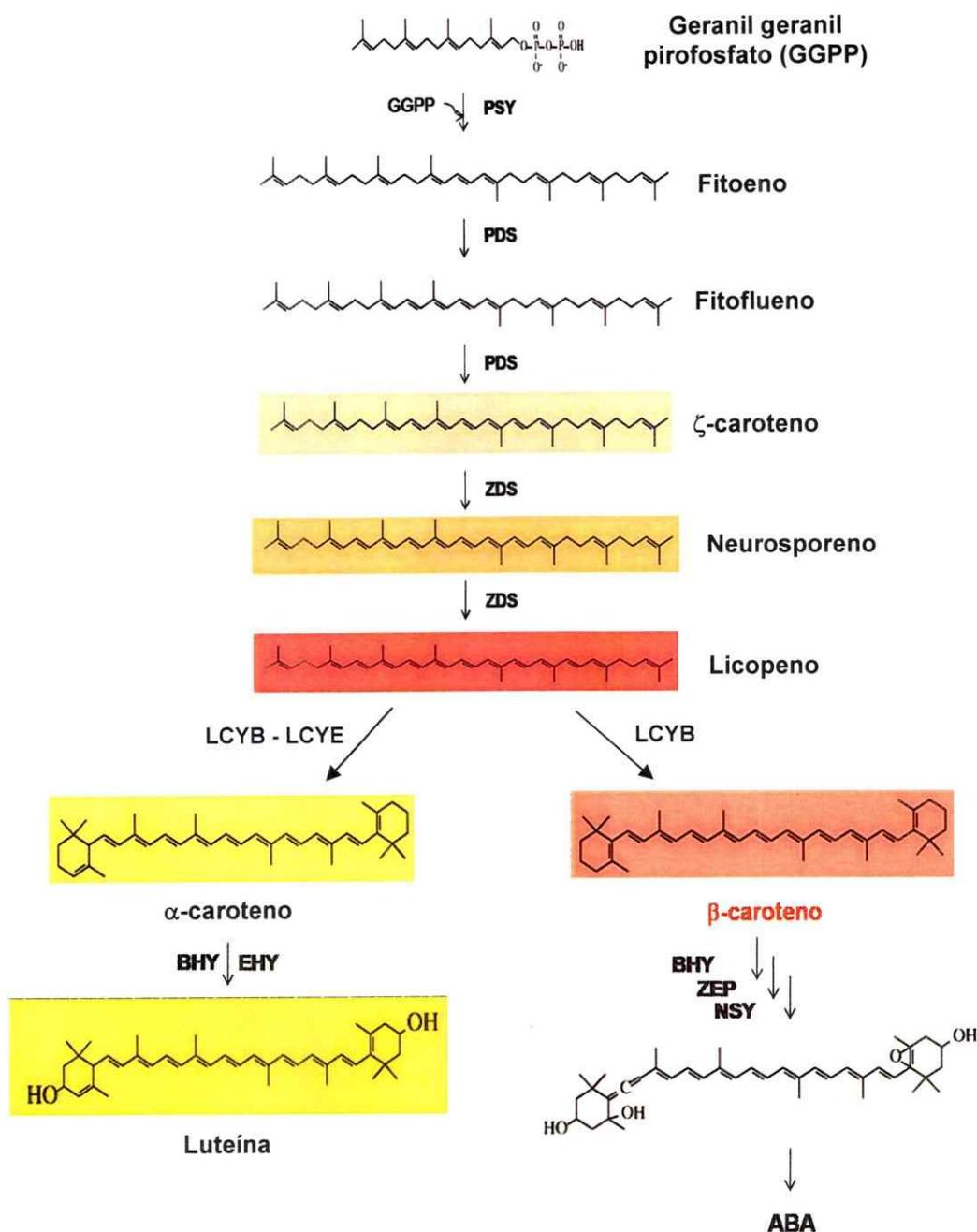


Figura 1. Esquema de los complejos enzimáticos formados por las enzimas carotenogénicas. Se observan las distintas enzimas carotenogénicas formando complejos en el estroma y en la membrana del tilacoide en los plastidios de las plantas.

La biosíntesis de los carotenoides comienza con la síntesis del isopentenil pirofosfato (IPP). Este compuesto puede ser sintetizado mediante dos vías, la primera es la ruta plastidial de la xilulosa-5P, independiente de mevalonato, y la segunda es la ruta del acetato/mevalonato, llevada a cabo en el citosol (Lichtenthaler y col., 1997). El IPP, en la vía independiente de mevalonato, es sintetizado por la condensación del gliceraldehído-3 fosfato con piruvato. A continuación este es isomerizado al compuesto dimetilalilpirofosfato (DMAPP), reacción llevada a cabo por la enzima IPP isomerasa (IPI). Luego, tres moléculas de IPP se condensan con una de DMAPP para generar

una molécula de 20 carbonos llamada geranyl geranyl pirofosfato (GGPP) mediante la enzima GGPP sintasa (GGPPS). De esta forma, en una reacción catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY) se forma a partir de dos moléculas de GGPP (C₂₀) el primer carotenoide con un esqueleto de cuarenta carbonos, denominado fitoeno el cual es incoloro (Figura 2, Tanaka y col., 2008). A partir de este compuesto se inician una serie de desaturaciones seriales que generan fitoflueno, ζ-caroteno (amarillo pálido) y neurosporeno (naranja-amarillo), hasta obtener finalmente el pigmento denominado licopeno, el cual posee un color rojo. Estas cuatro desaturaciones sucesivas son llevadas a cabo por las enzimas PDS y ZDS como se muestra en la Figura 2. Cabe destacar que estas reacciones de desaturación son responsables de otorgar la característica de cromóforo a los carotenoides.

A partir del licopeno se genera el punto de ramificación de la ruta. Si este compuesto es ciclado en sus dos extremos por LCYB, se sintetiza el β-caroteno. Por otro lado, ciclaciones mediadas por la enzima LCYB en conjunto con la enzima licopeno ε-ciclasa (LCYE) dan origen al α-caroteno (Figura 2). Luego, el α-caroteno es hidroxilado en sus dos anillos formando luteína, mientras que el β-caroteno a través de una serie de hidroxilaciones y epoxidaciones permite la formación de los compuestos denominados xantófilas (Figura 2). A partir de la xantófila denominada neoxantina se genera una molécula de 15 carbonos llamada xantoxina la cual es precursora del ácido abscísico (ABA), que tal vez sería el compuesto que migra desde el plastidio al citosol mediante un mecanismo aún desconocido (Nambara & Marion-Poll, 2005).



Modificado de Ye et al, 2008.

Figura 2. Ruta de la biosíntesis de los carotenoides en las plantas. Diagrama simplificado de las enzimas y los principales productos de la ruta, en las plantas. IPP, isopentenil pirofosfato; IPI, isopentenil isomerasa; DMAPP, dimetilalil pirofosfato; GGPPS, geranyl geranyl pirofosfato sintasa; GGPP, geranyl geranyl pirofosfato; PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; ZDS, ζ-caroteno desaturasa; LCYB, licopeno β-ciclaza; LCYE, licopeno ε-ciclaza; BHY, β-caroteno hidroxilasa; EHY, ε-caroteno hidroxilasa; ZEP, zeaxantina epoxidasa; NSY, neoxantina sintasa; ABA, ácido abscísico.

Las características estructurales de los carotenoides les otorgan distintas propiedades y es por ello que cumplen diferentes funciones tanto en los organismos vegetales como en los animales. Estos pigmentos son componentes esenciales de las membranas fotosintéticas en todas las plantas, algas y cianobacterias. Además, cumplen una extraordinaria variedad de funciones en las plantas (Britton G, 1995; Demmig-Adams y col., 1996; Frank & Cogdell 1996; Goodwin, 1980; Yamamoto & Bassi, 1996). Por ejemplo una de las principales funciones desempeñadas por los carotenoides es la protección fotooxidativa. Los carotenoides asociados a los centros de reacción y a los complejos antena reaccionan eficientemente con el triplete de clorofila (cuando la clorofila absorbe la energía de un fotón), el singlete del oxígeno y también con el anión superóxido, evitando así el daño desencadenado a partir del estado excitado del triplete de la clorofila (Britton G, 1995; Demmig-Adams y col., 1996; Frank & Cogdell 1996). Mediante el ciclo de las xantófilas los carotenoides participan también en la disipación térmica del exceso de la energía absorbida por los pigmentos asociados a los complejos antena, además de actuar como pigmentos accesorios a la clorofila durante la fotosíntesis. Por otra parte, estos pigmentos sirven como precursores en la biosíntesis de una de las principales hormonas vegetales, el ácido abscísico (ABA), la cual desempeña funciones relacionadas con la dormancia y la respuesta al estrés abiótico (Milborrow, 2001). Además de las funciones anteriormente mencionadas, estos pigmentos también participan en las funciones reproductivas de las plantas, y otorgan distintos colores (rojo, amarillo o naranja) a los órganos donde se acumulan (ya sean hojas, flores ó frutos), según el número de insaturaciones presentes en su estructura favorecen de esta forma la atracción de los polinizadores y de los agentes dispersadores de las semillas (Britton G, 1995).

En los animales, los carotenoides cumplen una función esencial: son precursores de la vitamina A, la cual participa en múltiples procesos como el de la visión, la respuesta inmune, el crecimiento y la reparación del tejido epitelial, la reproducción, el mantenimiento de las membranas de la superficie de los ojos y la integridad del epitelio respiratorio, urinario y tracto intestinal (Al-Babili & Beyer, 2005). Además, los carotenoides participarían en el tratamiento y prevención de las enfermedades degenerativas y de algunos tipos de cáncer, debido a sus propiedades antioxidantes (Lorenzo y col., 2009). Debido a que los mamíferos no sintetizan carotenoides de forma natural, éstos se deben ingerir en la dieta para poder ser metabolizados y ser usados en estas funciones fisiológicas.

1.2 Importancia del gen *lcyb* en la ruta de biosíntesis de los carotenoides

El gen licopeno β -ciclase (*lcyb*) codifica para la enzima licopeno β -ciclase (LCYB), la cual está involucrada en la ciclación del licopeno y es el punto de ramificación de la ruta ya que el licopeno puede ser ciclado con anillos β o ϵ , y de esta forma generar α -caroteno o el β -caroteno (Figura 2). El primer gen licopeno ciclase identificado y caracterizado fue el gen *crtY*, el cual fue clonado de la eubacteria *Erwinia uredovora* (Misawa y col., 1990). Posteriormente fue caracterizado el gen de la licopeno β -ciclase (*crtL*) proveniente de la cianobacteria *Synechococcus sp.* PCC7942 (Cunningham y col., 1994). Aunque la similitud de las ciclasas tipo *crtL* con las ciclasas bacterianas tipo *crtY* es baja, distintos patrones conservados en la secuencia aminoacídica se observan en los genes licopeno β -ciclase *crtY*, *crtL* y el gen licopeno β -ciclase de plantas lo cual podría indicar un mismo origen filogenético para estos tres genes (Krubasik & Sandmann, 2000). Las secuencias aminoacídicas de las licopeno

molécula lineal del licopeno, introduciendo los dos anillos β y produciendo de esta forma β -caroteno, vía γ -caroteno el cual sería el intermediario en esta reacción (Figura 3) (Alquezar, 2007). Por otra parte, la enzima LCYE puede introducir únicamente un anillo ε en uno de los extremos de la molécula del licopeno lo que da origen al δ -caroteno (Figura 3). Seguido de esto, la enzima LCYB cataliza el paso de δ -caroteno a α -caroteno, y agrega un anillo β en el extremo lineal de la molécula de δ -caroteno (Figura 3) (Hirshberg, 2001; Fraser & Bramley, 2004; Bouvier y col., 2005). Excepcionalmente, en algunas especies de lechuga se ha descrito una enzima LCYE capaz de introducir dos anillos ε en la molécula lineal del licopeno (Figura 3) lo que genera lactucaxantina (Cunningham & Gantt, 2001).

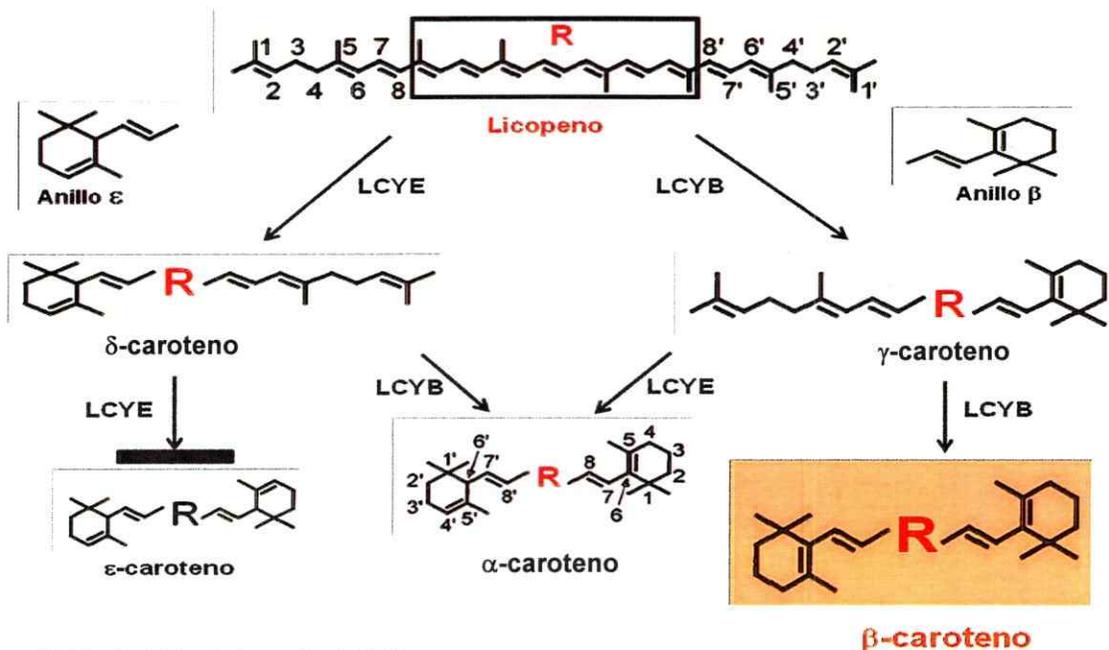


Figura 3. Ramificación de la ruta de la biosíntesis de los carotenoides. Podemos observar como a partir de la molécula del licopeno y por medio de las enzimas LCYB y LCYE se produce la ramificación de la ruta. Por una parte, al agregar un anillo ε a la molécula de licopeno se produce el δ -caroteno, el cual al ser ciclado en su otro extremo con un anillo β se convierte en α -caroteno, el cual es el precursor de la luteína. En el otro lado de la ramificación, podemos observar que dos ciclaciones sucesivas con anillos β producen el β -caroteno (precursor de las xantófilas y el ABA) en el que su intermediario monocíclico corresponde a γ -caroteno. Cabe destacar que el ε -caroteno solo se obtiene excepcionalmente en la lechuga y no es producido en ninguna otra especie de planta.

Los genes que codifican para las enzimas LCYB han sido identificados en tomate (N° acc. X86452, AF254793), zanahoria (N° acc. DQ192190, DQ192191), tabaco (N° acc. F13561), distintas especies de cítricos (N° acc. AF240787, AY196766, AY217103, AF152246) y pimiento (N° acc. X86221); entre otras plantas superiores, y presentan todos ellos al menos un 78% de identidad a nivel aminoacídico. Estas proteínas en su estado maduro poseen un sitio de unión al dinucleótido (FAD/NADH) que al parecer está implicado en su activación alostérica (Hornero Mendez & Britton, 2002) y dos motivos conservados característicos de este tipo de enzimas (Hugueney y col., 1995).

En tomate, se ha descrito la existencia de un segundo parólogo al gen *lcyb* (*cycb*) específico del tejido cromoplástico que presenta un 53% de identidad a nivel aminoacídico con la LCYB canónica (Ronnen y col., 2000). La LCYB2 de tomate, CYCB, muestra una mayor identidad nucleotídica con la enzima capsantina-capsorubina sintasa (CCS) del pimiento, una enzima bifuncional que cataliza la formación de capsantina y capsorubina (los carotenoides específicos del pimiento) y que además posee actividad LCYB (Hugueney y col., 1995).

Desde el punto de vista biotecnológico, se han llevado a cabo distintas estrategias para aumentar los niveles totales de los carotenoides y en especial del β -caroteno en distintos organismos vegetales por medio de la sobre-expresión del gen *lcyb1* o por medio del silenciamiento del gen *lcyb*. Los tomates transgénicos que sobreexpresan el gen *lcyb* de *Arabidopsis thaliana*, producen frutos de color naranja con un aumento de 7 veces en los niveles totales de los carotenoides (Rosati y col., 2000). Al sobreexpresar en el tomate el gen *lcyb* de la misma planta, también se obtienen frutos de color naranja lo que refleja una conversión casi completa del licopeno al β -caroteno (D'Ambrosio y col., 2003). Por otra parte, experimentos de

Uno de estos genes codifica para la enzima LCYB2, que es una putativa capsantina capsorubina sintasa (CCS) (Just y col., 2007), la cual como se dijo anteriormente es un miembro de la familia de las licopeno ciclasas de plantas y lleva a cabo la formación de capsantina o capsorubina a partir de anteraxantina o violaxantina por un mecanismo similar al de la ciclación del licopeno (Hugueney y col., 1995). Además, mediante estudios de secuencia nucleotídica realizados usando la información otorgada por la base de datos del Genbank, se ha encontrado que LCYB2 de zanahoria, es un miembro de una familia génica que incluye a la licopeno β ciclasa (LCYB1), teniendo una alta identidad aminoacídica con la licopeno β ciclasa de tomate específica de cromoplastos (CYCB) y con la capsantina capsorubina sintasa de pimentón (CCS), que pueden llevar a cabo la reacción de ciclación del licopeno. Es por esto que se ha propuesto que estos genes son parálogos al gen *lcyb1* (Krubasik y col., 2000; Ronen y col., 2000). Por otra parte, en zanahoria nunca se ha encontrado producción de capsantina o capsorubina, por lo que se piensa que en *D. carota*, es más probable que LCYB2 (CCS) tenga una actividad licopeno ciclasa, en lugar de catalizar la conversión de anteraxantina o violaxantina a capsantina o capsorubina (Just y col., 2007).

Además, en los estudios de la expresión de los genes carotenogénicos en la zanahoria, realizados en nuestro laboratorio, se demostró que *lcyb1* es el gen que presenta el mayor aumento en sus niveles de expresión (comparado con *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1* y *zds2*) durante el desarrollo de la planta (Fuentes, 2009). Este aumento alcanza niveles de 16,2 veces en las hojas y 12,4 veces en la raíz modificada de una planta adulta (12 semanas de cultivo). Esto se correlaciona con el aumento de los carotenoides totales durante el desarrollo de la raíz, y en especial del β -caroteno

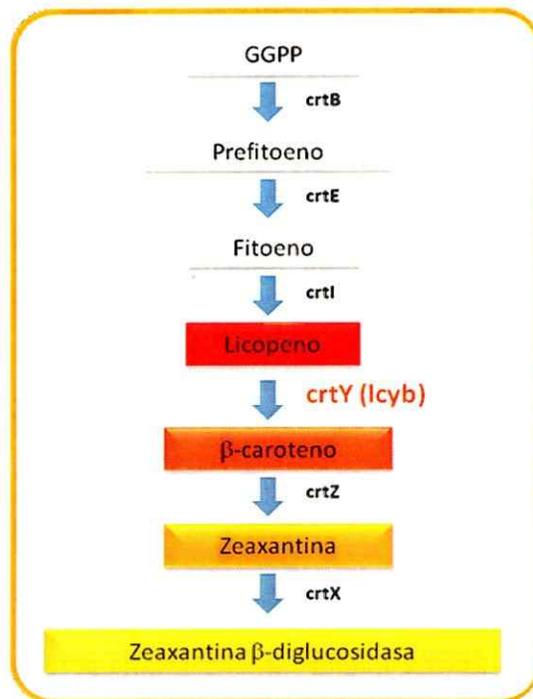


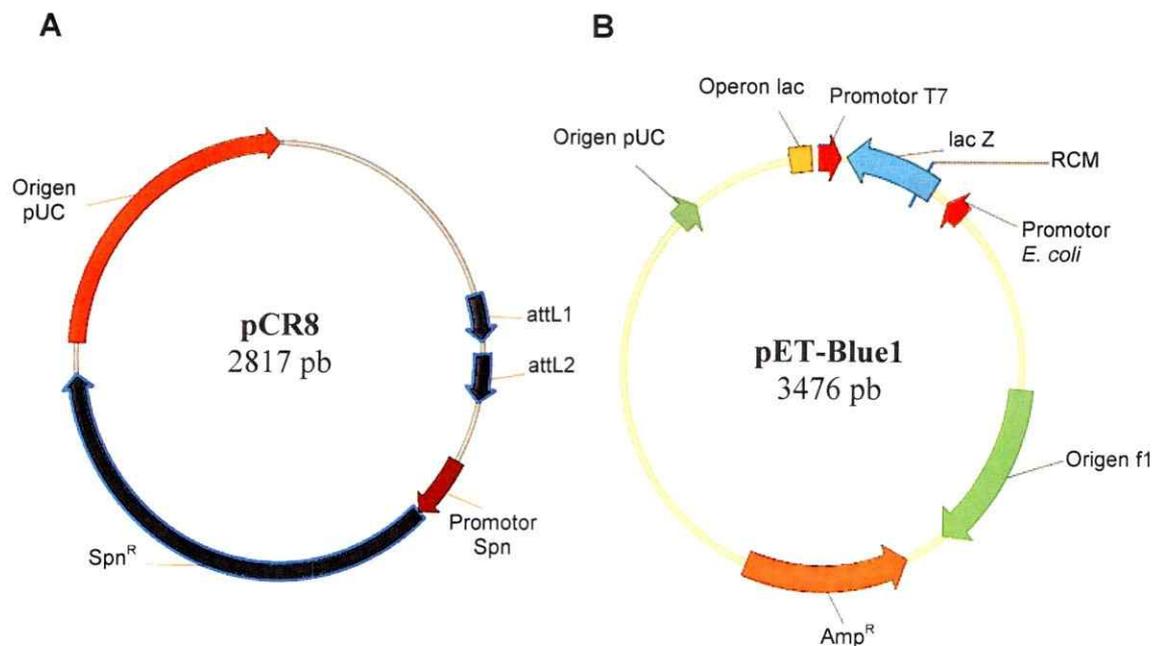
Figura 4. Diagrama simplificado de la ruta de biosíntesis de los carotenoides en *Erwinia uredovora*. Se observan las enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de los carotenoides.

Por lo expuesto anteriormente, en este seminario de título evaluamos la funcionalidad del gen *lcyb1* de *D. carota*, mediante experimentos de complementación heteróloga en la bacteria *E. coli* cepa BL-21 pDS1B $\Delta crtY$ (DS1B*). Esta cepa fue transformada con el vector pDS1B $\Delta crtY$ (pDS1B*), el cual contiene toda la ruta carotenogénica de *Erwinia uredovora* y una delección de 612 pb en el gen *crtY* (Niklitscheck, 2008). El gen *crtY* truncado fue reemplazado por el gen *lcyb1* de *D. carota* al ser complementada la bacteria *E. coli* DS1B* con el vector de expresión pDcl/*lcyb1*. El éxito de la complementación se verificó mediante las diferencias fenotípicas y por la medición del β -caroteno por medio de HPLC en fase reversa. Adicionalmente se evaluó la funcionalidad del gen *lcyb2* de zanahoria, de forma análoga.

Tabla II. Plásmidos usados y construidos en este seminario de título.

Plásmido	Nombre	Genotipo y características relevantes	Fuente de la referencia
<i>pCR8/GW</i>	<i>pCR8</i>	Origen pUC; <i>spec^R</i> ; cloning vector of 2800 pb.	Invitrogen.
<i>pCR8/lcyb1</i>	<i>pCR8/lcyb1</i>	<i>pCR8</i> de 4400 pb que contiene al gen <i>lcyb1</i> .	En este trabajo.
<i>pET-Blue1</i>	<i>pB1</i>	Promotor T7; operón <i>lacZ</i> ; selección de transformantes por color blanco/azul; <i>amp^R</i> ; sitio de unión a ribosoma.	Novagen.
<i>pET-Blue1/lcyb1</i>	<i>pDc/lcyb1</i>	<i>pET-Blue1</i> de 5100 pb que contiene al gen <i>lcyb1</i> .	En este trabajo.
<i>pET-Blue1/lcyb2</i>	<i>pDc/lcyb2</i>	<i>pET-Blue1</i> de 5300 pb que contiene al gen <i>lcyb2</i> .	En este trabajo.
<i>pDS1B</i>	<i>pDS1B</i>	Plásmido que porta los genes carotenogénicos <i>crtB</i> , <i>crtE</i> , <i>crtI</i> , <i>crtY</i> , y <i>crtX</i> de <i>E. uredovora</i> . <i>Cam^R</i> .	Niklitschek y col.
<i>pDS1B ΔcrtY</i>	<i>pDS1B*</i>	Plásmido <i>pDS1B</i> que presenta una deleción interna de 612 pb del gen <i>Eu-crtY</i> .	Niklitschek y col.

A continuación se esquematizan los principales vectores usados en este seminario de título y a partir de los cuales se diseñaron las construcciones obtenidas en el mismo.



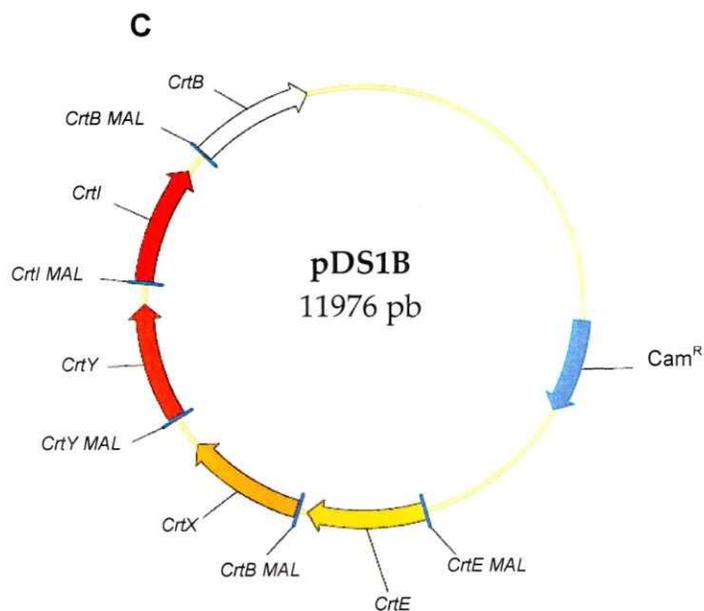


Figura 5. Esquema de los vectores usados en este seminario de título. A) Vector de clonación o entrada pCR8®, consta de 2817 pb, presenta la enzima topoisomerasa y resistencia a espectinomicina. **B)** Vector de expresión pET-Blue1 (pB1) de 3476 pb, presenta el promotor T7 el cual es inducible por IPTG. **C)** Vector de expresión pDS1B, el cual contiene todos los genes de *Erwinia uredovora* necesarios para la producción de β-caroteno.

2.2.1 Medios de cultivo

Para el crecimiento bacteriano fueron usados los siguientes medios de cultivo:

LB (Luria-Bertani): Triptona 1% (p/v), NaCl 0,8% (p/v) y extracto de levadura 0,5% (p/v).

LB-agar: Triptona 1% (p/v), NaCl 0,8% (p/v), agar 1,6% (p/v) y extracto de levadura 0,5% (p/v).

2.3 Partidores

A continuación se detallan los partidores usados para la amplificación del gen *lcyb1* y el análisis de los clones. Los partidores se mantuvieron a una concentración de 250 μM y se diluyeron a 10 μM para su uso.

Tabla III. Partidores usados en este seminario de título.

PARTIDOR	SECUENCIA DEL PARTIDOR (5'→3')	DESCRIPCIÓN
5' <i>lcyb1</i> sentido	AAA GTG ATG GAT ACT CT	Los partidores 5' y 3' fueron diseñados para la clonación del gen <i>lcyb1</i> . El partidor 3' no posee el codón de termino de la traducción.
3' <i>lcyb1</i> S/T antisentido	CTT CAC AAG CAT TTT GAA CT	
5' <i>lcyb1</i> ATG sentido	<u>ATG</u> AAA GTG ATG GAT ACT CTA C	El partidor 5' posee las bases ATG (subrayadas) que permiten el inicio de la traducción. El partidor 3' posee las bases TAG que detienen la traducción.
3' <i>lcyb1</i> C/T Antisentido	CTT CAC AAG CAT TTT GAA <u>CTAG</u>	
5' <i>lcyb1</i> interno sentido	GGG TTA GCG GTA GCA CAAC	Estos partidores se usaron para verificar la inserción del gen <i>lcyb</i> al vector pCR8. Hibridan en una región interna del gen, amplificando un fragmento de 760 pb
3' <i>lcyb1</i> interno antisentido	GAG GGA GTA CAG GCA GAGG	
T7 promotor sentido	TAA TAC GAC TCA CTA TA	Se utilizaron para secuenciar la construcción del vector pET-Blue1/ <i>lcyb1</i> . Flanquean el inserto <i>lcyb1</i> en el vector pET-Blue1.
T7 terminador antisentido	TAT GCT AGT TAT TGC TCA G	
M13 F	GTA AAA CGA CGG CCA G	Se utilizaron para secuenciar la construcción pCR8/ <i>lcyb1</i> .
M13 R	CAG GAA ACA GCT ATG AC	

2.4 Métodos de Biología Molecular

2.4.1 Extracción del ARN de las plantas

Se procedió a extraer el ARN de la hoja de *D. carota* (variedad Nantes) desde las plantas de 12 semanas de desarrollo. Para esto, 100 mg de tejido fueron pulverizados en morteros previamente estériles en presencia de nitrógeno líquido. Se añadió 1 mL de RNA-Solv (Omega Bio-tek), 0,2 mL de cloroformo por cada mL de RNA-Solv agregado, se depositó en un tubo Eppendorf y se agitó vigorosamente por 15 a 25 s. Se incubó en hielo por 10 min para luego centrifugar a 12000g por 15 min a 22°C. Se transfirió el

carotenoide. Para la cuantificación de los carotenoides fue usado el programa computacional LC-Solutions®, el cual determinó la cantidad de cada carotenoide como el área bajo la curva de cada pico.

2.13 Análisis bioinformático de las Secuencias

Mediante la herramienta bioinformática ClustalW (Thompson y col., 1994), se realizó un alineamiento de secuencias aminoacídicas entre las enzimas LCYB1 y LCYB2 codificadas por los genes *lcyb1* y *lcyb2* de *D. carota* obtenidas en este seminario de título.

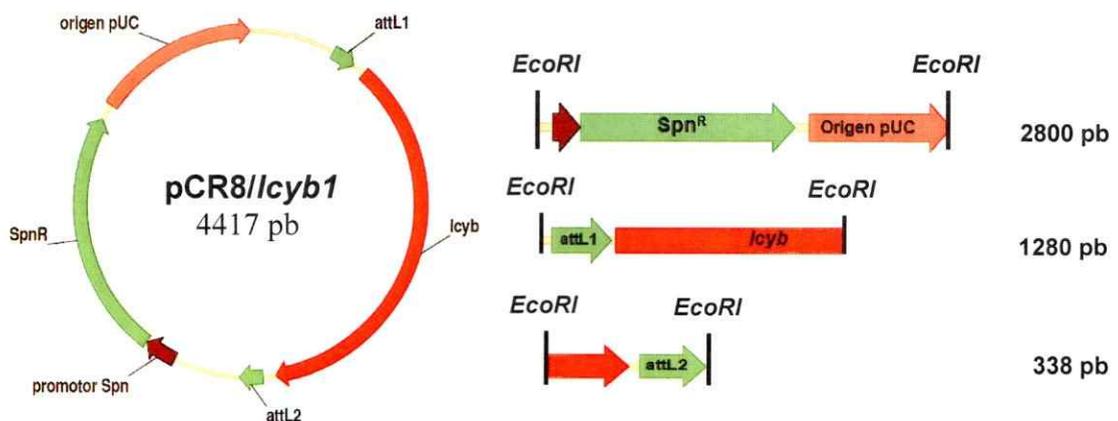
2.14 Análisis estadísticos

Para los experimentos de la complementación, se probaron seis clones de los cuales se eligió al clon 5 y al clon 9 para realizar los experimentos de extracción de carotenoides y cuantificación mediante espectrofotometría, la cuantificación de carotenoides mediante HPLC, y el gráfico comparativo de las LCYB de *D. carota*, todos realizados en triplicado. Para esto se realizaron los análisis estadísticos apropiados usando el programa bioinformático GraphPad Prism 5®, ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni ($p < 0.05$), un t-test pareado y no pareado de dos colas ($p < 0.05$), y un t-test pareado de una cola ($p < 0.05$), respectivamente para cada experimento mencionado anteriormente.

3.1.2 Análisis de la construcción pCR8/lcyb1

Se realizó un PCR de colonia con el fin de determinar si alguna de las colonias analizadas presentaba el fragmento de interés. Para ello se tomó una muestra directa de 23 colonias obtenidas producto de la transformación y se amplificó un fragmento de 760 pb del gen *lcyb1* usando los “partidores internos” (Tabla I, sección 2.3). De estas colonias se seleccionaron 5 y se incubaron por 16 h. Luego, se extrajo el ADN plasmidial mediante kit de extracción (sección 2.5), y luego este se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* para corroborar que efectivamente estaba presente el gen de interés. Esta enzima corta una vez en el inserto (en la posición 1270) y dos veces en el vector pCR8 (en las posiciones 672 y 690). De las 5 colonias digeridas sólo la colonia 20 presentó las 3 bandas de 2800 pb, 1280 pb y de 338 pb (Figura 7 A y B), de acuerdo a lo esperado para un vector que porta el cDNA del gen *lcyb1* en fase respecto del origen de replicación pUC (Figura 7 A). Este clon fue posteriormente secuenciado, obteniéndose un 99% de identidad nucleotídica con el cDNA del gen *lcyb1* de *D. carota sup. sp. sylvestris*, n° de acceso DQ192190.

A



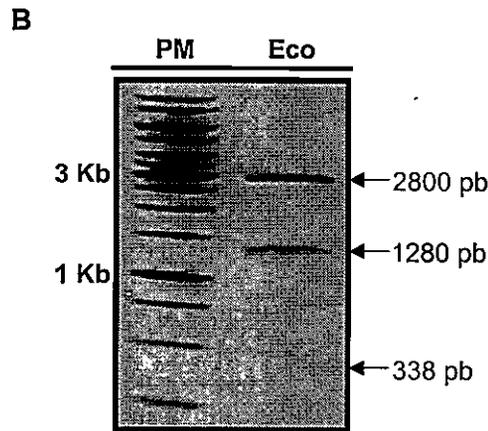


Figura 7. Digestión de la construcción pCR8/*lcyb1* con *EcoRI*: A) Esquema de la digestión del vector pCR8/*lcyb1* con la enzima *EcoRI* B) Eco: muestra la digestión del ADN plasmidial del clon 20 con la enzima *EcoRI* obteniendo tres bandas de 2800, 1280 y 338 pb. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con Bret. PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb.

3.2 Obtención de la construcción pB1/*lcyb1*

3.2.1 Amplificación por PCR del gen *lcyb1* flanqueado por el iniciador y terminador de la traducción

Se diseñaron los partidores 5' *lcyb1* ATG sentido y 3' *lcyb1* C/T (Tabla III), con el fin de amplificar el gen *lcyb1* desde el clon 20, esta vez incluyendo desde el ATG hasta el triplete que genera el término de la traducción. Se puede observar que en los carriles 1 y 2 (muestra en duplicado) se obtiene la banda esperada para el gen *lcyb1* de 1600 pb de igual manera que en el carril del control positivo (Figura 8).

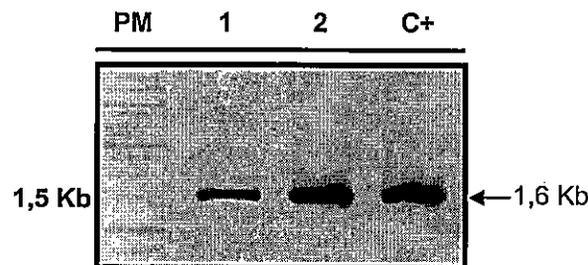


Figura 8. Amplificación del gen *lcyb1*: Electroforesis en gel de agarosa al 1% con BrEt. PCR para la obtención del gen *lcyb1*. En el carril 1 y 2 se cargaron 0,5 μ L de ADN plasmidial del vector pCR8/*lcyb1*. La flecha en negro indica las bandas correspondientes al amplificado, en el carril 1 y 2 del gen *lcyb1* de 1,6 Kb al igual que el control positivo (correspondiente al amplificado de *lcyb1* desde el ADN genómico de *D. carota*). PM: Estándar de peso molecular 1 Kb.

3.2.2 PCR anidado y purificación de la banda del gen *lcyb1* desde el gel de agarosa

Para obtener el producto de la amplificación del gen *lcyb1* sin bandas inespecíficas se decidió realizar una primera amplificación usando como molde el vector pCR8/*lcyb1* y los partidores universales del fago M13, con los cuales se amplificó un fragmento de 2000 pb (Figura no mostrada), el cual contiene la región codificante del gen *lcyb1* y 400 pb correspondientes al vector pCR8. Una dilución 1/10 de este producto de amplificación se usó para realizar un PCR anidado mediante los partidores 5' *lcyb1* ATG sentido y 3' *lcyb1* C/T (Tabla III), con lo que se amplificó la región codificante del gen *lcyb1* (Figura no mostrada). Posteriormente, se realizó la purificación de las bandas del gen *lcyb1* (en cuadruplicado) mediante el kit de purificación Wizard® (Figura 9). Se obtuvieron rendimientos de 10, 12, 14 y 15 ng/ μ L (réplicas 1, 2, 3, 4) para estas réplicas, las cuales provienen de la misma reacción de PCR. Con el fin de realizar la ligación con el vector pB1, estas muestras se concentraron en el Speed-Vac® (Savant), quedando a una concentración promedio final de 23 ng/ μ L.

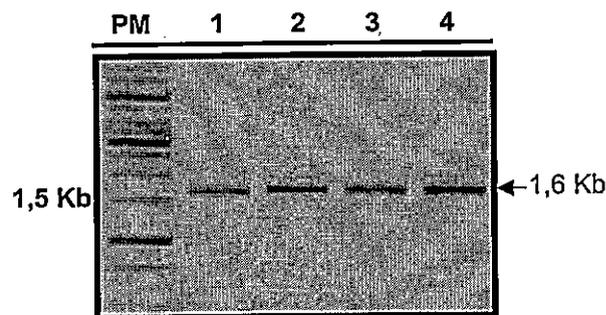


Figura 9. Purificación del gen *lcyb1* para los experimentos de complementación. Purificación del gen *lcyb1*. Carriles 1, 2, 3 y 4: muestras del gen *lcyb1* purificado en cuadruplicado desde un gel de agarosa donde se cargaron los productos del PCR. PM: Estándar de peso molecular de 1Kb. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con BrEt.

3.3 Obtención del vector de expresión pB1

3.3.1 Extracción del ADN plasmidial del vector pB1

Para obtener el vector de expresión pB1 se realizó una extracción del ADN plasmidial a partir de un cultivo de células de *E. coli* previamente transformadas con este vector. Luego de la extracción (en cuadruplicado) se visualizó y cuantificó en un gel de agarosa, observándose una banda correspondiente al vector pB1 (Figura no mostrada). Al cuantificar estas bandas se obtuvo una concentración promedio de 155 ng/ μ L.

3.3.2 Digestión y Purificación del vector pB1

El ADN plasmidial obtenido en el paso anterior fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV* de corte único en el vector, para linearizarlo y obtener una banda de aproximadamente 3500 pb (Figura 10 A). Las bandas correspondientes a estas digestiones fueron cuantificadas y se obtuvo una concentración promedio de 55 ng/ μ L. A continuación se cortaron cuidadosamente las bandas del gel, correspondientes al vector pB1 linearizado, bajo luz ultravioleta y se purificaron mediante kit (Figura 10 B), con lo cual se obtuvo un rendimiento de 8 ng/ μ L en 50 μ L (40% de rendimiento).

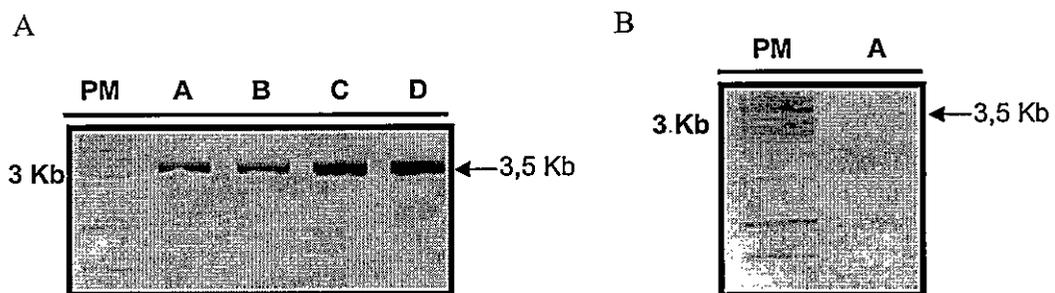


Figura 10. Digestión y purificación del vector de entrada pB1: A) Digestión del vector pB1. A, B, C y D: réplicas del vector pB1 digerido con la enzima *EcoRV*. B) Purificación del vector p1. A: muestra de la purificación del vector pB1 digerido con la enzima *EcoRV*. PM: Estándar de peso molecular 1Kb. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con BrEt.

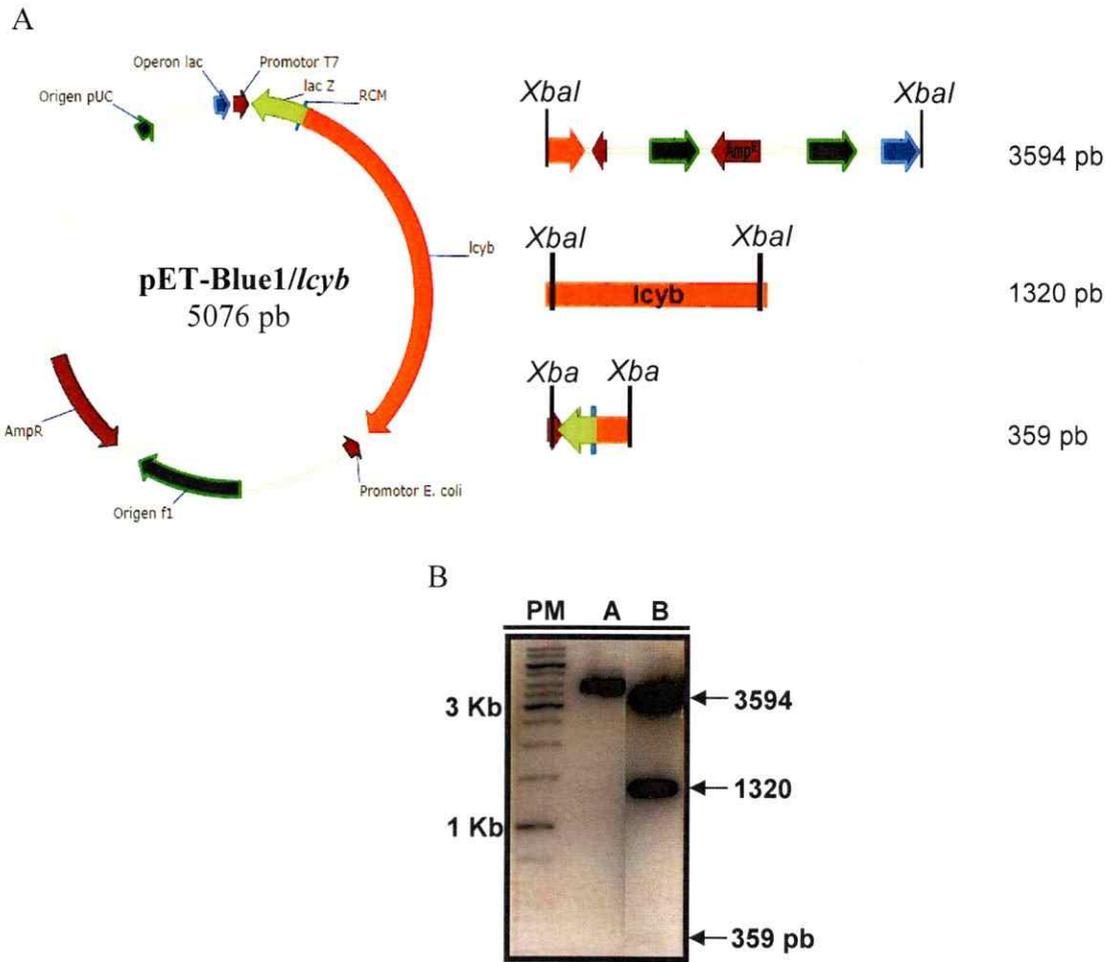


Figura 11. Digestión del ADN plasmidial del clon pDcl/lcyb1: **A)** Esquema de la digestión de la construcción pDcl/lcyb1 con la enzima de restricción *Xba*I en la cual se obtienen tres bandas de 359, 1320 y 3594 pb si el fragmento está en fase respecto al promotor T7. **B)** Se observa en A: ADN plasmidial sin digerir y en B: ADN plasmidial digerido con la enzima de restricción *Xba*I, donde se observan las tres bandas esperadas de 3594, 1320 y 359 pb. PM: Estándar de peso molecular de 1Kb. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con BrEt.

3.5 Complementación del gen de la licopeno β -ciclasa

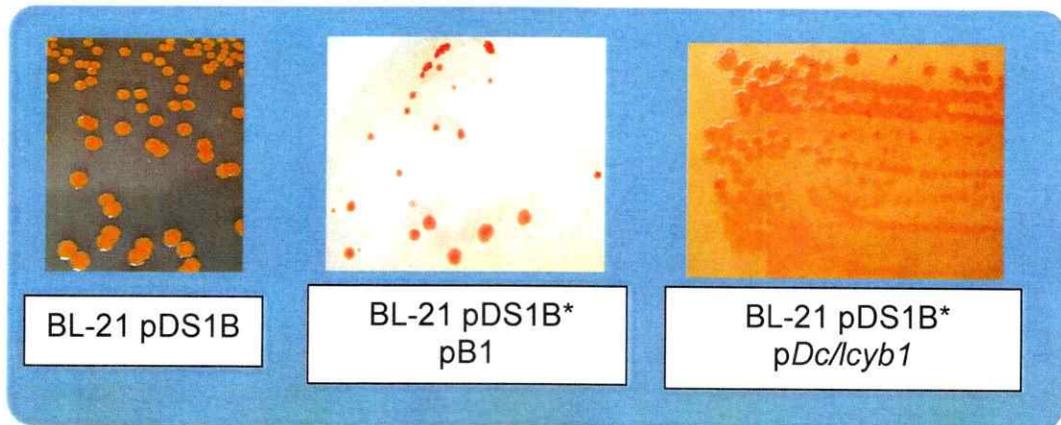
Se usó la cepa *DS1B** (Tabla I) para realizar los experimentos de complementación. Esta cepa fue co-transformada con el vector de expresión pB1, y las construcciones *pDcl/cyb1* y *pDcl/cyb2* (Tabla II) para revertir el fenotipo de color rojo característico de la cepa, devolver la función licopeno β -ciclasa, y de esta manera poder restablecer la ruta de biosíntesis de los carotenoides y obtener el fenotipo color naranja característico de una cepa productora de β -caroteno.

3.5.1 Transformación de las células *pDS1B electrocompetentes con el vector *pDcl/cyb1***

Para realizar el ensayo de la complementación se transformó la cepa *DS1B** (Tabla I) con 1 μ L de ADN plasmidial del clon positivo *pDcl/cyb1*, donde se obtuvieron 30 colonias de color naranja, después de incubarse por tres días en la cámara de cultivo, en oscuridad y a 30°C. De éstas se seleccionaron nueve colonias para realizar las pruebas moleculares. Se observa claramente que en la cepa *DS1B* (Tabla I), la cual es usada como control positivo, se obtuvieron colonias con un fenotipo de color naranja (Figura 12 A), lo cual está indicando la producción del β -caroteno por parte de esta cepa. Por otra parte en la cepa *DS1B** pB1 (Tabla I), que fue usada como control negativo de la complementación, se observan colonias con un fenotipo de color rojo (Figura 12 A), que es el mismo fenotipo que presentó la cepa *DS1B**. Además, se muestra también el fenotipo de color naranja pálido de las colonias obtenidas para la cepa *DS1B** (Figura 12 A). Por otra parte se observó y corroboró lo anterior al centrifugar estos cultivos líquidos y obtener las células concentradas, donde se evidenció más claramente el color del pigmento que producen, el cual en el caso de las

colonias de la cepa DS1B* pB1 es rojo (Figura 12 B) y para las colonias de la cepa DS1B* pDc/lcyb1 es naranja (Figura 12 B).

A



B



Figura 12. Complementación de la cepa DS1B* con el vector pDc/lcyb1: **A)** Células de *E. coli* transformadas con el vector pDS1B, pB1 y pDc/lcyb1 sembradas en medio LB sólido. Se observa que las colonias de la cepa DS1B adquieren una coloración naranja a diferencia de las transformadas con el vector pB1 que adquiere una coloración rojiza. Las colonias de la cepa DS1B* pDc/lcyb1 presentan un fenotipo de color naranja pálido. **B)** Precipitado de células de *E. coli* transformadas con el vector pB1 y pDc/lcyb1. Se observa el color rojizo que presenta la cepa DS1B* pB1 (izquierda) y el color naranja que presenta la cepa DS1B* pDc/lcyb1 (derecha).

3.6 Extracción y Cuantificación de los carotenoides

3.6.1 Determinación del peso seco

Se obtuvieron los resultados de peso seco de aproximadamente entre 1-8 mg/g de peso seco para el clon 5 y 9 DS1B* *pDcl/cyb1* y *pDcl/cyb2* y el control negativo DS1B* pB1 (Tabla no mostrada).

3.6.2 Extracción de los carotenoides desde los cultivos bacterianos

Luego de 48 h de cultivo de los clones 5 y 9 (en triplicado), se realizó la extracción de los carotenoides y se midió la absorbancia de éstos a 450 nm. Las absorbancias para las muestras del clon 5 (DS1B* *pDcl/cyb1*) y el clon 9 (DS1B* *pDcl/cyb2*), y para los controles negativos (DS1B* pB1) se muestran en la Tabla V.

Tabla V. Absorbancia a 450 nm de los carotenoides extraídos desde el clon 5 DS1B* *pDcl/cyb1* y desde el clon 9 DS1B* *pDcl/cyb2*.

Clon	Inducción	XAbs	Clon	Inducción	XAbs
Clon 5 (1)	SI	1,505	Clon 9 (1)	SI	0,726
	NO	0,883		NO	0,642
Clon 5 (2)	SI	1,130	Clon 9 (2)	SI	0,816
	NO	0,780		NO	0,829
Clon 5 (3)	SI	1,292	Clon 9 (3)	SI	0,855
	NO	0,876		NO	0,475
Control Negativo	SI	0,653	Control negativo	SI	0,997
	NO	0,653		NO	0,529

Con los datos del peso seco obtenidos anteriormente (Tabla III) y las mediciones de absorbancia realizadas en el punto anterior (Tabla IV) y por medio de la aplicación de la ecuación 1 (sección 2.12.2), se calcularon las partes por millón (μg de pigmento/ g de peso seco) totales de los carotenoides presentes en las muestras extraídas a partir de los cultivos bacterianos crecidos durante 48 h en presencia o ausencia de IPTG (Tabla V).

Tabla VI. Partes por millón de los carotenoides totales extraídos del clon 5 DS1B* *pDc/lcyb1* y del clon 9 DS1B* *pDc/lcyb2*.

Clon	Inducción con IPTG	ppm
DS1B* <i>pDc/lcyb1</i>	SI	264,24 ± 45,63 ^b
	NO	189,97 ± 21,98 ^a
Control (-) DS1B* pB1	SI	160,56 ^a
	NO	158,65 ^a
DS1B* <i>pDc/lcyb2</i>	SI	185,86 ± 6,817
	NO	178,19 ± 38,19
Control (-) DS1B* pB1	SI	150,77
	NO	183,79

a: Letras distintas indican diferencias significativas entre las muestras y sus controles, para cada clon por separado. ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni ($p < 0.05$).

Podemos observar que en las mediciones de la absorbancia para los carotenoides totales a una longitud de onda de 450 nm, los valores obtenidos para el clon 5 (en triplicado) en presencia del agente inductor IPTG son mayores que los valores de absorbancia para el clon 5 en ausencia de IPTG y también en comparación con el control negativo el cual presenta los valores de absorbancia más bajos (Tabla V).

Por otra parte al analizar los datos obtenidos en las Tablas V y VI, que dan como resultado la Tabla VII, se observa que efectivamente para el promedio de las tres réplicas del clon 5 DS1B* *pDc/lcyb1* en presencia de IPTG se produce una mayor cantidad de carotenoides en comparación con su control negativo, con la misma muestra en ausencia de IPTG y con el control negativo de esta última (1,6; 1,4 y 1,7, respectivamente). Por el contrario, todas las muestras del clon 9 DS1B* *pDc/lcyb1* presentan niveles similares de carotenoides totales, incluso con sus controles negativos (Tabla VII).

3.6.3 Identificación y cuantificación de los carotenoides mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa.

Por medio de las mediciones realizadas en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa se obtuvieron los cromatogramas correspondientes a las cepas DS1B* pB1, *pDcl/cyb1* (Figura 13, A-C) y *pDcl/cyb2* (Figura 14, A-C) incubadas por 48 h con y sin inducción. En la figura 13 A y 14 A, se muestran los cromatogramas de la cepa DS1B* pB1, la cual fue usada como control negativo, en donde se observa un único pico correspondiente al licopeno, el cual migra a un tiempo de retención de 13,5 min aproximadamente. Esto confirma que la cepa DS1B* pB1 es productora de licopeno. Además, confirmamos que la transformación con el vector pB1 no coopera a la síntesis de β -caroteno.

En la figura 13 B, se observa el cromatograma del clon 5 DS1B* *pDcl/cyb1* en ausencia del agente inductor IPTG. Se aprecia la presencia de dos picos, uno correspondiente al licopeno, a un tiempo de retención de 13,5 min y el otro correspondiente al β -caroteno, a un tiempo de retención de 24 min aproximadamente. En la figura 13 C donde se muestra la complementación con *cyb1* en presencia de IPTG, se observan los mismos dos picos que en la figura 13 B, pero el pico para licopeno es de menor tamaño que el del β -caroteno. Los picos fueron identificados mediante comparación con el estándar que presenta el equipo, además de ser corroborado mediante el programa bioinformático LCsolutions® (gráfico no mostrado), el cual considera la forma del pico y las longitudes de onda a la que absorbe, y con el "manual de carotenoides" (Britton y col., 2004).

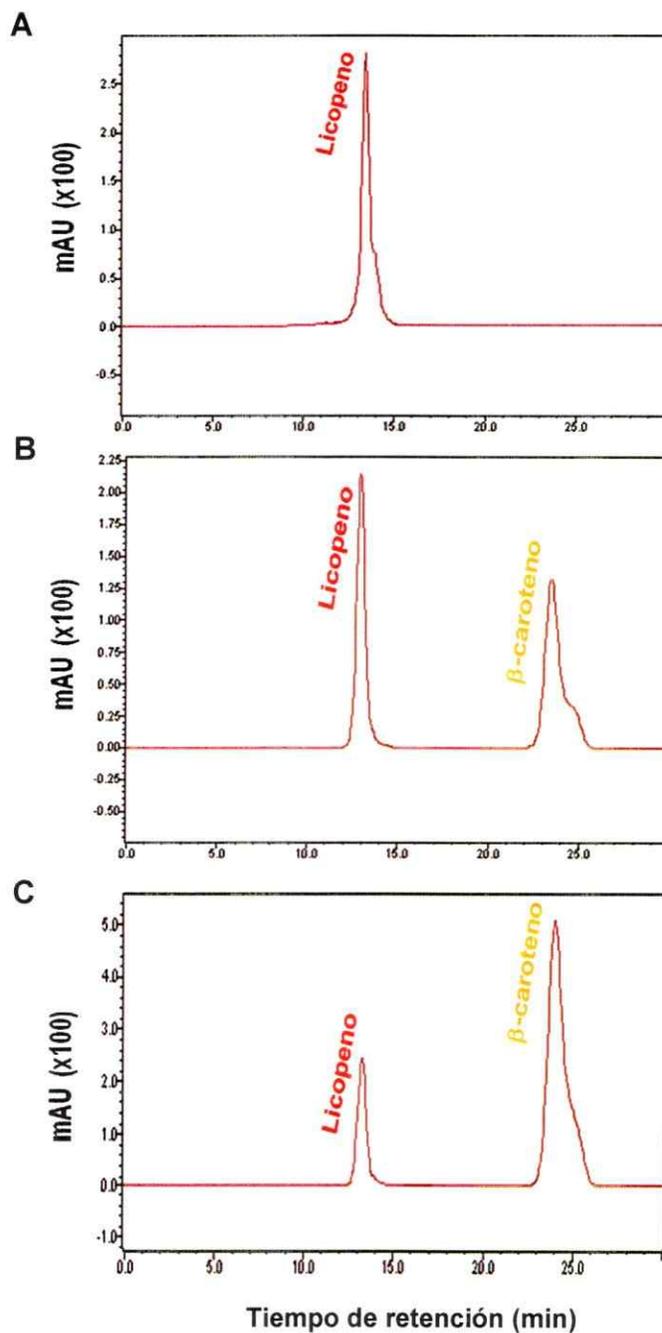


Figura 13. Cromatogramas de los carotenoides presentes en la cepa DS1B* pB1 y pDcl/cyb1. **A)** Cromatograma correspondiente a la extracción de los pigmentos desde los cultivos líquidos de la cepa DS1B* pB1 incubado por 48 h. Se observa en el cromatograma un único pico correspondiente al licopeno a un tiempo de retención de 13,5 min (control negativo). **B-C)** Cromatogramas correspondiente a la extracción de los pigmentos desde los cultivos líquidos de la cepa DS1B* pDcl/cyb1 crecidos por 48 h. Se observan dos picos correspondientes al licopeno y al β -caroteno a un tiempo de retención de 13,5 y 24 min, en ausencia (B) y presencia de IPTG (C) (cepas productoras de β -caroteno).

Por otra parte, en la complementación con el gen *lcyb2* en ausencia y presencia de IPTG (Figura 14 B y C), se observan 3 picos, dos de los cuales corresponde a licopeno y β -caroteno, los cuales presentan un tiempo de retención de al igual que en la figura 13 B y C, pero además se observa un tercer pico a un tiempo de 13,5 y 24,5 respectivamente. El tercer pico aparece entre medio de los picos ya mencionados, con un tiempo de retención de 18,5 min. Este pico correspondería a un compuesto monocíclico, que sería el intermediario entre el licopeno y el β -caroteno, posiblemente el γ -caroteno. Estos picos fueron identificados de igual forma que los picos detectados para el experimento de complementación con el gen *lcyb1*.

Es importante mencionar que si bien el tamaño del pico en el cromatograma no indica mayor producción de un carotenoide que de otro, esto sí es determinado por el área bajo la curva del pico obtenido.

Posteriormente, se obtuvieron los resultados del área bajo la curva de cada pico, en porcentaje, los que se utilizaron junto a los resultados de la cantidad de carotenoides totales obtenidos por peso seco de muestra para calcular el valor en partes por millón (ppm) tanto para el licopeno como para el β -caroteno producido por cada cepa (Tabla VII).

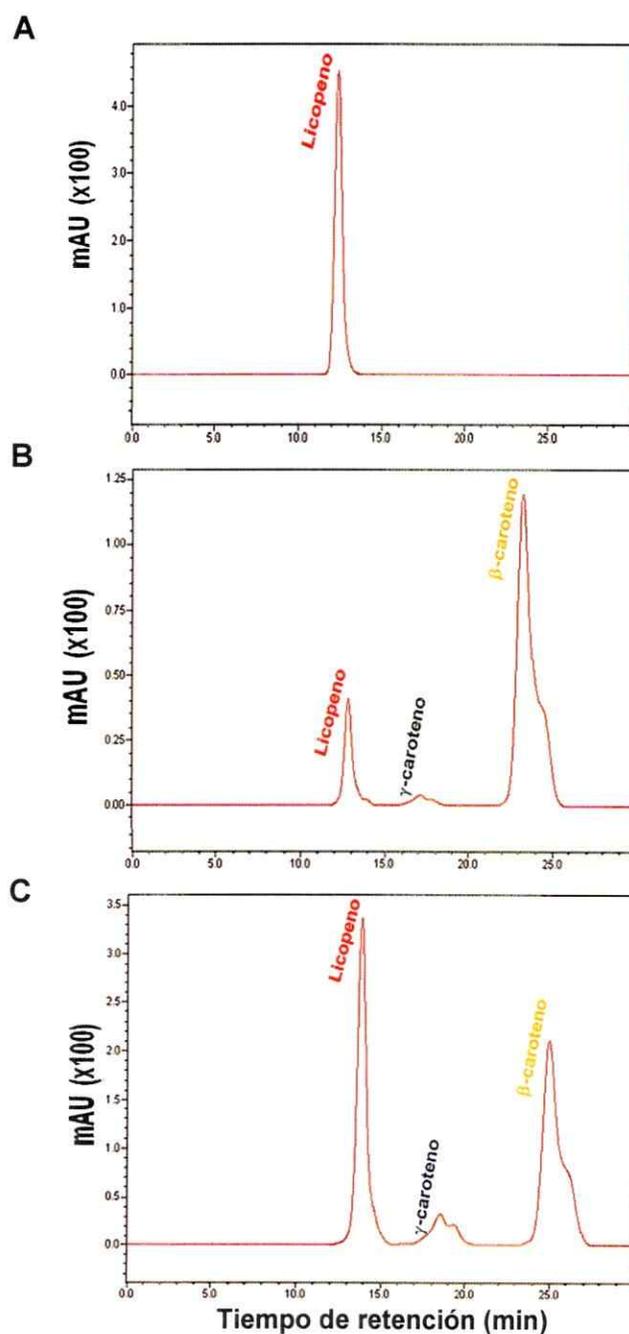


Figura 14. Cromatogramas de los carotenoides presentes en la cepa DS1B* pB1 y pDc/lcyb2. **A)** Extracción de los pigmentos desde los cultivos líquidos de la cepa DS1B* pB1 incubada por 48 h. Se observa en el cromatograma un único pico correspondiente al licopeno a un tiempo de retención de 13,5 min (control negativo). **B-C)** Extracción de pigmentos desde cultivos líquidos de la cepa DS1B* pDc/lcyb2 incubada por 48 h. Se observan tres picos correspondientes al licopeno, al β-caroteno y a un intermediario monocíclico a un tiempo de retención de 13,5, 24,5 y 18,5 min respectivamente, en ausencia (B) y presencia de IPTG (C) (cepas productoras de β-caroteno).

Tabla VII. Composición porcentual y en ppm de los carotenoides presentes en las muestras (clon 5 y 9) incubadas por 48 h.

Clon	Carotenoides	Inducción	Composición de carotenoides (%)	Cantidad de pigmento (ppm)
5 DS1B* <i>pDc/lcyb1</i>	Licopeno	SI	27,73 ± 10,04	73,263 ± 26,52 ^{*,**}
		NO	43,26 ± 7,642	93,540 ± 26,52 ^{*,*}
	β-caroteno	SI	72,26 ± 10,04	190,97 ± 16,47 ^{**}
		NO	56,73 ± 7,642	122,62 ± 16,47 ^{**}
Control (-) DS1B* pB1	Licopeno	SI	100	160,56
		NO	100	158,65
	β-caroteno	SI	0	0
		NO	0	0
9 DS1B* <i>pDc/lcyb2</i>	Licopeno	SI	59,88 ± 15,83	110,7 ± 25,57
		NO	43,45 ± 15,39	79,08 ± 35,95 [*]
	β-caroteno	SI	40,11 ± 15,83	75,16 ± 31,16
		NO	56,55 ± 15,39	99,13 ± 29,16 [*]
Control (-) DS1B* pB1	Licopeno	SI	100	150,77
		NO	100	183,77
	β-caroteno	SI	0	0
		NO	0	0

^{*}, ^{**}: El o los asteriscos indican diferencias significativas de cada clon en comparación con su control negativo en condiciones con y sin inducción determinado por un t-test pareado de dos colas ($p < 0.05$).

^{*}, ^{**}: El símbolo indica el grado de las diferencias significativas existentes en los niveles de licopeno en comparación con los niveles de β-caroteno producidos con y sin inducción, para cada clon por separado, determinado por un t-test no pareado de dos colas ($p < 0.05$).

De la Tabla VII, donde cada muestra se hizo en triplicado, es posible obtener una serie de resultados. Considerando en primera instancia el clon 5 DS1B* *pDc/lcyb1*, podemos observar que los niveles de licopeno cuantificados disminuyen con respecto a los controles negativos (Tabla VII), tanto en las condiciones de inducción con IPTG como en ausencia de esta, en razones de cambio de 2,2 y 1,7 veces, respectivamente. Consecuentemente, los niveles de β-caroteno en estos cultivos aumentan 191 veces en inducción y 123 veces en ausencia de esta, en comparación con los controles negativos, los que carecen de este pigmento (Tabla VII). Además, los niveles de β-caroteno resultan 2,6 y 1,3 veces mayores a los de licopeno, en presencia y ausencia de inducción por IPTG, respectivamente. De estos resultados podemos observar que el

gen *lcyb1* codifica para una enzima LCYB1 funcional, capaz de transformar gran parte del licopeno producido en β -caroteno. Por otra parte, para el clon 9 DS1B* *pDcllcyb2*, podemos observar que los niveles de licopeno cuantificados disminuyen 2,3 veces con respecto al control negativo en ausencia de inducción por IPTG, y los niveles de β -caroteno aumentan 99 veces con respecto al control negativo (que carece de este pigmento), en ausencia de inducción. Sin embargo, cuando se induce la expresión del gen *lcyb2* mediante IPTG, no es posible observar cambios significativos en los niveles de licopeno en la muestra con respecto a su control negativo (Tabla VII). En el caso del β -caroteno, aún cuando este está ausente en el control negativo y es detectado en el clon 9 inducido con IPTG, los valores obtenidos no reflejan diferencias estadísticas (Tabla VII). El comportamiento anterior indicaría un efecto represivo en lugar de inductivo para el IPTG en este caso. A pesar de lo anterior, los resultados obtenidos para el clon 9 sin inducción nos permiten deducir que el gen *lcyb2* codifica para una enzima LCYB2 funcional, capaz de convertir el licopeno en β -caroteno. En este caso los niveles de β -caroteno y licopeno medidos no presentan diferencias significativas, lo que podría indicar que esta enzima tiene una menor actividad catalítica que LCYB1, en las condiciones de ausencia de inducción.

Dados los resultados obtenidos previamente y con el fin de ilustrar los cambios en los niveles del licopeno y del β -caroteno (en ppm) dados por la actividad de las enzimas LCYB1 y LCYB2 de una manera más clara, se graficaron las tres mediciones realizadas mediante HPLC para el clon 5 (*lcyb1*) y el clon 9 (*lcyb2*) en condiciones de ausencia de inducción, en comparación con sus respectivos controles negativos.

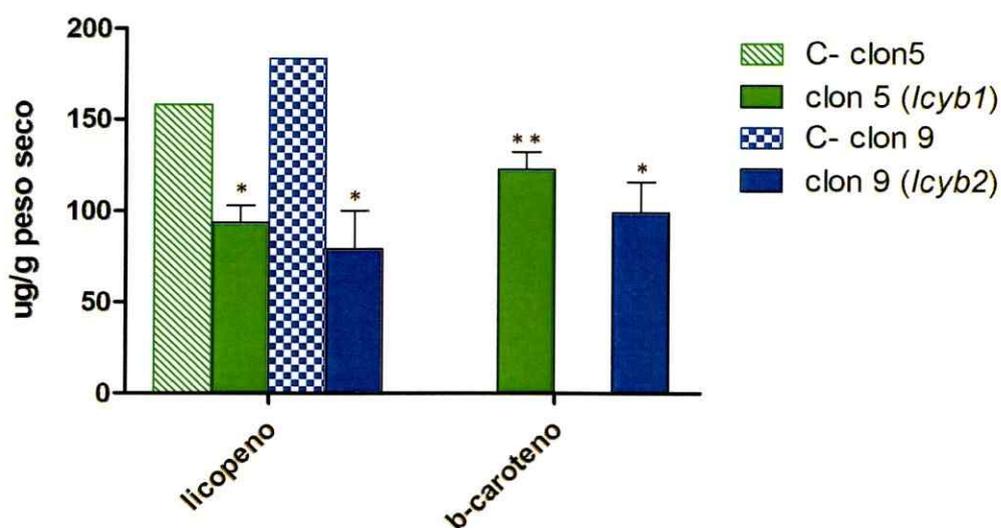


Figura 15. Niveles de carotenoides producidos por las enzimas LCYB1 y LCYB2. Niveles de carotenoides medidos mediante HPLC y espectrofotometría a partir de una extracción (en triplicado) de carotenoides desde cultivos líquidos bacterianos en ausencia de IPTG. C – clon 5 y 9 representan los controles de cada experimento. Los asteriscos indican diferencias significativas determinadas por un t-test pareado de una cola ($p < 0,05$).

En la Figura 15 se graficaron los niveles de licopeno y β -caroteno para los clones 5 y 9 en comparación con su control negativo. El análisis estadístico se realizó entre cada clon y su control negativo, para cada uno de los carotenoides y además entre los niveles de β -caroteno producidos por LCYB1 y LCYB2. Aquí podemos observar menores niveles de licopeno en el clon 5 (transformado con el gen *lcyb1*) que en su control negativo (vector sin inserto), al igual que para el clon 9 (transformado con el gen *lcyb2*) y su control negativo. En el caso del β -caroteno, se observa que este está presente tanto el clon 5 como el clon 9, aunque no en sus controles negativos, por lo que se concluye que tanto el gen *lcyb1* como el gen *lcyb2* codifican para enzimas con actividad licopeno β -ciclase, aun cuando la enzima LCYB1 tendría una mayor actividad (dada por una mayor conversión de licopeno a β -caroteno que la enzima LCYB2).

4. Análisis Bioinformático de Secuencias

Se obtuvieron distintas regiones conservadas y motivos característicos de LCYs y de β -LCYs para la LCYB1 y LCYB2 de *D. carota* codificadas por los genes *lcyb1* y *lcyb2*, los cuales son mostrados a continuación (Figura 16).

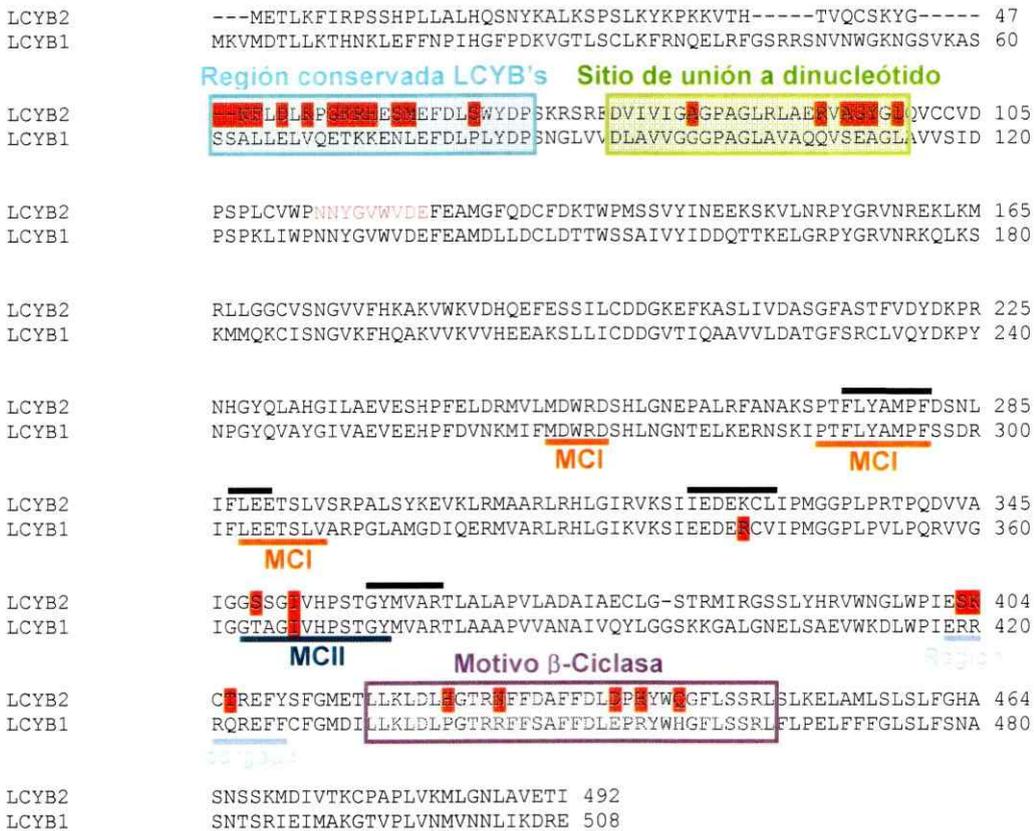


Figura 16. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de LCYB1 y LCYB2 de *D. carota*. Se muestran las distintas regiones de interés, descritas como características de LCYs de plantas, y son señaladas como "Región conservada de LCYBs", "Sitio de unión a dinucleótido", "Motivo β -Ciclasa", motivo ciclasa I "MCI", motivo ciclasa II "MCII", y "región cargada" (Hugueney y col., 1995; Cunningham y col., 1996; Alquezar, 2007). Los aminoácidos destacados con fondo rojo representan las mutaciones o variaciones de aminoácidos presentes en las secuencias de los genes *lcyb1* y *lcyb2* que codifican para las respectivas LCYB1 y LCYB2. Las líneas en negro indican dominios esenciales para la actividad catalítica y los aminoácidos en color rosado corresponde a un dominio específico de LCYs (Alquezar, 2007).

5. Discusión

5.1 Obtención del gen *lcyb1* de *D. carota*

El 99% de identidad nucleotídica obtenido para el gen *lcyb1* al compararlo con el gen *lcyb* de la base de datos indica la presencia de 10 mutaciones a nivel de su secuencia aminoacídica. Estas mutaciones se traducen en 5 mutaciones a nivel aminoacídico, pero éstas no afectan ninguno de los dominios descritos como esenciales para las enzimas LCYB (Hugueney y col., 1995; Cunningham y col., 1996; Alquezar, 2007). Además estos cambios a nivel aminoacídico podrían ser polimorfismos a nivel de un nucleótido (SNP) presentes en la variedad de zanahoria de donde se obtuvo el gen *lcyb1* en este trabajo.

5.2 Generación de la construcción pB1//*lcyb1*

Un punto crítico en la obtención de la construcción pB1//*lcyb1* fue la amplificación y posterior ligación del gen *lcyb1* en el vector pB1. Para esto se diseñaron partidores a los que se añadió el triplete ATG y un codón de término (Tabla III) para la correcta síntesis de la proteína en el sistema bacteriano. La amplificación del cDNA se realizó con la enzima PFU ADN polimerasa para reducir la probabilidad de generar mutaciones y para dejar los extremos romos que permitieron la clonación en el vector pB1. El porcentaje de transformación que se obtuvo fue de 6%, lo cual es bastante bajo. Esto posiblemente se debe a que la ligación de un fragmento romo presenta una baja eficiencia en la ligación en comparación con una ligación de un fragmento con extremos cohesivos (Sambrook y col., 1989). Debido problemas en la clonación del gen *lcyb1* en el vector de expresión pB1, se diseñó una estrategia de PCR anidado, con la que se obtuvo el gen *lcyb1*. Mediante esta técnica se obtuvo una correcta amplificación y posterior purificación del gen *lcyb1* (Figura 9), el cual se ligó

exitosamente en el vector pB1, como se corroboró por la alta eficiencia de transformación obtenida (33%) en comparación con los intentos de clonaciones anteriores (5-10%).

5.3 Ensayos de complementación

Se transformó la cepa mutante con el vector de expresión *pDcllcyb1* restableciéndose el flujo normal de la ruta carotenogénica en la cepa DS1B* (Figura 12 A y B), lo que evidencia la correcta funcionalidad de la construcción generada y da cuenta en primera instancia de la actividad licopeno β -ciclase del gen *lcyb1* de *D. carota*. Una vez comprobada la efectividad de esta metodología para determinar la funcionalidad del gen *lcyb1* de *D. carota*, ésta se implementó para evaluar la funcionalidad del gen *lcyb2* de zanahoria.

En este caso se utilizó la construcción *pDcllcyb2* para complementar la cepa DS1B*, obteniéndose un primer indicio de la funcionalidad de este gen por el fenotipo de color naranja presentado por las colonias generadas al complementar la cepa mutante con el gen *lcyb2* (Figura no mostrada).

5.4 Extracción y cuantificación de los carotenoides mediante HPLC

Respecto a la producción de los carotenoides en *E. coli*, se ha reportado que ésta alcanza el orden de los mg/g de peso seco, dependiendo del tiempo de inducción (Albrecht y col., 1999). En nuestros resultados obtuvimos rangos de peso seco de 1-8 mg en la extracción realizada para la cepa DS1B* *pDcllcyb1* y *pDcllcyb2* (Tabla no mostrada), lo cual se encuentra dentro del rango reportado. Por otra parte, los datos de absorbancia obtenidos para la cepa DS1B* *pDcllcyb1* muestran un claro patrón de aumento en las réplicas donde hubo inducción por IPTG en comparación con las

réplicas donde no lo hubo, lo cual comprobaría la capacidad de esta molécula de inducir la expresión del gen *lcyb1* en *E. coli*. Sin embargo, en la cepa mutante transformada con el vector *pDcllcyb2* no fue posible observar en esta primera instancia una inducción mediada por IPTG (Tabla V). Al analizar las partes por millón (ppm) para cada muestra (Tabla VI), para la cepa transformada con el vector *pDcllcyb1* se obtuvieron aumentos de ppm de 1,4 veces en condiciones de inducción respecto a las condiciones sin inducción, y aumentos de 1,6 veces en condiciones de inducción respecto del control negativo (Tabla VI). Este es un resultado inesperado, ya que la función del IPTG es inducir la expresión del gen *lcyb1* y por lo tanto favorecer la conversión de licopeno a β -caroteno, considerando una correcta síntesis de la proteína LCYB1, por lo que se esperaba un cambio en la composición de los carotenoides en la cepa transformada, pero no en la cantidad de estos. Sin embargo, un aumento en los niveles de los carotenoides totales producto de la inducción con IPTG ha sido reportado previamente (Niklitscheck, 2008). Para la cepa DS1B* *pDcllcyb2* no se obtuvieron valores de ppm significativamente distintos, es decir estadísticamente la cantidad de los carotenoides producida por el clon 9 es la misma en presencia y ausencia de IPTG, y en sus respectivos controles negativos (Tabla VI). En este resultado no se aprecia el efecto del incremento de las ppm producidas sugerido para el IPTG, lo que podría deberse a que la concentración de este agente inductor fue usada en exceso, produciéndose una sobre-expresión del gen *lcyb2* a tal nivel que podría generar la formación de cuerpos de inclusión de la proteína LCYB2, como se expondrá más adelante.

Por otra parte, los cromatogramas obtenidos mediante HPLC evidencian la presencia de dos picos para la cepa DS1B* *pDcllcyb1* (Figura 13 B y 13 C) y un solo pico para la cepa DS1B* *pB1* (Figura 13 A). Sin embargo, e inesperadamente,

observamos tres picos en el cromatograma obtenido para la cepa DS1B* *pDc/lcyb2* (Figura 14 B y 14 C). De este cromatograma también se observa que la amplitud de los picos cambia en presencia (Figura 13 C) o ausencia de IPTG (Figura 13 B), aumentando no solo en amplitud (área bajo la curva) sino en magnitud (ppm generadas) en presencia de este agente inductor. Esto corrobora el papel del IPTG en el aumento de la expresión génica que en este caso se traduce en una mayor producción de la enzima LCYB1 y por lo tanto en un aumento en la síntesis de β -caroteno. En el segundo caso, el tercer pico que presenta un tiempo de retención de 18,5 min correspondería a un intermediario monocíclico llamado γ -caroteno. Este es uno de los intermediarios entre el licopeno y el β -caroteno y posee solo una ciclación en uno de sus extremos (Figura 3). La presencia de este intermediario daría cuenta de que la tasa de conversión de licopeno a β -caroteno no es total, es decir, la enzima para la cual codifica el gen *lcyb2* ciclaría los dos extremos del licopeno, pero de una forma menos eficiente que la enzima LCYB1. Es importante mencionar que para los genes *lcyb1* y *lcyb2*, se obtiene una producción (en ppm) y un pico considerable (en los cromatogramas) de β -caroteno en ausencia de IPTG, lo cual se debe a que los sistemas de inducción que emplean los vectores pET, como en este trabajo, presentan una expresión basal bastante alta en comparación con otros vectores que son regulados por maltosa o arabinosa con los cuales se obtiene una regulación más precisa de la expresión del gen. Es por eso que para obtener diferencias más claras y precisas entre estas dos condiciones de inducción podrían clonarse estos genes en vectores como los mencionados anteriormente, que presenten no una inducción sino una represión de la expresión génica.

concentración de IPTG que se usó en el cultivo posiblemente causó la formación de cuerpos de inclusión de la proteína LCYB2, los cuales impidieron el correcto funcionamiento de la totalidad de la enzima sintetizada. Esto ha sido reportado en algunos trabajos donde se emplea el IPTG para inducir expresión génica (Sriubolmas y col., 1997) y podría indicar en este caso que la expresión basal del gen *lcyb2* en el vector pB1 es suficiente para lograr la síntesis de una cantidad suficiente de la enzima LCYB2 para alcanzar la conversión de parte del licopeno al β -caroteno. Para solucionar esto se podría haber realizado una curva de concentración de IPTG o bien realizar una nueva construcción con una expresión basal aún menor. Sin embargo, al obtener el pico del β -caroteno detectado mediante HPLC y la producción del β -caroteno obtenida en ausencia de IPTG respecto al control negativo, ya se demostraba la funcionalidad del gen *lcyb2* de *D. carota*.

A pesar de que ambas enzimas presentaron actividad licopeno β -ciclase en este sistema de expresión heteróloga hay que tener presente que en este sistema experimental las enzimas no son ensambladas, procesadas ni modificadas transcripcionalmente de la misma forma que en las células vegetales por lo que su actividad o eficiencia no se verá reflejada totalmente en estos experimentos. Además es muy importante tener presente que se están expresando genes eucariontes en un organismo procarionte.

6. Conclusiones

- *E. coli* es un excelente sistema para la evaluación de la funcionalidad de genes carotenogénicos provenientes de *D. carota*.
- El agente inductor IPTG induce la expresión génica del gen *lcyb1* lo que se traduce en mayores niveles de β -caroteno en comparación con la cepa complementada en condiciones de no inducción, y evidencia indirectamente mayores niveles de LCYB1.
- La concentración de IPTG utilizada para inducir la expresión del gen *lcyb2* no se tradujo en mayores niveles de β -caroteno en comparación con la cepa sin inducir, lo cual probablemente se debe a que esta concentración de IPTG favorecería la formación de cuerpos de inclusión de la proteína LCYB2.
- Los genes *lcyb1* y *lcyb2* de *D. carota* efectivamente codifican para enzimas LCYB1 y LCYB2 capaces de transformar el licopeno en β -caroteno, restableciendo de esta forma la ruta carotenogénica expresada en *E. coli*, lo que evidencia una actividad licopeno β -ciclase para estas enzimas.
- La presencia del γ -caroteno en los cromatogramas obtenidos para la LCYB2 además de la comparación de secuencia aminoacídica entre la LCYB1 y LCYB2, respaldan y sugieren fuertemente que la enzima LCYB1 presenta una mayor tasa de conversión de licopeno a β -caroteno que la enzima LCYB2.

7. Proyecciones

- Realizar ensayos de actividad con las enzimas LCYB1 y LCYB2 para poder determinar exactamente cual enzima tiene una mayor actividad catalítica.
- La principal proyección de este trabajo es poder sobreexpresar el gen licopeno β -ciclase (*lcyb1*) en otros organismos vegetales para mejorar y aumentar los niveles de β -caroteno, lo que aumentará sus propiedades nutritivas y como antioxidante, además de su valor comercial.

8. Referencias

- Al-Babili S., Beyer P.** 2005. Golden Rice - five years on the road – five years to go?. *TRENDS in Plant Science* Vol. 10 No. 12.
- Al-Babili S., Hugueney P., Schledz M., Welsch R., Frohnmeyer H., Laule O., Beyer P.** 2000. Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum*. *FEBS Lett.* **485** (2-3): 168-172.
- Albrecht M., Misawa N., Sandmann G.** 1999. Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids β -carotene and zeaxanthin. *Biotechnology Letters* **21**: 791–795.
- Alquezar B.** 2007. Caracterización bioquímica y molecular de la carotenogénesis en frutos cítricos. Tesis doctoral para optar al grado de Doctor. Universidad de Valencia.
- Aluru M., Xu Y., Guo R., Wang Z., Li S., White W., Wang K., Rodermeil S.** 2008. “Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content”. *Journal of Experimental Botany*, **59**: 3551-3562.
- Armstrong G., Hearst J.** 1996. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis”. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **10**: 228-237.
- Baranska M., Baranski R., Schulz H., Nothnagel T.** 2006. Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta* **224**: 1028–1037.
- Bartley E., Scolnik P.** 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell*, Vol. 7: 1027-1038.
- Bassi R., Pineau B., Dainese P., Marquardt J.** 1993. Carotenoidbinding proteins of photosystem II. *European Journal of Biochemistry* **212**: 297-303.
- Bonk M., Hoffmann B., von Lintig J., Schledz M., Al-Babili S., Hobeika E., Kleinig H., Beyer P.** 1997 Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes *in vitro* reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. *European Journal of Biochemistry* **247**: 942-950.
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H.** 2004. Carotenoids Handbook. En Birkhauser Verlag, Basel-Boston-Berlin. (eds.), Section II: Main List of Natural Carotenoids. pp 12.
- Bouvier F., Hugueney P., d’Harlingue A., Kuntz M., Camara B.** 1994. Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6- epoxy-carotenoids into ketocarotenoid. *Plant Journal* **6**: 45–54.
- Bouvier F., d’Harlingue A., Hugueney P., Marin E., Marion-Poll A., Camara B.** 1996. Xanthophyll biosynthesis: cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of *betacyclohexenyl* carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *Journal of Biology Chemistry* **271**: 28861-67.
- Bouvier F., d’Harlingue A., Camara B.** 1997. Molecular analysis of carotenoid cyclase inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* **346** (1): 56-64.

- Bouvier F., d'Harlingue A., Backhaus R., Kumagai M., Camara B.** 2000. Identification of a neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralogue. *Eur. J. Biochem.* **267** (21): 6346-6352.
- Bouvier F., Rahier A., Camara B.** 2005. Biogenesis, molecular regulation and function of plant Isoprenoids. Institut de Biologie Moleculaire des Plantes du CNRS (UPR2357) et Universite Louis Pasteur.
- Britton G.** 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **9**: 1551-58.
- Cunningham F., Sun Z., Chamovitz D., Hirschberg J., Gantt E.** 1994. Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC7942. *Plant Cell* **6**: 1107-21.
- Cunningham F., Pogson B, Sun Z., McDonald K., DellaPenna D., Gantt E.** 1996. Functional analysis of the β and ϵ -lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* **8**: 1613-26.
- Cunningham F., Gantt E.** 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual rev. Plant Physiology Plant Molecular Biology* **49**: 557-583.
- Cunningham F., Gantt E.** 2001. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene-cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 2908-2910.
- D'Ambrosio C., Giorio G., Marino I., Merendino A., Petrozza A., Salfi L., Stigliani A., Cellini F.** 2004. Virtually complete conversion of lycopene into β -carotene in fruits of tomato plants transformed with the tomato *lycopene β -cyclase (lcy-b)* cDNA. *Plant Science* **166**: 207-214.
- Demmig-Adams B., Adams W.** 2002. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science* **298**: 2149-53.
- Demmig-Adams B., Gilmore A., Adams W. III** 1996. Carotenoids 3: *in vivo* function of carotenoids in higher plants. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **10**: 403-12.
- Diretto G., Tavazza R., Welsch R., Pizzichini D., Mourgues F., Papacchioli V., Beyer P., Giuliano G.** 2006. Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase. *BMC Plant Biology*, **6**:13.
- Frank H., Cogdell R.** 1996. Carotenoids in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* **63**: 257-64.
- Fraser P., Hedden P, Cooke D., Bird C., Schuch W., Bramley P.** 1995. The effect of reduced activity of phytoene synthase on isoprenoid levels in tomato pericarp during fruit development and ripening. *Planta* **196**: 321-26.
- Fraser P., Bramley P.** 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Program of Lipid Research* **43**: 228-265.
- Fujisawa M., Watanabe M., Choi S., Teramoto M., Ohyama K. Misawa N.** 2008. Enrichment of carotenoids in Flaxseed (*Linum usitatissimum*) by metabolic engineering with introduction of bacterial phytoene synthase gene *crtB*. *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 105, No. 6, 636-641.

- Fuentes P.** 2009. Efecto del desarrollo y la luz en los niveles de RNA mensajero de seis genes de la ruta carotenogénica en *Daucus carota* L. zanahoria. Seminario de título para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Gallagher C., Cervantes-Cervantes M., Wurtzel E.** 2003. Surrogate biochemistry: Use of *Escherichia coli* to identify plant cDNAs that impact metabolic engineering of carotenoid accumulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60** (6): 713-719.
- Giorio G, Stigliani A., D'Ambrosio C.** 2007. Agronomic performance and transcriptional analysis of carotenoid biosynthesis in fruits of transgenic HighCaro and control tomato lines under field conditions. *Transgenic Research* **16**: 15-28.
- Goodwin T.** 1980. The Biochemistry of the Carotenoids, Vol. 1. London: Annual Revision Plant Physiology Plant Molecular Biology **49**: 557-583.
- Hirschberg J.** 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 210-218.
- Howitt C., Pogson B.** 2006. Carotenoid accumulation and functions in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment* **29**: 435-445.
- Hornero D., Briton G.** 2002. Involvement of NADPH in the cyclization reaction of carotenoid biosynthesis. *European Journal of Biochemistry letters* **515** (1-3): 133-136.
- Horvitz M., Simon P. Tanumihardjo S.** 2004. Lycopene and b-carotene are bioavailable from lycopene red carrots in humans. *European Journal of Clinical Nutrition* **58**: 803-811.
- Huguenev P., Badillo A., Chen H., Klein A., Hirschberg J.** 1995. Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant Journal* **8**: 417-24.
- Jayaraj J., Devlin R., Punja Z.** 2007. Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants. *Transgenic Research* DOI 10.1007/s11248-007-9120-0.
- Just B., Santos C., Fonseca M., Boiteux L., Oloizia B. Simon P.** 2007. Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theory of Applied Genetics* **114**: 693-704.
- Kirk J., Tilney-Bassett R.** 1978. The Plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance, 2nd edn, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Krubasic P., Sandmann G.** 2000. Molecular evolution of lycopene ciclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochemical Society Transactions* Volume 28, part 6.
- Kuhlbrandt W., Wang D., Fujiyoshi Y.** 1994. Atomic model of light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature*, **367**: 614-621.
- Lichtenthaler H., Schwender J., Dish A., Rohmer M.** 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via mevalonate-independent pathway. *European Journal of Biochemistry letter* **400**: 271-274.

- Lindgren O., Stalberg K., Höglund A.** 2003. Seed-specific overexpression of an endogenous arabidopsis phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll, and abscisic acid. *Plant Physiology* **132**: 779-785 (2003).
- Lorenzo Y., Azqueta A., Luna L., Bonilla F., Domínguez G., Collins A.** 2009. The carotenoid b-cryptoxanthin stimulates the repair of DNA oxidation damage in addition to acting as an antioxidant in human cells. *Carcinogenesis* **30** (2): 308-314.
- Maass D., Arango J., Wüst F., Beyer P., Welsch R.** 2009. Carotenoid Crystal Formation in Arabidopsis and Carrot Roots Caused by Increased Phytoene Synthase Protein Levels. *PLoS ONE* **4**(7): e6373
- Milborrow B.** 2001. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **52** (359): 1145-1164.
- Misawa N., Masaya N., Kazuo K., Shigeyuki Y., Yuko I., Katsumi N., Keiji H.** 1990. Elucidation of Pathway the Erwinia uredovora Carotenoid Biosynthetic by Functional Analysis of Gene Products Expressed in Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, vol. 6704-6712.
- Nambara E., Marion-Poll A.** 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Revision in Plant Biology* **56**: 165-185.
- Niklitschek M., Alcaíno J., Barahona S., Sepúlveda D., Lozano C., Carmona M., Marcoleta A., Martínez C., Lodato P., Baeza M. Cifuentes V.** 2008. Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biological Research* **41**: 93-108.
- Niklitschek M.** 2008. Estudio genético molecular del gen *crtE* involucrado en la ruta de biosíntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis de Magíster en Ciencias biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Pecker I., Gabbay R., Cunningham F., Hirschberg J.** 1996. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Molecular Biology* **30**: 807-19.
- Peter G., Thornber J.** 1991. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem I1 light-harvesting pigment proteins. *Journal of Biology Chemistry*. **266**: 16745-16754.
- Pizarro L.** 2008. Estudio de la función del gen licopeno β -ciclase (*lcyb*) en la biosíntesis de carotenoides en *Daucus carota*. Tesis de Magíster en Ciencias biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Ronen G., Carmel G., Zamir D., Hirschberg J.** 2000. An alternative pathway in the β -carotene formation in plants chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, **97** (20): 11102-11107.
- Rock C., Zeevart J.** 1991. The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 7496-7499.

- Rosati C., Aquilani R., Dharmapuri S., Pallara P., Marusic C., Tavazza R., Bouvier F., Camara B., Guiliano G.** 2000. Metabolic engineering of β -carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant Journal*, **24** (3): 413-419.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Simon P., Wolff X.** 1987. Carotenes in Typical and Dark Orange Carrots. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 35, No. 6.
- Sriubolmas N., Panbangred W., Sriurairatana S., Meevootisom V.** 1997. Localization and characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 373-378.
- Stange C., Fuentes P., Handford M. Pizarro L.** 2008. *Daucus carota* as a novel model to evaluate the effect of light on carotenogenic gene expression. *Biol. Res.* **41**: 289-301.
- Studier F., Rosenberg A., Dunn J. Dubendorff J.** 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*, **185**: 60-89.
- Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A.** 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* **54**: 733-749.
- Thompson J., Higgins D., Gibson T.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Yamamoto H., Bassi R.** 1996. Carotenoids: localization and function. In *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, ed. DR Ort, CF Yocum, 539-563.
- Ye Z., Jiang J., Wu G.** 2008. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. JBA-06121, No of Pages 9.
- Young A.** 1993. In *Carotenoids in Photosynthesis* A. J. Young and G. Britton (Eds.), 161-205, Chapman and Hall, London (1993).