

UCH-FC  
Biotecnología  
S 785  
C.1



Escuela de Pregrado  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

**“Identificación de genes carotenogénicos, evaluación de su expresión y determinación de la composición de carotenoides en manzanos (*Malus domestica cv. Fuji*)”**

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

**Ariel Patricio Cerda Rojas**

Director de Seminario de Título: Dra. Claudia Stange

**Septiembre, 2013**

**Santiago de 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. ARIEL PATRICIO CERDA ROJAS** “**Identificación de genes carotenogénicos, evaluación de su expresión y determinación de la composición de carotenoides en manzanos (*Malus domestica cv. Fuji*)**” 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*  
**Directora Seminario de Título**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Claudia Stange', written over a horizontal line.

### **Comisión Evaluadora**

*Dra. Jennifer Alcaíno Gorman*  
**Presidente Comisión**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jennifer Alcaíno Gorman', written over a horizontal line.

*Dr. Michael Handford*  
**Evaluador**

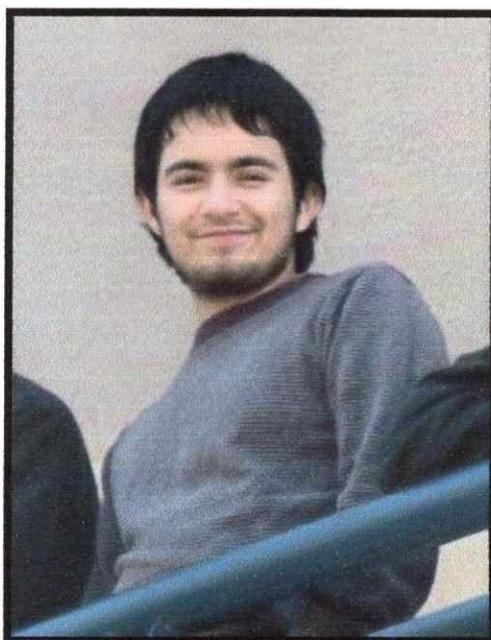
A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Michael Handford', written over a horizontal line.



Santiago de Chile, abril de 2013



*A mi Tata Lucho, mi Tío Ricardo y a Lucas.*



Nací exactamente 422 años después de que Pio V fuera nombrado papa, un día Jueves 7 de enero de 1988 en la clínica Juan Pablo II en pleno centro de la ciudad de San-Tiago. ¿Coincidencia? No lo creo, pues la gran parte de mi intelecto ha sido desarrollado sobre fuertes doctrinas religiosas y filosóficas.

Durante mi niñez cultive mi espíritu de amor y alegría gracias a mi familia, ellos son mi mayor sustento y mi admiración. Fueron innumerables los fines de semanas en Melipilla con mis tatas, primos y tíos, en los que obviamente, la moral y buenas costumbres se hicieron presentes y fueron fuente principal de aquellos elementos que hoy me describen tal cual soy. Todo marchó bien hasta que nació mi hermana Camila el año 91, esta fue la primera barrera que puso a prueba mi amor al prójimo. Sin embargo, con el tiempo y ayuda de mis padres, fui capaz de sobrellevar esta relación y hoy puedo decir que por muy demoniaca que sea una persona, el amor siempre prevalecerá.

Una vez que mi alma fue templada bajo aquellos preceptos bondadosos pero rigurosos, ingrese a educación básica en el Colegio Alcázar de Maipú. Viví duros días de hacinamiento con gente pecaminosa y hereje (Hoy en día aun ruego por la salvación de sus almas), pero mi mente estoica permaneció indemne. Sin embargo, debo confesar que durante mi estadía en tal establecimiento se hizo presente por primera vez Mefistófeles, en forma del fruto prohibido, conocido como conocimiento "científico". Sin embargo, como dice un viejo paper (afortunadamente libre de propiedad intelectual, pues ya han pasado más de 2000 años):

”וְנִחַמְנִי: הִמָּה וּמִשְׁעֲנֶנְתָּךְ שְׂבֻטָּךְ עַמְדִּי כִּי־אֵתֶּה רַע לֹא־אִירָא צְלֻמֹּת בְּגִיָּא כִּי־אֵלֶךְ גַּם”

O para los no-entendidos presentes:

“Aunque pase por el valle de sombra de muerte, No temeré mal alguno,  
porque Tú estás conmigo; Tu vara y Tu cayado me infunden aliento”

La presencia de aquella sombra se hizo aun más presente una vez que ingrese al primer foco de luz de la Nación (Instituto Nacional) el año 2000. En aquella institución peligrosamente “laica”, se me ofreció sin pudor alguno, seductoras corrientes oscuras como la evolución y la genética, entre otras. En resumen, conocimiento prohibido que aseguraba férreamente que Él no nos había creado precisamente y que veníamos del mono. Alrededor de estos años, también nació mi segunda hermana, la Nandí (o aquella malvada pelirroja sin alma y mi primer sujeto experimental) que nuevamente puso a prueba mi fe, pero como ya había aprendido la lección con Camila todo fue más fácil y armonioso

Fue alrededor del año 2004, que el llamado llegó en su forma definitiva. Ingrese al culto secreto del área científica y seguí tal programa en el Instituto. Poco a poco fui despojándome de mis antiguas creencias y me vestí del manto del verdadero conocimiento. En aquel proceso y lucha interna, siempre recibí apoyo de mi familia y amigos, es gracias a ellos que finalmente me decidí a seguir este difícil camino.

En el año 2007, y escapándome de las incoloras e insípidas ciencias físicas y matemáticas (y sobretodo del Síndrome de Beauchef), ingrese a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile para ser reclutado como mensajero celestial de la ciencia en IBM (no me hagan escribir un nombre tan largo). Durante mi estadía, poco a poco empecé a deslumbrarme de las maravillas que aquí experimente (Datos no mostrados). En aquel proceso de incubación prolongada en este sistema termodinámicamente abierto conocí a aquella mujer que revolucionaria entrópicamente mi vida, la Poli. Mezclando ambos sujetos durante 1 noche (por obra y gracia del Espíritu Santo), y luego de 9 meses de incubación precipitó estruendosamente en mi vida el Rena (Mi guatón precioso y mi segundo sujeto experimental). Ambos dos juntos son mi maravillosa familia y mi alegría (y creación) máxima.

A pesar de este difícil camino en el que un hombre fue instruido y criado bajo el alero de una creencia completamente opuesta a la que rigió durante la otra mitad de mi vida, hoy en día puedo decir orgullosamente que he llegado a crear un concepto que reconcilia ambas Ciencias. A mí me gusta llamarla Ciencia religiosa o ReliCiencia®.

## AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradecer a todo el team CSK, pues gracias a ellos he aprendido no sólo en lo que respecta a mi formación, sino que también en todo lo relacionado a la convivencia y trabajo en equipo. Gracias también por su amistad.

Gracias a aquellos que permiten el funcionamiento de este gran número de científicos bajo el mismo techo. Gracias Ange, Seba, Profe Claudia, Mike, Lorena y Liliana

Gracias a todas las increíbles personas que conocí en el Lab, sobre todo a aquellas personas con las que establecí un vínculo que trascendió el estricto labor profesional.

Gracias a los amigos de la vida, que soportaron tanto sin sentidos en un record increíble de tiempo; Javier, Boris, Felipe, Mati, Talo, Rolo, Juanjo, Chilo, Pauli, Aliosha, Joel, Marcelo, Raúl, Pablo, Kevin, Tito, Koke, Marcos, Moira, Nicole, Panchi, Bea, Clío, Caty, Hernan, Isma, Vale, Maca y Mauro.

Gracias a mi gran familia melipillana, ustedes me han entregado una cantidad increíble de amor y todo lo que hoy soy se los debo a Uds. Gracias Tatas, Tíos y Primos

Gracias a aquellas personas que ya no se encuentran aquí, y que fueron de los principales gestores de curiosidad científica en mí; Tata Lucho, Tío Ricardo y Lucas.

Gracias a mis Viejos. Si no fuera por sus consejos y amor incondicional no sería tan plenamente feliz como lo soy. Gracias a su apoyo tome este camino.

A mis hermanas Cami y Nandi, por las increíbles aventuras juntos. Por el cariño que me entregan y por ser mis primeras amigas y compañeras de juegos.

A mi Polilla, por ser mi complemento, mi mejor amiga, mi compañera y la mejor madre que pudiera haber soñado para mi hijo. Gracias por tu comprensión y ayuda en este proceso. Junto a ti fue fácil formar esta linda familia.

A mi Rena, porque eres el mejor hijo del mundo. Estar junto a ti me ha llenado de alegría y motivación para seguir cuando todo se ve más difícil. Con tu sonrisa y la de tu madre es imposible ser infeliz.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>BIOGRAFÍA.....</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>v</b>
<b>INDICE DE TABLAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Carotenoides: Estructura y Función. ....	1
1.2 Biosíntesis de Carotenoides en plantas. ....	4
1.3 Regulación de la Biosíntesis de Carotenoides en Plantas.....	8
1.4 Función y Contenido de Carotenoides en Frutos. ....	11
1.5 Carotenogénesis en <i>Malus domestica</i> . ....	13
1.6 Objetivos.....	16
1.6.1 Objetivo General.....	16
1.6.2 Objetivos Específicos. ....	16
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
2.1 Materiales Biológicos. ....	17
2.2 Reactivos.....	18
2.3 Partidores.....	18
2.4 Metodología.....	20
2.4.1 Análisis Bioinformáticos.....	21
2.4.2 Extracción de ARN Total de Tejidos de Manzano.....	23
2.4.3 Cuantificación y Análisis de Calidad del ARN Total. ....	25
2.4.4 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	26
2.4.5 Síntesis y Análisis del ADNc de <i>M.domestica</i> .....	26
2.4.6 PCR Cuantitativo en Tiempo Real. ....	28
2.4.7 Determinación de la Concentración de Carotenoides. ....	31
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
3.1 Identificar mediante Análisis <i>in silico</i> los Genes que Codifiquen Probablemente las Enzimas Fitoeno Sintasa (PSY), Fitoeno Desaturasa (PDS) y Licopeno $\beta$ -ciclase (LCYB) de <i>M. domestica</i> .....	35

3.1.1 Obtención y Análisis de la Posible Secuencia Nucleotídica de los Genes Carotenogénicos <i>Psy</i> , <i>Pds</i> y <i>Lcyb</i> .	35
3.1.2 Análisis de la Secuencia Aminoacídica de las Enzimas PSY, PDS y LCYB.	40
3.2 Evaluación de la Expresión de los Genes <i>Psy</i> , <i>Pds</i> y <i>Lcyb</i> en Frutos y en Hojas de <i>M. domestica</i> cv. <i>Fuji</i> .	46
3.2.1 Extracción de ARN Total a partir de Tejidos de <i>M. domestica</i>	46
3.2.2. Análisis de Expresión de los Genes <i>Psy</i> , <i>Pds</i> y <i>Lcyb</i> en Frutos Maduros y Hojas de <i>M. domestica</i> .	48
3.2.3. Análisis de Expresión de los Genes <i>Psy</i> , <i>Pds</i> y <i>Lcyb</i> en distintos Estadios de Desarrollo del Fruto de <i>M.domestica</i> .	51
3.3 Determinación del Contenido de Pigmentos Carotenoides en Frutos de <i>M.domestica</i> .	55
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
4.1 Identificación de las Secuencias Nucleotídicas de los Genes <i>Psy</i> , <i>Pds</i> y <i>Lcyb</i> en <i>M. domestica</i> .	57
4.2 Expresión de los Genes <i>Psy</i> , <i>Pds</i> y <i>Lcyb</i> en Frutos y Hojas de <i>M.domestica</i> .	60
4.3 Contenido de Carotenoides y Expresión de Genes Carotenogénicos durante la Maduración del Fruto en <i>M.domestica</i> .	62
4.4 Carotenogénesis en Frutos de <i>M. Domestica</i> .	65
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>68</b>
<b>6. PROYECCIONES</b>	<b>69</b>
<b>7. REFERENCIAS</b>	<b>70</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>78</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I:</b> Contenido de carotenoides totales y específicos de distintos alimentos.....	12
<b>Tabla II:</b> Partidores utilizados en este Seminario de Titulo .....	19
<b>Tabla III:</b> Programas de PCR utilizadas en este Seminario de Titulo.....	30
<b>Tabla IV:</b> Posibles genes codificantes para las enzimas de la vía de síntesis de carotenoides (PSY, PDS y LCYB) suministrada por GDR .....	36
<b>Tabla V:</b> Posibles genes carotenogénicos identificados mediante ensamblaje de EST .....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas.....	5
<b>Figura 2</b> Espectro de absorción de los pigmentos clorofila <i>a</i> , <i>b</i> y carotenoides.....	33
<b>Figura 3</b> Estructura de los genes identificados mediante ensamblaje de EST. ....	39
<b>Figura 4</b> Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de distintas enzimas codificadas por genes <i>Psy</i> .....	41
<b>Figura 5</b> Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de distintas enzimas codificadas por genes <i>Pds</i> .....	42
<b>Figura 6</b> Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de distintas enzimas codificadas por genes <i>Lcyb</i> . ....	43
<b>Figura 7</b> Análisis filogenético de las enzimas PSY y LCYB putativas de <i>M.domestica</i> . ....	45
<b>Figura 8</b> Estadios de desarrollo del fruto utilizados en el análisis de expresión génica y composición de carotenoides. ....	47
<b>Figura 9</b> Amplificación del gen <i>actina</i> desde ADNc de hojas y frutos en distintos estadios de desarrollo. ....	48
<b>Figura 10</b> Niveles de expresión de los distintos genes <i>Psy</i> , <i>Pds</i> y <i>Lcyb</i> de <i>M. domestica</i> en hojas y frutos maduros. ....	50
<b>Figura 11</b> Expresión relativa de los transcritos de los genes <i>Psy</i> , <i>Pds</i> y <i>Lcyb</i> en diferentes tejidos de <i>M. domestica</i> . ....	51
<b>Figura 12</b> Niveles de expresión relativa de los genes <i>Psy</i> , <i>Pds</i> y <i>Lcyb</i> de <i>M. domestica</i> durante la maduración del fruto. ....	53
<b>Figura 13</b> Expresión relativa de los transcritos de los genes <i>Psy</i> , <i>Pds</i> y <i>Lcyb</i> durante el desarrollo de frutos de <i>M. domestica</i> . ....	54
<b>Figura 14</b> Concentración de pigmentos en distintos estadios de desarrollo de frutos de <i>M.domestica</i> .....	56



## LISTA DE ABREVIATURAS

- 3' UTR : Region no traducible en el extremo 3'
- 5' UTR : Región no traducible en el extremo 5'
- ABA : Ácido Abscísico
- ARNm : Ácido ribonucleico mensajero
- BLAST : Herramienta de alineamiento básico local
- ADNc : Ácido desoxiribonucleico complementario
- CTAB : Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- DEPC : Dietilpirocarbonato
- DNasa : Desoxi-ribonucleasa
- dNTP : Desoxinucleótido trifosfato
- dpa : Días post-antesis
- EST : Marcador de secuencia expresada
- GDR : Base de datos de genomas de *Rosaceae*
- Kb : Kilobase
- LCYB : Licopeno  $\beta$ -ciclasa
- ORF : Marco de lectura abierto
- pb : Pares de bases
- PCR : Reacción en cadena de la Polimerasa
- PDS : Fitoeno desaturasa
- PSY : Fitoeno síntasa
- RNasa : Ribonucleasa
- RP-HPLC : Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
- RT : Transcripción Reversa o transcriptasa reversa
- RT-qPCR : PCR cuantitativo en tiempo real

## RESUMEN

Los carotenoides son compuestos presentes en todas las plantas y algunas bacterias, hongos y algas. En plantas estos se localizan en plastidios y poseen un rol crítico en los complejos cosechadores de luz, fotoprotección y biosíntesis de fitohormonas. Los carotenoides también proveen el color a frutas y flores funcionando principalmente como atrayentes de agentes polinizadores y dispersores de semillas. También, han sido reconocidos como nutrientes necesarios en la dieta humana debido a que son precursores de la vitamina A y poseen un alto poder antioxidante. Estos antecedentes y estudios que asocian su consumo con protección frente a una serie de enfermedades humanas, han incrementado el interés en generar nuevas variedades vegetales capaces de producir altos niveles de carotenoides a través de ingeniería genética. El manzano (*Malus domestica*) corresponde a uno de los árboles frutales más cultivado a nivel mundial, esto principalmente a que su fruto posee un alto valor nutricional debido a su contenido en fibra, flavonoides y vitamina C. Estas características hacen de las manzanas una excelente alternativa para incrementar su contenido de carotenoides, sin embargo, existe escasa información disponible sobre la biosíntesis de carotenoides en *M. domestica*. Para solucionar este problema y entender la regulación de la ruta carotenogénica en manzano, en este trabajo se evaluó la composición de carotenoides y la expresión génica de diversos genes esenciales en la síntesis de carotenoides (*Psy*, *Pds* y *Lcyb*) en hojas y distintos estadios de maduración de manzanas Fuji. Utilizando bases de datos de EST y el borrador del genoma de *M. domestica*, se identificaron 4 genes *Psy*, 1 gen *Pds* y 2 genes *Lcyb*. Sus patrones de expresión evaluados por PCR en tiempo real en hojas y frutos de distintos estadios de maduración, revelaron que existe una regulación diferencial tanto en los tejidos evaluados como durante la maduración

del fruto. Especialmente durante la maduración del fruto *Pds*, *Psy1*, *Lcyb1* y *Lcyb2*, parecieran no variar respecto a su expresión. Por otro lado, la expresión del gen *Psy3* posee una correlación positiva con la maduración del fruto, mientras que *Psy2* y en menor medida *Psy4* poseen una correlación negativa. Además al evaluar la composición de pigmentos en hipanto de manzanas se observó un aumento progresivo de carotenoides (especialmente  $\beta$ -caroteno) durante la maduración del fruto, sin embargo, la concentración total de carotenoides en hipanto de manzanas es particularmente baja (6  $\mu\text{g/g}$  de peso seco). La regulación de los genes *Psy* puede dar cuenta de una posible explicación al bajo contenido carotenogénico presente en el hipanto de la manzana y al mismo tiempo la información expuesta en este trabajo será muy útil a la hora de escoger futuros candidatos para el aumento del contenido de carotenoides en el hipanto de frutos de manzano.

## ABSTRACT

Carotenoids are compounds present in plants, some bacteria, fungi, and algae. Plant carotenoids are located in plastids, playing a critical role in light harvesting, photoprotection and phytohormones biosynthesis. Carotenoids also provide fruit and flower coloring, acting as attractants to pollinators and seed dispersal agents. Also, these pigments have been recognized as necessary nutrients, acting as vitamin-A precursors and antioxidants in humans. These antecedents and studies associating their consumption with protection against some human diseases have increased the interest to generate new plant varieties able to produce high levels of carotenoids through genetic engineering. Apples (*Malus domestica*) are one of the most widely cultivated fruits, mainly because of its high nutritional value, including high fiber, flavonoids and vitamin C content. These characteristics make apples an excellent alternative to increase their carotenoid content, however, there is little information available about carotenogenic gene expression and carotenoid content in *M. domestica*. To overcome this issue and to understand the regulation of the apple carotenoid pathway, the carotenoid composition and expression of essential carotenogenic genes (*Psy*, *Pds* and *Lcyb*) was evaluated in apple cv. Fuji. In this work, we identified 4 *Psy*, 1 *Pds* and 2 *Lcyb* essential genes by using apple EST databases and genome sequence. Their expression patterns, assayed by quantitative RT-PCR in leaf and different fruit stages, indicate there is a tissue and developmental differential regulation of these genes. In particular during fruit maturation, the gene expression levels of *Pds*, *Psy1*, *Lcyb1* and *Lcyb2* remain unchanged. However, *Psy3* expression has a positive correlation with fruit maturation, whereas *Psy2* and, in a lesser extent, *Psy4* have a negative correlation. In addition, pigment composition was evaluated in fruit hypanthium and a progressive increase in carotenoids (especially  $\beta$ -carotene)

during fruit ripening was observed, however, the total concentration of carotenoids in this tissue is particularly low (6  $\mu\text{g/g}$  dry weight). In conclusion, *Psy* gene regulation may account for a possible explanation to the low carotenoid content in apple hypanthium, while the information presented in this work will be very useful when selecting future candidates to increase carotenoid content in apple fruits.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Carotenoides: Estructura y Función.

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides de naturaleza lipofílica que son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos (plantas, algas y cianobacterias) y algunas bacterias y hongos no fotosintéticos (Walter y Strack, 2011). Su estructura consta de 8 unidades isoprénicas unidas en sus extremos, constituyendo en su mayoría polienos de 40 carbonos. Ésta determina la existencia de un sistema de dobles enlaces conjugados que les confieren la propiedad de actuar como cromóforos, vale decir, moléculas capaces de absorber luz y generar color.

Respecto a su abundancia, corresponden al segundo grupo de pigmentos más abundantes en la naturaleza y en la actualidad se han descrito más de 700 carotenoides distintos (Giorio y col., 2007). Dentro de ellos se distinguen dos grandes grupos: aquellos constituidos solo por átomos de carbono e hidrogeno denominados carotenos y aquellos que poseen adicionalmente átomos de oxígeno en su esqueleto hidrocarbonado, denominados xantófilas (Bhosale y Bernstein, 2005).

En plantas y algas, los carotenoides son sintetizados y acumulados al interior de plastidios, principalmente en cloroplastos y cromoplastos (Cunningham y Gantt, 1998). En los cloroplastos, los carotenoides en conjunto con clorofilas, se localizan en las membranas tilacoidales y constituyen componentes esenciales de la maquinaria fotosintética, donde están involucrados en el ensamblaje de los fotosistemas y juegan un papel importante en la captación de la luz (Howitt y Pogson, 2006). Por otro lado, estos pigmentos también pueden ser localizados en cuerpos lipídicos o estructuras cristalinas ubicadas al interior de cromoplastos presentes en flores, frutas y raíces

modificadas (Howitt y Pogson, 2006; Ampomah-Dwamena y col., 2009; Maass y col., 2009).

El papel fisiológico que ejercen estos compuestos en plantas es muy amplio. En plastidios estos actúan como pigmentos accesorios en los complejos cosechadores de luz, en los cuales absorben luz de la región azul y parte de la región verde del espectro visible (450-570 nm), transfiriendo posteriormente la energía absorbida a las clorofilas durante el proceso de la fotosíntesis (Ritz y col., 2000; Koyama y col., 2004; Dall'Osto y col., 2006; Stange y Flores, 2012). Por otro lado, los carotenoides ejercen un rol crítico como moléculas fotoprotectoras, previniendo el daño fotooxidativo provocado por moléculas derivadas del exceso nocivo de energía durante la fotosíntesis como el oxígeno singlete o la clorofila triplete (Woodall y col., 1997; Howitt y Pogson, 2006) y disipando la energía térmica a través del ciclo de las xantófilas (Dall'Osto y col., 2007; Kim y col., 2009). Además, los carotenoides corresponden a precursores en la biosíntesis de ácido abscísico (ABA) y estrigolactonas, importantes fitohormonas para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Cazzonelli y Pogson, 2010). El ABA está involucrado en la dormancia de semillas, maduración y diferenciación de células vegetales embrionarias, regulación de la apertura estomática y tolerancia a estrés abiótico (North y col., 2007; Barrero y col., 2008; Galpaz y col., 2008), mientras que las estrigolactonas están involucradas en el establecimiento de relaciones simbióticas con micorrizas, estimulación de la germinación de plantas parasíticas y la inhibición de las ramificaciones de los brotes (Akiyama y col., 2010; Xie y Yoneyama, 2010; Yoneyama y col., 2010). Finalmente y por su característica de otorgar colores rojos, naranjos y amarillos a distintos órganos de las plantas (principalmente flores y frutos), facilitan la polinización y dispersión de semillas (Grotewold, 2006; Howitt y Pogson, 2006).

Respecto a los animales y salvo unas pocas excepciones (Moran y Jarvik, 2010; Altincicek y col., 2012), éstos son incapaces de sintetizar carotenoides, por lo que deben adquirirlos a través del consumo de alimentos vegetales en la dieta. Su importancia en animales radica principalmente en que algunos carotenoides ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, criptoxantina) son precursores de la vitamina A (Yeum y Russell, 2002), la cual es esencial para el buen funcionamiento de la visión, respuesta inmune, reproducción y desarrollo embrionario, metabolismo de los huesos, hematopoyesis, mantención de la piel y mucosas (Fraser y Bramley, 2004; Krinsky y Johnson, 2005; Zhao y col., 2006; Cazzonelli y Pogson, 2010; Wan y col., 2012). También ejercen en animales un rol como antioxidantes, previniendo enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer y enfermedades degenerativas relacionadas con el envejecimiento (Collins, 1999; Hadley y col., 2002; Bone y Landrum, 2010; Misawa, 2011). Por esta razón, los carotenoides se utilizan como suplemento en formulaciones alimenticias animales y humanas, e incluso como colorantes naturales en la industria alimenticia y cosmética (Umeno y col., 2005).

Debido a la importancia de los carotenoides tanto para plantas como animales, en las últimas décadas se ha dedicado un esfuerzo considerable en determinar los mecanismos regulatorios que subyacen a la biosíntesis de estos pigmentos. Los avances dentro de esta área de estudio, y especialmente en plantas, han permitido el descubrimiento y caracterización de la mayoría de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis de los carotenoides (Howitt y Pogson, 2006). Además, se han llevado a cabo un sinnúmero de experimentos cuyo fin último corresponde al aumento en los niveles de carotenoides a través de la sobreexpresión de los genes involucrados en su

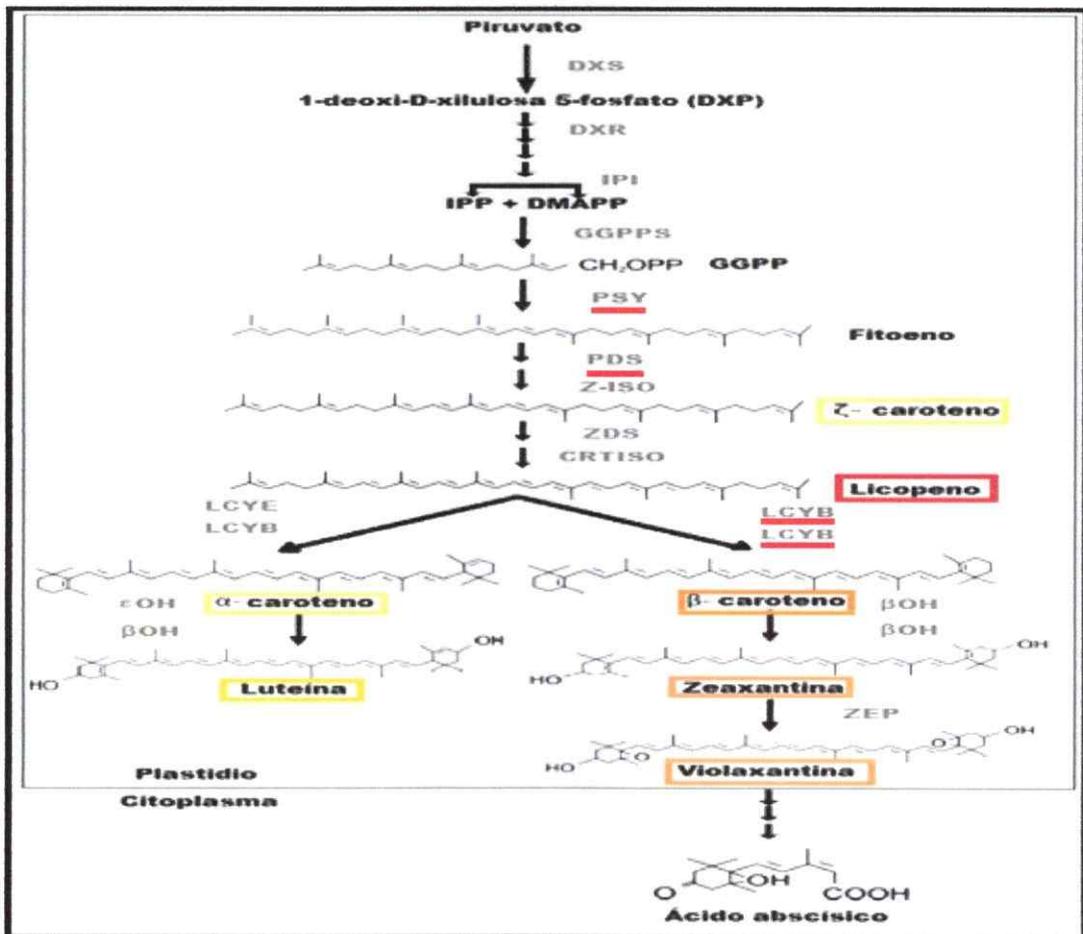
biosíntesis en distintas especies vegetales (Shewmaker y col., 1999; Mann y col., 2000; Beyer y col., 2002; Diretto y col., 2007; Aluru y col., 2008).

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

En plantas superiores, la ruta de biosíntesis de carotenoides se encuentra altamente conservada y la mayoría de los genes involucrados junto con sus respectivas enzimas codificadas, ya han sido descritos (Cunningham y Gantt, 1998). Estos genes están localizados en el genoma nuclear y una vez que el gen es transcrito y posteriormente traducido, las proteínas son destinadas a plastidios en forma de pre-proteínas.

Una característica común a todos los isoprenoides, es que se sintetizan a partir de prenil pirofosfatos como el isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero, el dimetilil pirofosfato (DMAPP). En células vegetales existen dos vías independientes para la formación de estos precursores carotenogénicos, sin embargo, los carotenoides son principalmente sintetizados a partir del IPP y DMAPP producidos por la ruta plastidial del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato o MEP (Rodríguez-Concepción, 2010). En esta ruta ocurre la condensación del piruvato con el gliceraldehido 3-fosfato, para dar lugar al 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP) por medio de la enzima DXP sintasa (DXS), seguido de una reacción catalizada por la enzima DXP reductoisomerasa (DXR) y una cascada de otras reacciones que llevan finalmente a la síntesis de IPP y DMAPP (Rodríguez-Concepción y col., 2001; Carretero-Paulet y col., 2006). La condensación de 3 moléculas de IPP con DMAPP da lugar a un precursor de muchos isoprenoides plastidiales incluyendo los carotenoides, el geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) y cuya síntesis es catalizada por la enzima GGPP sintasa (GGPPS) (Lichtenthaler, 1999; Bouvier y col., 2005). El primer paso que da origen a un carotenoide en la ruta, es la

generación de una molécula de 40 carbonos denominada fitoeno a partir de la condensación de dos moléculas de GGPP (Figura 1). Esta reacción es catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY) y es considerada el principal paso limitante en la ruta de biosíntesis de carotenoides (Hirschberg, 2001; Fraser y Bramley, 2004; Cazzonelli y Pogson, 2010).



**Figura 1.-Ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas.** Diagrama que indica las enzimas (gris) y principales productos de la biosíntesis de carotenoides en plantas. Además se indica el color del metabolito cuando corresponde (rectángulos coloreados en productos) y las enzimas en las que se enfoca este estudio (subrayadas en rojo). **DXS**: 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa, **DXP**: 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa, **IPI**: isopentenil pirofosfato isomerasa, **GGPPS**: geranilgeranil pirofosfato sintasa, **PSY**: fitoeno sintasa, **PDS**: fitoeno desaturasa, **Z-ISO**: ζ-caroteno isomerasa, **ZDS**: ζ-caroteno desaturasa, **CRTISO**: caroteno isomerasa, **LCYE**: licopeno ε-ciclaza, **LCYB**: licopeno β-ciclaza, **βOH**: β-caroteno hidroxilasa, **εOH**: ε-caroteno hidroxilasa y **ZEP**: zeaxantina epoxidasa.

Posteriormente, el fitoeno es desaturado para dar origen al cromóforo con dobles enlaces conjugados que forma la estructura base de los carotenoides vegetales (Figura 1) y que determina las propiedades fisicoquímicas y biológicas características de este grupo de pigmentos (Britton, 1995). Es así como el fitoeno, un compuesto incoloro, tras ser sometido a una serie de 4 desaturaciones y 2 isomerizaciones, es transformado en licopeno: un carotenoide de coloración rojiza. Estas desaturaciones son catalizadas por las enzimas fitoeno desaturasa (PDS) y  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS), dando lugar en forma secuencial al fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno, neurosporeno y finalmente licopeno (Cunningham y Gantt, 1998). Adicionalmente, estas moléculas sufren isomerizaciones catalizadas por las enzimas  $\zeta$ -caroteno isomerasa (Z-ISO) y caroteno isomerasa (CRTISO), las que permitirán finalmente la formación de all-trans-licopeno, configuración estable requerida para las reacciones subsiguientes. A continuación, el licopeno sufre ciclaciones a ambos extremos de su cadena, representando este suceso el primer punto de ramificación en la ruta de biosíntesis de carotenoides. Por un lado se forma  $\alpha$ -caroteno, el cual presenta un anillo  $\epsilon$  en un extremo y un anillo  $\beta$  en el otro y cuya síntesis es catalizada por las enzimas licopeno  $\epsilon$ -ciclaza (LCYE) y licopeno  $\beta$ -ciclaza (LCYB), respectivamente. Mientras que por la otra vía de la ruta, se forma  $\beta$ -caroteno, molécula con 2 anillos  $\beta$ , uno en cada extremo, y cuya síntesis es catalizada de forma única por la enzima LCYB. La hidroxilación de los anillos de los carotenos genera las xantófilas como la luteína (formada a partir del  $\alpha$ -caroteno) y la zeaxantina (formada a partir del  $\beta$ -caroteno). En el caso de la formación de luteína participan las enzimas  $\epsilon$ -hidroxilasa ( $\epsilon$ OH) y  $\beta$ -hidroxilasa ( $\beta$ OH), mientras que en la síntesis de zeaxantina solo participa la  $\beta$ OH. La zeaxantina puede ser epoxidada dos veces por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP) para formar violaxantina, la cual posteriormente puede ser modificada para dar origen finalmente a

la fitohormona ácido abscísico (ABA). Tanto carotenos como xantofilas pueden ser modificados a posterioridad para dar lugar a la gran diversidad de carotenoides encontrados en plantas y otros organismos (Walter y Strack, 2011). Por ejemplo, la degradación de los carotenoides genera apocarotenoides, una clase de compuestos muy variable estructuralmente y entre los que se encuentran compuestos biológicamente activos como el ABA y las estrigolactonas (Auldridge y col., 2006; Yoneyama y col., 2010).

Respecto a las enzimas que participan en la biosíntesis de carotenoides en plantas se ha postulado que estas son parte de un complejo multi-enzimático que estaría asociado a la membrana de plastidios, explicando de esta manera por qué muchas de las enzimas de la ruta necesitan de un contexto de membrana para ejercer su actividad (Lopez y col., 2008). Se han propuesto diversos modelos que integran datos de diversas fuentes como; evidencia bioquímica de algunas enzimas carotenogénicas asociadas a membranas plastidiales (Fraser y col., 2000), localización de enzimas de la ruta basada en ensayos de proteómica (Joyard y col., 2009), análisis de datos de co-expresión y mutantes que sugieren la participación de ciertas enzimas en ramas específicas de la ruta carotenogénica (Kim y col., 2010; Meier y col., 2011) y modelos previos que proponen la existencia de complejos multi-enzimáticos que permitirían la formación de carotenos cíclicos o luteína mediante canalización de sustratos (Cunningham y Gantt, 1998; Kim y DellaPenna, 2006; Bai y col., 2009). Según estos datos se propone entonces la existencia de complejos proteicos asociados parcialmente a membranas plastidiales como; el que transforma IPP y DMAPP a fitoeno (compuesto por las enzimas IPI, GGPPS y PSY), fitoeno en licopeno (PDS, Z-

ISO, ZDS y CRTISO), fitoeno en  $\beta$ -caroteno (PDS, Z-ISO, ZDS, CRTISO y LCYB) y licopeno en luteína (LCYE y LCYB)(Kim y DellaPenna, 2006; Bai y col., 2009).

### **1.3 Regulación de la Biosíntesis de Carotenoides en Plantas.**

La regulación de la biosíntesis de carotenoides en plantas es altamente compleja e incluye un sinnúmero de factores interrelacionados. Entre estos factores son de relevancia, las interconexiones con otras rutas metabólicas relacionadas, el tipo y morfología del plastidio en el que se acumulan, el estadio de desarrollo en el que se encuentra la planta y los estímulos medioambientales que recibe. Además, la regulación en la ruta puede ser tanto a nivel transcripcional como post-traducciona (Howitt y Pogson, 2006; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012).

La regulación transcripcional de la ruta carotenogénica corresponde al primer punto de control en la acumulación de estos pigmentos en plantas. Este tipo de regulación, controla la expresión de los genes carotenogénicos mediante el desarrollo, luz, ciclo circadiano, retroalimentación mediada por ABA y por mecanismos epigenéticos (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012).

En primera instancia, se ha propuesto que la producción de carotenoides se regula a través del ciclo de vida de una planta por una interacción dinámica entre el desarrollo y los estímulos medioambientales externos que recibe (Hannoufa y Hossain, 2012). Uno de los mejores modelos de estudio para demostrar esta relación corresponde al caso de la maduración de frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*), ya que la biosíntesis de carotenoides en tomate está regulada por el desarrollo, pero también fuertemente influenciada por cambios en la luz y temperatura, estímulos que se integran para determinar el nivel de transcripción de los genes carotenogénicos. Es así como previamente a la acumulación de carotenoides, aumentan los niveles de

transcrito de los genes *Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Crtiso* y *Z-iso*, mientras que disminuyen los niveles de *Lcyb* y *Lcye* (Fraser y col., 1994; Lois y col., 2000; Alba y col., 2005). Esta regulación finalmente determina que un fruto maduro verde con una composición de carotenoides similar a la de una hoja se convierta en un fruto rojo con una acumulación masiva de carotenoides, particularmente licopeno (Giovannoni, 2001). Este tipo de regulación parece ser el mecanismo principal de regulación de la biosíntesis de carotenoides en la mayoría de los órganos vegetales que poseen cromoplastos como flores y frutos (Moehs y col., 2001; Kato y col., 2004; Skelton y col., 2006; Kita y col., 2007).

El principal estímulo medioambiental externo al cual responde la ruta carotenogénica corresponde a la luz y posee un rol importante tanto en la transición de etioplastos a cloroplastos (de-etiolación) como en el desarrollo de frutos y flores (Romer y Fraser, 2005; Rodríguez-Villalón y col., 2009). En general se ha establecido que la luz es captada por diversos fotoreceptores como los fitocromos y criptocromos, y este estímulo procesado ejerce un efecto positivo sobre la expresión de los genes carotenogénicos (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Respecto a esto se ha demostrado que en *Arabidopsis thaliana* y *Sinapsis alba* (mostaza) los niveles de transcrito del gen *Psy* aumentan por efecto de la luz (von Lintig y col., 1997). Por otro lado, en tabaco (*Nicotiana tabacum*) frente a exposición de luz roja y blanca continua se ha reportado una inducción de los genes *Psy*,  $\beta OH$ , *Zep* (Woitsch y Romer, 2003). Recientemente, en zanahoria (*Daucus carota*) se han identificado diversas cajas regulatorias en promotores de genes carotenogénicos que responden a fitohormonas y luz. Además, experimentalmente se ha demostrado que la luz inhibe el desarrollo de la raíz de reserva de la zanahoria y la transición de leucoplastos a cromoplastos en este

órgano. La luz también altera la expresión de la mayoría de los genes implicados en la síntesis de carotenoides en *D.carota* (Fuentes, 2011).

Por otro lado, el ciclo circadiano, mecanismo que produce ciclos de 24 horas autosustentables que permiten la anticipación de la planta al día y la noche, también juega un papel importante en la regulación de la biosíntesis de carotenoides (Millar, 2004; Gardner y col., 2006). Es así como diversos estudios han mostrado que los genes carotenogénicos están regulados por el ciclo circadiano, y esta regulación en general permite un aumento en la transcripción de estos genes alrededor del amanecer (Thompson y col., 2000; Woitsch y Romer, 2003; Covington y col., 2008; Facella y col., 2008; Cordoba y col., 2009). También se ha descrito una retroalimentación positiva por ABA, ya que bajo ciertas condiciones de estrés abiótico que requieren una producción activa de ABA, un incremento en la actividad PSY puede proveer de los precursores carotenogénicos necesarios para la producción suficiente de ABA (Li y col., 2008; Welsch y col., 2008; Arango y col., 2010). Es así como en algunas raíces vegetales ciertos isogenes de *Psy* (muchos genes carotenogénicos poseen redundancia génica especializada) no responden transcripcionalmente a la luz, sino más bien a estrés abiótico (osmótico principalmente) y específicamente a ABA (Li y col., 2008; Welsch y col., 2008; Meier y col., 2011). Recientemente, se ha descrito que existen mecanismos regulatorios epigenéticos controlando la expresión de los genes carotenogénicos, y los escasos estudios realizados apuntan a la regulación del gen *Crtiso1* de *A.thaliana* por la acción de enzimas histona metiltransferasas (Cazzonelli y col., 2010).

A pesar de que la regulación transcripcional de los genes carotenogénicos puede explicar parte de la biosíntesis de los carotenoides, sólo los mecanismos post-traduccionales pueden explicar la baja correlación entre patrones de expresión génica

y la acumulación de estos pigmentos en algunos modelos vegetales. Estos mecanismos comprenden principalmente; la modulación de los niveles y actividades enzimáticas, canalización de sustratos por complejos multienzimáticos, equilibrio síntesis/degradación y capacidad de secuestro y almacenaje (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Este último es uno de los más importantes en el caso de flores y frutos, ya que el tipo de plastidio donde ocurra la síntesis posee efectos considerablemente significativos en la capacidad de acumulación de carotenoides (Deruere y col., 1994; Vishnevetsky y col., 1999; Simkin y col., 2007). En el caso particular de cromoplastos, los carotenoides se encuentran en forma de plastoglóbulos o cristales que confieren mayor estabilidad frente a la degradación lumínica (Merzlyak y Solovchenko, 2002). Finalmente el equilibrio entre degradación y síntesis también parece ser un factor determinante en la acumulación de carotenoides ya que éstos se pueden degradar tanto por fotooxidación no enzimática como por oxidación enzimática (Walter y Strack, 2011).

#### **1.4 Función y Contenido de Carotenoides en Frutos.**

Los frutos maduros, flores y raíces modificadas se caracterizan por poseer cromoplastos capaces de almacenar grandes cantidades de carotenoides (Howitt y Pogson, 2006). La composición de carotenoides en estos tejidos por lo tanto está dada por la cantidad de carotenoides al interior de los cromoplastos y varía ampliamente entre frutos y raíces de distintas especies vegetales (Tabla I). En los frutos, estos pigmentos contribuyen a la polinización y dispersión de las semillas, no obstante, también participan como precursores de apocarotenoides, moléculas terpenoides de función fotoprotectoras y odoríferas (Howitt y Pogson, 2006).

**Tabla I.- Contenido de carotenoides totales y específicos de distintos alimentos ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de peso fresco)\***

Alimento	Carotenoides totales	$\beta$ -caroteno	$\alpha$ -caroteno	Luteína
Naranja	280	51	16	187
Frutilla	80	7	5	26
Pimentón rojo	2800-3800	2359	59	-
Pimentón verde	265	198	22	-
Piña	150-180	31-35	30	-
Plátano	141	21	5	-
Zanahoria	4730-18250	8836	4600	-
Tomate	640-1300	393	112	130
Papa	50-100	6	-	-
Uva	90-180	14	5-8	13
Mango	1113-1660	445	17	-
Sandía	300-1300	295	-	17
Melón	630-5139	30-1595	15-27	27
Pera	430	27	6	17
Papaya	790-1610	374	-	75

**\*Modificado de Holden (1999)**

Entre las especies de consumo frecuente que destacan por su contenido de carotenoides totales destacan; el tomate (*S. lycopersicum*), zanahoria (*D. carota*), pimentón rojo (*Capsicum annuum*) y mango (*Mangifera indica*). En tomates el carotenoide predominante es el licopeno, mientras que en el resto de las plantas mencionadas suele ser el  $\beta$ -caroteno (Ben-Amotz y Fishier, 1998; Fuentes y col., 2012; Rodríguez-Uribe y col., 2012; Sogi y col., 2012). La modificación estructural de los cromoplastos da origen a cambios en los tipos y niveles de carotenoides, inclusive entre individuos de la misma especie. Por ejemplo, en mango los carotenoides preponderantes corresponden al  $\beta$ -caroteno y violaxantina, sin embargo, la composición de carotenoides en mango variará según una serie de factores que incluye el tipo de cultivar, clima y zona de cultivo, el estadio de maduración e incluso las condiciones en las cual se almacena y procesa el fruto antes de su consumo (Pott y

col., 2003). También dentro de la especies del melón (*Cucumis melo*) existen grandes diferencias entre el contenido de carotenoides, ya que mientras que en el cultivar Honeydew o “melón tuna” de la variedad *C. melo inodorus* hay aproximadamente 630 µg/100 g de peso fresco de carotenoides totales, en cultivares Cantaloupe o “melón calameño” de la variedad *C. melo cantalupensis* los carotenoides totales pueden aumentar por sobre los 5000 µg/100 g de peso fresco (Laur y Tian, 2011).

Otro aspecto relevante considera que la tasa de biosíntesis y la capacidad del tejido para almacenar y secuestrar carotenoides pueden ser los determinantes principales. Dentro de esto último, diversos estudios han señalado que la acumulación de carotenoides está fuertemente regulada por el tamaño y estructura anatómica de los plastidios (Hannoufa y Hossain, 2012). Por lo tanto, para aumentar la cantidad de carotenoides, la diferenciación de los plastidios a cromoplastos es esencial y esto involucra el desarrollo de plastoglobulos más grandes y/o estructuras cristalinas de diferentes formas con la capacidad para secuestrar carotenoides, permitiendo de esta manera la deposición masiva de carotenoides en una matriz de lipoproteínas y otorgando una mayor estabilidad frente a la degradación mediada por la luz (Deruere y col., 1994; Vishnevetsky y col., 1999; Simkin y col., 2007; Walter y Strack, 2011).

### **1.5 Carotenogénesis en *Malus domestica*.**

El manzano (*Malus domestica*) es una especie dicotiledónea de la familia *Rosaceae* y corresponde a uno de los árboles frutales comerciales más relevantes en la actualidad debido a que su fruto, la manzana, es consumida en grandes cantidades a nivel mundial (75.6 millones de toneladas el año 2013, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Esto además, representa una oportunidad de mercado enorme para nuestro país, que actualmente se ha posicionado

como tercer exportador mundial de manzanas detrás de China y EE.UU y principal exportador de ésta fruta en el hemisferio sur. (SAG). Una de las principales razones de su consumo, se debe a la facilidad de consumo fresco y procesado, a la presencia de metabolitos beneficiosos para la salud humana como flavonoides, vitamina C y un alto contenido de fibra. Su fruto denominado “pomo” está constituido principalmente por un tejido carnoso desarrollado por la proliferación de la parte basal de los sépalos (receptáculo) que recibe el nombre de hipanto y no por un ovario expandido como suele suceder en la mayoría de los frutos comestibles (Maronedze y Thomas, 2012). El contenido de carotenoides en el hipanto es muy bajo, sin embargo, en la piel o cáscara estos contribuyen significativamente a la coloración y por ende a otorgar valor comercial al fruto (Ampomah-Dwamena y col., 2012). Además, es importante mencionar que la cantidad de carotenoides varía dentro de un rango muy amplio en las más de 8000 variedades existentes de manzanos en el mundo (Ampomah-Dwamena y col., 2012). La mayoría de los manzanos cultivados son diploides ( $2n=34$ ), auto-incompatibles y poseen un periodo juvenil de entre 6 a 10 años. Su genoma es relativamente pequeño (aproximadamente 750 Mb), valor similar al tamaño del genoma del tomate (Giovannoni, 2010), y además fue recientemente secuenciado (Velasco y col., 2010).

A pesar de las herramientas que han sido puestas a disposición y que permiten el análisis del genoma de *M.domestica*, existe muy poca información respecto a los genes que codifican las enzimas de la ruta de biosíntesis de carotenoides en esta especie. Sin embargo, recientemente el interés en promover el consumo de alimentos funcionales junto con las propiedades beneficiosas del consumo de pigmentos carotenoides, han establecido una nueva línea de investigación en Chile enfocada en

estudiar la carotenogenesis en el manzano. Considerando la gran cantidad de productos derivados de la manzana, el interés del consumidor en alimentos saludables y el importante lugar que posee Chile en la producción de manzanas (37.000 hectáreas cultivadas y 1.3 millones de toneladas, ODEPA 2012), es que en nuestro laboratorio se lleva a cabo el proyecto FONDEF D10I1022 cuya finalidad es generar una variedad de manzana con mayor contenido de carotenoides utilizando la sobre-expresión fruto específica de los genes *Psy2* y *Lcyb1* provenientes de *D. carota* (zanahoria) y *crtI* de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Para esto, en este seminario de título se ha comenzado con el estudio de esta ruta para el cultivar Fuji var. Raku-Raku de *M.domestica*. Con tal objetivo, se ha propuesto identificar los principales genes de interés de la ruta de biosíntesis de carotenoides en *M.domestica* (*Psy*, *Pds* y *Lcyb*) desde el punto de vista biotecnológico, evaluar su expresión en el fruto durante el desarrollo mediante PCR en tiempo real y complementariamente evaluar el contenido de carotenoides totales y específicos durante los mismos estadios de maduración anteriormente analizados. Esta información sentará las bases para la elección de los genes carotenogénicos que permitirán aumentar el contenido de carotenoides en el hipanto de frutos de manzano.

## 1.6 Objetivos.

### 1.6.1 Objetivo General.

- Evaluar la expresión de los genes carotenogénicos *Psy*, *Pds* y *Lcyb* en hojas y frutos de *M. domestica* cv. *Fuji* y determinar la composición de carotenoides durante la maduración del fruto.

### 1.6.2 Objetivos Específicos.

- Identificar mediante análisis *in silico* los genes que probablemente codifiquen las enzimas fitoeno sintasa (PSY), fitoeno desaturasa (PDS) y licopeno  $\beta$ -ciclase (LCYB) de *M. domestica*.
- Evaluar la expresión de los genes *Psy*, *Pds* y *Lcyb* en frutos de distintos estadios de desarrollo y en hojas de *M. domestica* cv. *Fuji* mediante PCR en tiempo real.
- Determinar el contenido de carotenoides totales y específicos en frutos de distintos estadios de desarrollo de *M. domestica* cv. *Fuji* mediante RP-HPLC.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Materiales Biológicos.

En este trabajo se utilizaron muestras de tejido de frutos y hojas de manzanos (*Malus x domestica cv. Fuji*) para la extracción de ARN total que permitió el análisis de expresión de los genes carotenogénicos *Psy*, *Pds* y *Lcyb* mediante PCR en tiempo real y para la extracción de carotenoides necesaria para determinar la composición de carotenoides mediante espectrofotometría y RP-HPLC. En ambos casos, se trabajó con tejidos de manzanos *cv. Fuji Raku Raku* obtenidos gracias a la empresa Univiveros (Paine, Región Metropolitana). De éstos, se seleccionaron alrededor de 9 hojas maduras con características similares de tamaño (5 - 7 cm. de largo y 3 - 4 cm de ancho), y frutos que fueron recolectados en tres estadios de maduración distintos seleccionados principalmente por la coloración de la piel (aproximadamente 9 frutos por estadio). El estadio 1 (E1) fue seleccionado por poseer una piel completamente verde y los frutos fueron recolectados a los 127 días post-antesis (dpa) el día 3 de Febrero del año 2012. El estadio 2 (E2) se seleccionó debido a que en este comienzan a aparecer las primeras muestras de coloración rojiza en la piel del fruto, indicativo de maduración, y se recolectaron a los 168 dpa (15 de Marzo del año 2012). Mientras que el último estadio (E3) se seleccionó por corresponder a un fruto con una coloración rojiza clara sobre un fondo verdoso amarillento, piel característica de una manzana Fuji madura, la que fuera recolectada a los 211 dpa (27 de Abril del año 2012). En estos tres estadios, las manzanas seleccionadas además de presentar la coloración característica de cada estadio señalado, presentan un tamaño y orientación al sol similares de manera de que cada estadio quedara homogéneamente representado. Además, los estadios de maduración del fruto seleccionados poseen características

diferenciales en su contenido de almidón, metodología estandarizada por personal de la empresa Univiveros.

Una vez recolectados, todos los tejidos de manzano utilizados en este seminario de Título fueron congelados en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -80 °C hasta su uso.

## **2.2 Reactivos.**

Los reactivos utilizados se adquirieron según las técnicas de biología molecular requeridas y fueron escogidas de acuerdo a los estándares de calidad necesarios. Estos productos fueron obtenidos de empresas y marcas registradas como Invitrogen, Agilent Technologies, Fermentas, Promega, Axygen, New England Biolabs, Biorad, Merck, US Biological, MO BIO Laboratories Inc. y Sigma-Aldrich.

## **2.3 Partidores**

Los partidores utilizados se describen en la **Tabla II**, y fueron necesarios para el análisis de expresión mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) de los distintos genes carotenogénicos que se identificaron en el análisis *in silico* del genoma de *M. domestica* como *Psy*, *Pds* y *Lcyb* y de genes normalizadores como *MdActin* (GenBank: CN938023), *Md18S* (DQ341382) y *MdUbiquitin* (AY190601.1).

Todos los partidores se diseñaron utilizando inicialmente la herramienta bioinformática Vector NTI (Invitrogen) considerando los parámetros necesarios para el experimento de PCR en tiempo real (tamaño amplicon, temperatura de disociación de los partidores y contenido GC, etc).

**Tabla II.- Partidores utilizados en este Seminario de Titulo.**

Nombre	Secuencia (5'→3')	TM (°C)	Tamaño producto (pb)	Descripción
18S F	CTGAGAAACGGCTACCACATCCA	58.9	170	Gen Housekeeping. Utilizado como normalizador.
18S R	CACCAGACTTGCCCTCCAATGG	60.4		
Actin F	TGACCGAATGAGCAAGGAAATTACTGC	59.3	156	Gen Housekeeping. Utilizado como normalizador y para verificar la calidad del ADNc.
Actin R	TACTCAGCTTTGGCAATCCACATCTG	59.1		
Ubiq F	GCTCGAGGACGGCAGAAC	58.6	121	Gen Housekeeping. Utilizado como normalizador.
Ubiq R	CTTGGGCTTGGTGTAGGTCTTC	57.7		
Psy1 F	GTTGGCCGGTATGGTCATCGTTAC	59.8	124	Fragmento del Gen Carotenogénico <i>Psy1</i> de <i>M.domestica</i> .
Psy1 R	GGCAGCATGAGAAGTTTCTTGGCTC	60.3		
Psy2 F	CACACCCTCACACTCAAACCTAAAAC	58.1	111	Fragmento del Gen Carotenogénico <i>Psy2</i> de <i>M.domestica</i> .
Psy2 R	GGTGCAAATTCTGGGCATCAGACC	60.6		
Psy3 F	GACGAGGCAGAGAAGGGAGTGA	60.4	212	Fragmento del Gen Carotenogénico <i>Psy3</i> de <i>M.domestica</i> .
Psy3 R	GAGGTTCTTGAGGGCGAATTATCG	59.3		
Psy4 F	CCCAAAAACCCAAAACCCAGCAG	59.6	124	Fragmento del Gen Carotenogénico <i>Psy4</i> de <i>M.domestica</i> .
Psy4 R	GGGTGCAAATTCTCGGCAACAGAC	60.8		
Pds F	AACCGATTCTCCAGGAGAAACACG	60.7	208	Fragmento del Gen Carotenogénico <i>Pds</i> de <i>M.domestica</i> .
Pds R	CATCTGCTTCAATCACGCTCCCA	59.6		
Lcyb1 F	GTCATCTCGACTGTTTCTTCCCGATC	58.8	116	Fragmento del Gen Carotenogénico <i>Lcyb1</i> de <i>M.domestica</i> .
Lcyb1 R	TCTTTACCAAAGGAGGAGTCCCCTTG	59.9		
Lcyb2 F	GGCTGAAGCCATTGCAGAGTGC	61.4	110	Fragmento del Gen Carotenogénico <i>Lcyb2</i> de <i>M.domestica</i> .
Lcyb2 R	CCCTCGTGCATCTCCTCTCGATT	60.5		
Oligo AP	CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT	61.5	-	Utilizado en reacciones de RT para la síntesis ADNc.

Luego, mediante el programa OligoAnalyzer (IDT) se analizaron las propiedades termodinámicas para descartar la formación de heterodímeros, homodímeros u horquillas. Si algunos de estos parámetros no se cumplió, se procedió a realizar una corrección manual de los partidores hasta cumplir con los parámetros requeridos. Además, cuando fue posible se consideró que los fragmentos amplificados comprendieran intrones de manera de evidenciar la contaminación por ADN genómico en las muestras de ADNc.

Posteriormente, se evaluó la especificidad de los partidores respecto al gen blanco a amplificar, para esto se realizó un BLASTx utilizando bases de datos de la secuenciación del genoma de *M. domestica* cv. *Golden Delicious* (GDR: [http://www.rosaceae.org/projects/apple\\_genome](http://www.rosaceae.org/projects/apple_genome)) y de secuencias de EST de *M. domestica* (ESTIMAApplE: [http://titan.biotec.uiuc.edu/cgi-bin/ESTWebsite/estima\\_blastui?seqSet=apple](http://titan.biotec.uiuc.edu/cgi-bin/ESTWebsite/estima_blastui?seqSet=apple) y KEGG: <http://www.genome.jp/tools/blast/>). Todos los partidores se mantuvieron a una concentración de 250  $\mu$ M a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se diluyeron a 10  $\mu$ M al momento de su uso.

## **2.4 Metodología.**

En esta sección se describirán en primera instancia las herramientas bioinformáticas para la obtención y posterior análisis de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de los genes carotenogénicos *Psy* (gen codificante de la enzima fitoeno sintasa), *Pds* (gen codificante de la enzima fitoeno desaturasa) y *Lcyb* (gen codificante de la enzima licopeno  $\beta$ -ciclase). Luego se describirán los métodos utilizados para la extracción del ARN total de frutos y hojas de *M. domestica* y el posterior análisis de expresión en estos tejidos mediante PCR en tiempo real. Finalmente se describirán los

protocolos pertinentes a la medición de los distintos pigmentos obtenidos en fruto en distintos estadios de desarrollo mediante RP-HPLC.

#### **2.4.1 Análisis Bioinformáticos**

##### **2.4.1.1 Obtención y Análisis de la Secuencia Nucleotídica Probable de los Genes Carotenogénicos *Psy*, *Pds* y *Lcyb*.**

El genoma de *M. domestica* fue recientemente secuenciado (Velasco y col., 2010) y la Base de Datos de Genomas de Rosáceas (GDR) se encuentra disponible una lista de posibles genes y su función más probable. En ésta, se encuentran los borradores de los genomas de distintas especies pertenecientes a la familia de las rosáceas y diversas herramientas para el análisis detallado de estas secuencias. Por ello, GDR fue la primera base de datos utilizada para la obtención y posterior análisis de secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes *Psy*, *Pds* y *Lcyb*. Además, se realizaron distintos alineamientos de secuencias de genes conocidos que codifican las enzimas de interés con el genoma de *M. domestica*, mediante la utilización de BLASTx. Utilizando en conjunto ambas herramientas, se consiguió una lista de genes que probablemente codifican las enzimas de la ruta de biosíntesis de carotenoides. Para obtener la estructura génica de estos candidatos de manera confiable se recurrió a la base de datos de EST (Expressed Sequence Tag) como ESTIMA:Apple y KEGG (Ambas con más de 120.000 secuencias parciales de genes que se expresan en distintos tejidos de manzana). Utilizando ambas bases de datos y como base previa la información otorgada en GDR, se evaluó la evidencia de expresión y estructura génica de cada uno de los genes candidatos. Finalmente, y para realizar los esquemas de cada gen identificado se utilizó la herramienta VectorNTI (Invitrogen).

#### 2.4.1.2 Análisis de la Secuencia Aminoacídica de las Enzimas PSY, PDS y LCYB.

Para realizar los alineamientos de secuencia aminoacídica ilustrados en este seminario de título se utilizó la herramienta bioinformática ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Una vez construidos los alineamientos se editaron con el programa Jalview (Waterhouse y col., 2009). Para cada alineamiento de secuencias se consideraron proteínas que ya han sido caracterizadas previamente y cuyos códigos de acceso se indican en cada figura. Además, se analizó la posible localización subcelular de cada proteína analizada utilizando el software TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>).

En cuanto a los árboles filogenéticos, estos fueron construidos utilizando el software de libre disposición MEGA 5.05 (Tamura y col., 2011) y utilizando un número de repeticiones de 1000, escogiendo en cada caso el árbol más representativo. Los códigos de acceso a las secuencias aminoacídicas utilizadas se indican a continuación; At: *Arabidopsis thaliana* (AtPSY: AAA32836.1 y AtLCYB: AEE74874.1), Bv: *Brevundimonas vesicularis* (BvCRTY: ABC50115.1), Ca: *Capsicum annuum* (CaLCYB1: ADH04276.1), Cp: *Candidatus pelagibacter* (CpPSY: YP\_265548.1), Cm: *Citrus máxima* (CmLCYB: AAR89632.1), Cpa: *Carica papaya* (CpaLCYB1: ACM24791.1 y CpaLCYB2: ACR61334.1), Cr: *Chlamydomonas reinhardtii* (CrPSY: EDO97702.1), Cp: *Citrus paradisi* (CpLCYB1: AAD38049.2 y CpLCYB2: ACX37456.1), Csa: *Crocus sativus* (CsaLCYB1: ADA82242.1 y CsaLCYB2: ADA82241.1), Cs: *Citrus sinensis* (CsLCYB1: ABB72443.1 y CsLCYB2: AAF18389.1), Dc: *Daucus carota* (DcPSY1: ABB52067.1, DcPSY2: ABB52068.1, DcLCYB1: ABB52071.1 y DcLCYB2: ABB52072.1), Ds: *Dunaliella salina* (DsPSY: AAT28184.1), Ej: *Eriobotrya japonica* (EjLCYB: AFP43698.1), Fc: *Ficus carica* (FcLCYB: ADX36406.1), Me: *Manihot*

*esculenta* (MePSY1: ACY42666.1 y MePSY2: ACY42667.1), Np: *Narcissus pseudonarcissus* (NpPSY: CAA55391.1), Os: *Oryza sativa* (OsPSY1: AAS18307.1, OsPSY2: AAK07735.1 y OsPSY3: ABC75828.1), Pa: *Pantoea ananatis* (PaCRTY: BAA14126.1), Sb: *Sorghum bicolor* (SbPSY1: AAW28996.1 y SbPSY3: AAW28997.1), Sl: *Solanum lycopersicum* (SIPSY1: NP\_001234812.1, SIPSY2: NP\_001234671.1, SILCYB: CAA60170.1 y SICYCB: NP\_001234445.1), Tt: *Thermus thermophilus* (TtPSY: AEG34638.1), Vv: *Vitis vinifera* (VvLCYB1: AFP28799.1 y VtLCYB2: AFP28803.1), Xd: *Xanthophyllomyces dendrorhous* (XdLCYB), Zg: *Zobellia galactanivorans* (ZgCRTY: CAZ96005.1) y Zm: *Zea mays* (ZmPSY1: P49085.1, ZmPSY2: AAQ91837.1 y ZmPSY3: ABC75827.1).

#### **2.4.2 Extracción de ARN Total de Tejidos de Manzano.**

Para la extracción de ARN total a partir de frutos de manzano se modificó el protocolo descrito por Meisel y col. (2005). Se pesaron aproximadamente 4 g. de hipanto proveniente de 3 frutos distintos para cada muestra analizada (aproximadamente 1.33 g. por fruto). Estos se maceraron en un mortero estéril en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Una vez obtenido esto, se procedió a verter en el mortero 10 mL de buffer de extracción (CTAB 2%, PVP40 (PM. 40.000) 2%, EDTA 25 mM, NaCl 2 M, TrisHCl (pH 8.0) 100 mM, Trihidroclorato de espermidina 0.05 % y  $\beta$ -mercaptoetanol 2% (agregado justo antes de su uso)), previamente calentado a 65°C en un baño termoregulado. Rápidamente se transfirió la mezcla a un tubo de 50 mL y se mezcló completamente en un Vortex durante 1 min. Posteriormente, la mezcla se incubó a 65°C durante 30 min. Durante este periodo se agitó vigorosamente la muestra varias veces para evitar la separación del tejido y el buffer de extracción. Transcurrido este tiempo, se agregó 1 volumen equivalente de

solución cloroformo: alcohol isoamilico frio (24:1) y se agitó vigorosamente la mezcla durante 2 min. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 12.000 g durante 20 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante acuoso a un tubo nuevo. La fase acuosa recuperada se precipitó con 1 volumen de LiCl 10 M durante toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo la mezcla se centrifugó a 12.000 g durante 30 min a 4°C para obtener el ARN en forma de precipitado. Luego, el sobrenadante se eliminó y el precipitado se suspendió en 500 µL de agua nanopura tratada con DEPC. Esta mezcla fue transferida a un tubo de 2 mL, se agregó a la solución 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamilico frio (24:1) y se agitó vigorosamente durante 2 min, para luego centrifugar la muestra a 14.000 g durante 10 min a 4°C. De esta mezcla, se recuperó la fase acuosa y se agregó 1 mL de etanol 75% frio. Esta mezcla se incubó a -20°C durante 1 h y luego se centrifugó a 14.000 g durante 20 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secando a temperatura ambiente. Una vez seco, se suspendió en 20 µL agua nanopura tratada con DEPC (pH. 5.0) y se almacenó a -80°C hasta su uso.

En el caso de hojas de manzano se procedió de la misma forma anteriormente mencionada, sin embargo se pesaron aproximadamente 300 mg de tejido proveniente de 3 hojas distintas para cada muestra analizada (aproximadamente 100 mg por hoja). Una vez obtenido el precipitado de ARN total se suspendió en 20 µL agua nanopura tratada con DEPC (pH. 5.0) y se almacenó a -80°C.

### **2.4.3 Cuantificación y Análisis de Calidad del ARN Total.**

#### **2.4.3.1 Cuantificación y Análisis de Calidad del ARN Total mediante Espectrometría.**

Para evaluar la calidad y cantidad de ARN total a partir de tejidos de manzano se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop® (ND-1000 UV-Vis). Además de determinar la concentración de ARN total en la muestra, se evaluó la presencia de contaminantes. Para esto se analizaron los cocientes de absorción  $A_{260}/A_{280}$  (evaluación de la contaminación por proteínas en la mezcla) y  $A_{260}/A_{230}$  (evaluación de la contaminación por polisacáridos y polifenoles). Se consideró que para una muestra de ARN total puro ambos cocientes deberían ser cercanos a 2.

#### **2.4.3.2 Análisis de Calidad del ARN Total mediante Gel de Agarosa Denaturante.**

Para evaluar la integridad del ARN total se realizó un gel de agarosa con condiciones denaturantes para el ARN. Para esto, se calentaron aproximadamente 0.5 g de agarosa en 35 mL de agua destilada a una temperatura de 60°C. Posteriormente, se agregaron 5 mL de buffer de corrida MOPS 10X (MOPS (pH 7.0) 0.4 M, Acetato de sodio 0.1 M y EDTA 0.01 M) y 9 mL de formaldehído 37% (12.3M). El gel formado fue acomodado en una cámara de electroforesis y ésta se llenó con buffer de corrida MOPS 1X. Antes de cargar el ARN en los pocillos del gel, éste fue tratado con buffer de carga de ARN (Fermentas) según las indicaciones de su fabricante. Posteriormente, una vez cargada las muestras, se procedió a realizar la electroforesis con condiciones de 70 V durante 50 min. Transcurrido este tiempo se procedió a visualizar las bandas bajo la luz de un transiluminador UV (GeneGenius Classic de SynGene) y fotografiados utilizando el software asociado al equipo (GenSnap). La

calidad de las muestras se evaluó según la presencia nítida de 2 bandas características de una muestra de RNA íntegra correspondientes a los ARN ribosomales de 23 y 18S.

#### **2.4.4 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.**

Todos los productos de PCR obtenidos (100-250 pb) fueron analizados en geles de agarosa de concentración 1% a 1.5% según el tamaño esperado de la banda a visualizar. Como marcador de tamaño de banda en pares de bases (pb) se utilizó Gene Ruler (Fermentas). Estos geles fueron preparados utilizando buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) como disolvente de la agarosa. Al momento de cargar las muestras en el gel estas se mezclaron con buffer de carga (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol 80%) en una proporción 5:1. Posteriormente, se realizó la electroforesis utilizando una diferencia de potencial entre 90V y 110V durante 40 a 50 min dependiendo del tamaño de banda esperado. Luego, se tñeron los geles durante 15 min en una solución de bromuro de etidio, fueron visualizados con un transiluminador UV (GeneGenius Classic de SynGene) y fotografiados utilizando el software asociado al equipo (GenSnap).

#### **2.4.5 Síntesis y Análisis del ADNc de *M.domestica*.**

##### **2.4.5.1 Tratamiento del ARN total con DNasa I.**

Todas las muestras de ARN total obtenidas en este seminario de título, se trataron con DNasa I previo a realizar la técnica de RT-PCR, de manera de eliminar la posible contaminación con ADN genómico. Para eso se trataron 7 µg de ARN total con 50 U de DNasa I (Fermentas), 1 µL de inhibidor de RNasa (Fermentas) y 2 µL de buffer de DNasa/MgCl<sub>2</sub> 10X (Fermentas). Esto se realizó en un volumen total de 20 µL.

utilizando agua DEPC para completar ese volumen cuando fue necesario. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 35 min en un baño termoregulado. Transcurrido ese tiempo, se transfirió rápidamente a hielo y se agregaron 2 µL EDTA (25 mM). Luego se incubó la mezcla durante 10 min en hielo.

#### **2.4.5.2 Transcripción Reversa para Sintetizar el ADNc.**

Para la síntesis del ADNc se utilizó el sistema ImProm-II Reverse Transcription (Promega). Se tomaron 9.5 µL de ARN total tratado con DNAsa y se mezclaron en un tubo de 0.6 mL con 3 µL del partidor Oligo-AP (Tabla II). Cada muestra se incubó 5 min a 70°C (Programa A en la Tabla III). Transcurrido este tiempo el programa se detuvo, los tubos se mantuvieron en hielo y se agregó a la mezcla de transcripción reversa (10 µL de buffer ImProm-II 5X, 1 µL de inhibidor de RNAsa (Fermentas), 5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2.5 µl de dNTPs (10 µM), 16 µL de agua DEPC y 3 µL de la enzima de transcriptasa reversa ImProm-II) para completar un volumen total de 50 µl. Luego, se colocaron nuevamente los tubos en el termociclador y se continuó el programa de RT-PCR (Tabla III-A). Finalmente, se obtuvieron 50 µL de cada cDNA que fueron almacenados hasta su uso a -20°C.

#### **2.4.5.3 PCR Convencional utilizando ADNc como Molde.**

Para confirmar la integridad del ADNc obtenido se amplificó mediante PCR un fragmento del gen codificante de actina (*MdActin*) utilizando los partidores descritos en la Tabla II. Todas las reacciones de PCR llevadas a cabo en este Seminario de Título se realizaron en un volumen total de 25 µL en agua libre de nucleasas e incluyendo 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen), 2.5 µL del buffer de la *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen), 0.5 µL dNTPs (10 mM), 0.5 µL de los partidores sentido y antisentido

correspondiente a cada gen (10  $\mu$ M) y 1  $\mu$ L de ADNc como molde. Además, se agregó a cada reacción de PCR un control negativo (carente de molde) y un control positivo cuando fue posible. El programa utilizado en esta ocasión se muestra en la **Tabla III-B**. Como control para verificar la ausencia de ADN genómico contaminante se reemplazó el ADNc con ARN total tratado con DNAsa I. Esto se realizó para cada una de las muestras analizadas.

#### **2.4.6 PCR Cuantitativo en Tiempo Real.**

Previo al experimento de PCR en Tiempo Real se procedió a amplificar todos los genes utilizados en este estudio mediante un PCR convencional (**Tabla III-C**) y utilizando los partidores descritos en la **Tabla II**. Esto se realizó desde ADNc y tuvo la finalidad de comprobar la funcionalidad y especificidad de los partidores diseñados. Luego, para evaluar los niveles de expresión para los distintos genes de interés (*18S*, *Actina*, *Ubiquitina*, *Psy1*, *Psy2*, *Psy3*, *Psy4*, *Pds*, *Lcyb1* y *Lcyb2*) en las muestras analizadas se utilizó la técnica de PCR en tiempo real utilizando SYBR Green como sonda fluorescente. Para esto, se utilizó un termociclador Mx3000P (Stratagene) y el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 20  $\mu$ L, el cual incluía 10  $\mu$ L de Master Mix (*Taq* ADN polimerasa, dNTPs,  $MgCl_2$  y SYBR Green), 7.5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, 0.3  $\mu$ L de sonda ROX (utilizada como sonda pasiva y a una dilución 1:500) y 0.6  $\mu$ L de partidores antisentido y sentido (10  $\mu$ M). El programa utilizado para todas las muestras es el descrito en la **Tabla II-D**. Además, todas las reacciones fueron llevadas a cabo en triplicado técnico (las 2 replicas de mayor similitud fueron seleccionadas para los análisis posteriores) y utilizando 3 replicas biológicas constituyendo cada una de estas una mezcla de 3 frutos u hojas según corresponda. La especificidad de reacción para

cada set de partidores fue medida en la curva de denaturación del producto de PCR correspondiente, y en esta se verificó la presencia de una sola señal en el gráfico de Fluorescencia vs T°.

En este trabajo, las cuantificaciones de los niveles de expresión fueron normalizadas a actina y relativizadas usando como calibrador aquella condición de menor expresión génica y se indicará en cada figura según corresponda. Se probaron tres genes candidatos como normalizadores (*18S*, *actina* y *ubiquitina*) pero al evaluarlos mediante el programa NormFinder (Andersen y col., 2004), *actina* correspondió al mejor normalizador, lo cual se corroboró experimentalmente y se aplicó para todos los ensayos realizados. Para los cálculos de expresión relativa y eficiencia de cada partidor, se utilizaron las ecuaciones descritas por Pfaffl (2001).

**Tabla III.- Programas de PCR utilizadas en este Seminario de Título**

**A.- RT-PCR.**

Segmento	Pasos		Nº de ciclos
	Temperatura	Tiempo	
1	70 °C 25°C 42°C 70°C	5 min 5 min 60 min 15min	1

**B.- PCR del gen *Mdactin* para evaluar el ADNc.**

Segmento	Pasos		Nº de ciclos
	Temperatura	Tiempo	
1	94°C	3 min	1
2	94 °C 55°C 72°C	1 min 1 min 30 s	28
3	72°C	10 min	1

**C.- PCR para evaluar partidores diseñados.**

Segmento	Pasos		Nº de ciclos
	Temperatura	Tiempo	
1	94°C	3 min	1
2	94 °C 55°C 72°C	1 min 1 min 30 s	33
3	72°C	10 min	1

#### D.- PCR cuantitativo en Tiempo Real.

Segmento	Pasos		N° de ciclos
	Temperatura	Tiempo	
1	95°C	3 min	1
2	95°C 60°C	10 s 20 s	40
3	95°C 60°C 95°C	1 min 30 s 30 s	1

#### 2.4.7 Determinación de la Concentración de Carotenoides.

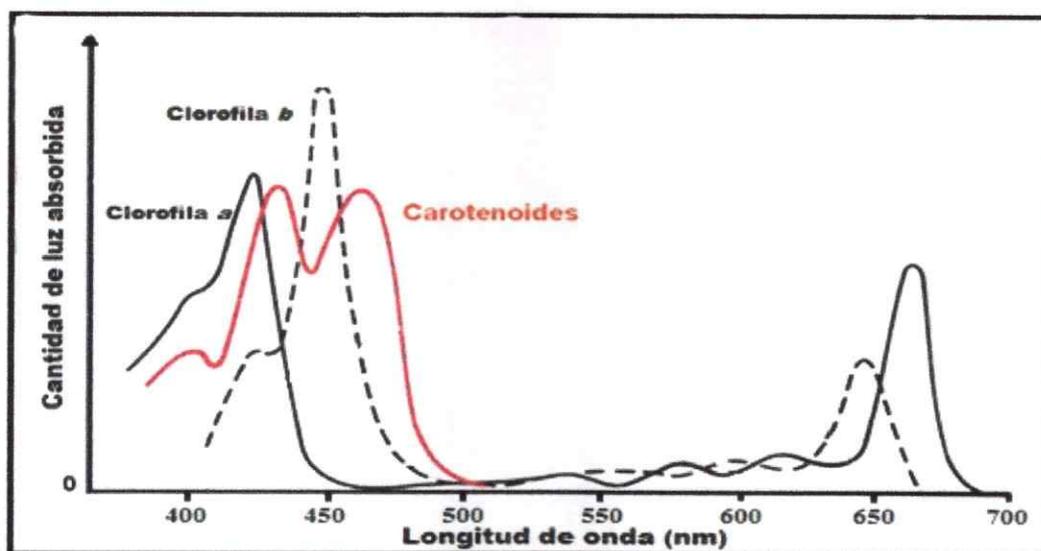
##### 2.4.7.1 Extracción de Carotenoides a partir de Frutos de Manzano.

Para la extracción de carotenoides de frutos de manzano se pesaron 4g de hipanto proveniente de tres frutos distintos, vale decir 1.33 g aproximadamente por fruto para cada estadio analizado (3 estadios de maduración recolectados y los mismos utilizados en el análisis de expresión génica). Primero, el tejido recolectado fue macerado en un mortero en presencia de N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino. Luego, se agregaron 20 mL de una solución hexano:acetona:etanol (2:1:1) de manera de obtener una mezcla homogénea. Esta se traspasó a un tubo de 50 mL y se agitó vigorosamente durante 2 min. Transcurrido ese tiempo el tubo se incubó en hielo y oscuridad por otros 2 min. Luego, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min a 4°C. Finalmente, los carotenoides se recuperaron de la fase superior formada

recolectándolos en tubos de 2 mL. Se obtuvieron 4 tubos por muestra y estos fueron secados mediante un Speed-Back durante 2 h a temperatura media. Una vez secos, las muestras se resuspendieron en 400  $\mu$ L de acetona y se juntaron en un tubo de 2 mL (volumen total por muestra 1.6 mL). Cada estado de maduración de fruto fue evaluado usando tres muestras independientes. Además, todo el proceso de extracción de carotenoides fue realizado con la menor cantidad de luz posible.

#### **2.4.7.2 Cuantificación de Carotenoides Totales Mediante Espectrofotometría.**

Las muestras de pigmentos obtenidos y suspendidas en acetona en el paso de extracción de carotenoides fueron utilizados en una primera etapa para la determinación de carotenoides totales mediante la utilización de un espectrofotómetro (Shimadzu). Se midió la absorbancia a distintas longitudes de onda; 474 nm (Absorción de carotenoides principalmente), 645/662 nm (Absorción de las clorofilas *a* y *b*, que es utilizada para determinar su contribución en la medición a 474 nm, tal como se ilustra en la **figura 2**) y 520/750 nm (Datos necesarios para determinar la turbidez de la muestra y por ende validar los datos obtenidos). Las expresiones utilizadas para determinar las concentraciones de carotenoides totales fueron descritas anteriormente por Lichtenthaler y Buschmann (2001). Todas las mediciones se realizaron en una cubeta de cuarzo y se procuró que los datos de absorbancia se mantuvieran en el rango de 0.3 a 0.85. Para lograr esto se diluyó la muestra cuando fue necesario. Los datos obtenidos fueron expresados en mg/g de peso seco, para lo que fue necesario estimar el peso seco de cada muestra basado en el factor obtenido luego de someter a 60°C durante 24 h, 4 g de tejido de fruta fresca de manzano.



**Figura 2.- Espectro de absorción de los pigmentos clorofila a, b y carotenoides.** En la figura se indican los espectros de absorción de los pigmentos cuantificados en este Seminario de Titulo. Además es posible visualizar que a una medición de absorbancia a 474 nm, las clorofilas contribuyen significativamente a esta medición (especialmente clorofila b). Esta contribución a los carotenoides totales puede ser estimada midiendo la absorbancia de la muestra a 645 (Clorofila a) y 662 (Clorofila b) nm, longitudes a las cuales ningún carotenoide absorbe significativamente.

#### 2.4.7.3 Determinación del Contenido de Carotenoides mediante RP-HPLC.

Se utilizaron 20  $\mu\text{L}$  de los pigmentos en acetona obtenidos a partir de la extracción de carotenoides de frutos para el análisis mediante HPLC en fase reversa (RP-HPLC). Este análisis se realizó en una columna MultoHigh 100 RP 18-5 $\mu$  (150 x 4.6 mm) y se utilizó una fase móvil compuesta de acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5). Las condiciones cromatográficas consistieron en un flujo de 1.5 mL/min y una duración de 60 min. Mediante el análisis de los cromatogramas obtenidos a una longitud de onda de 474 nm, la concentración de pigmentos totales a 474 nm obtenido por espectrofotómetro y según los tiempos de retención, espectros de absorción y grado de pureza de los picos obtenidos, se determinó la concentración de los principales compuestos carotenoides y clorofilas presentes en las muestras. Se

analizaron tres estadios de maduración de fruto (E1, E2 y E3) y en cada estadio se analizaron 3 grupos constituidos de una mezcla de 3 frutos cada uno. Además, cada muestra fue analizada con dos replicas técnicas.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Identificar mediante Análisis *in silico* los Genes que Codifiquen Probablemente las Enzimas Fitoeno Sintasa (PSY), Fitoeno Desaturasa (PDS) y Licopeno $\beta$ -ciclase (LCYB) de *Malus domestica*.**

Se realizó un análisis *in silico* con el fin de identificar y determinar la secuencia nucleotídica de los posibles genes codificantes de las enzimas claves de la síntesis de carotenoides, en particular de  $\beta$ -caroteno, como lo son *Psy*, *Pds* y *Lcyb* a partir de manzana (*M. domestica*). Además, se analizaron las secuencias aminoacídicas codificadas por estos genes para inferir su posible funcionalidad *in vivo* en plantas y frutos de manzano.

##### **3.1.1 Obtención y Análisis de la Posible Secuencia Nucleotídica de los Genes Carotenogénicos *Psy*, *Pds* y *Lcyb*.**

Dada la reciente secuenciación del genoma de *M. domestica*, la información respecto a sus genes y sus posibles funciones es limitada e inexacta. Sin embargo, en GDR existen dos herramientas disponibles que sirven como punto de partida en la identificación de genes; una lista en la cual se indican los genes candidatos y la función probable de la proteína codificada basada en la identidad de secuencia con proteínas anteriormente descritas y la posibilidad de realizar un BLASTx directo contra el borrador del genoma de *M. domestica*. Ambas en conjunto dan origen a la **Tabla IV**, en la cual se muestran el código de ingreso en la base de datos GDR para el gen candidato en particular, el nombre asignado para fines prácticos en este Seminario de Título, la longitud del transcrito en pares de bases (pb) y la especie con la cual la secuencia codificada por el gen comparte mayor porcentaje de identidad de secuencia aminoacídica.

Posteriormente, se analizó la estructura de los genes predichos y se encontró que la mayoría de ellos no presentaba los motivos funcionales necesarios para codificar proteínas funcionales, carecían de una estructura génica clara (exones e intrones no bien definidos) o procedía de un mal alineamiento de los cóntigos provenientes de la secuenciación del genoma de *M. domestica* (datos no mostrados). Por lo tanto, se recurrió a bases de datos de EST para obtener la secuencia nucleotídica y estructura de los posibles genes descritos en la **Tabla IV**.

**Tabla IV** Posibles genes codificantes para las enzimas de la vía de síntesis de carotenoides (PSY, PDS y LCYB) suministrada por GDR.

Código de ingreso (GDR)	Posible Gen	Longitud del transcrito (pb)	Identidad de secuencia aminoacídica*
MDP0000151924	<i>Psy1</i>	2273	68% - PSY1 ( <i>S.lycopersicum</i> )
MDP0000237124	<i>Psy2</i>	2871	76% - PSY ( <i>D. carota</i> )
MDP0000261447	<i>Psy3</i>	2941	82% - PSY ( <i>C. melo</i> )
MDP0000177623	<i>Psy4</i>	2774	71% - PSY ( <i>D. carota</i> )
MDP0000321586	<i>Psy5</i>	2941	82% - PSY ( <i>C. melo</i> )
MDP0000272976	<i>Psy6</i>	2421	38% - PSY ( <i>N.pseudonarcissus</i> )
MDP0000197515	<i>Psy7</i>	4804	36% - PSY ( <i>N.pseudonarcissus</i> )
MDP0000178953	<i>Psy8</i>	1136	65% - PSY ( <i>D. carota</i> )
MDP0000304577	<i>Psy9</i>	3698	64% - PSY ( <i>N.pseudonarcissus</i> )
MDP0000478884	<i>Psy10</i>	903	68% - PSY ( <i>C. melo</i> )
MDP0000288336	<i>Psy11</i>	1328	67% - PSY ( <i>C. annuum</i> )
MDP0000251025	<i>Psy12</i>	366	54% - PSY ( <i>D. carota</i> )
MDP0000148978	<i>Pds1</i>	5224	78% - PDS ( <i>A.thaliana</i> )
MDP0000241703	<i>Pds2</i>	2070	89% - PDS ( <i>C. annuum</i> )
MDP0000130370	<i>Pds3</i>	3782	56% - PDS ( <i>R. communis</i> )
MDP0000194622	<i>Lcyb1</i>	3255	82% - LCYB ( <i>S.lycopersicum</i> )
MDP0000145663	<i>Lcyb2</i>	1491	59% - LCYB2 ( <i>C. paradisi</i> )
MDP0000258205	<i>Lcyb3</i>	720	55% - LCYB1 ( <i>V. vinifera</i> )

\* Porcentaje de identidad basado en el 100 % de la secuencia problema

De esta manera se obtuvieron alrededor de 8 posibles genes en los cuales se identificaron los marcos abiertos de lectura (ORF) y parte de las regiones no traducibles 5' y 3' (UTR) (Ver Anexos). De los genes identificados; 5 correspondieron a genes *Psy*, 1 a un gen *Pds* y 2 a genes *Lcyb*. Por otro lado, en la **Tabla V** se indican aquellos genes identificados mediante el ensamblaje de EST, en la que también se muestra la longitud del transcrito y proteína codificada, junto con la identidad de secuencia aminoacídica mas alta encontrada mediante BLASTx, indicando la proteína y organismo correspondiente.

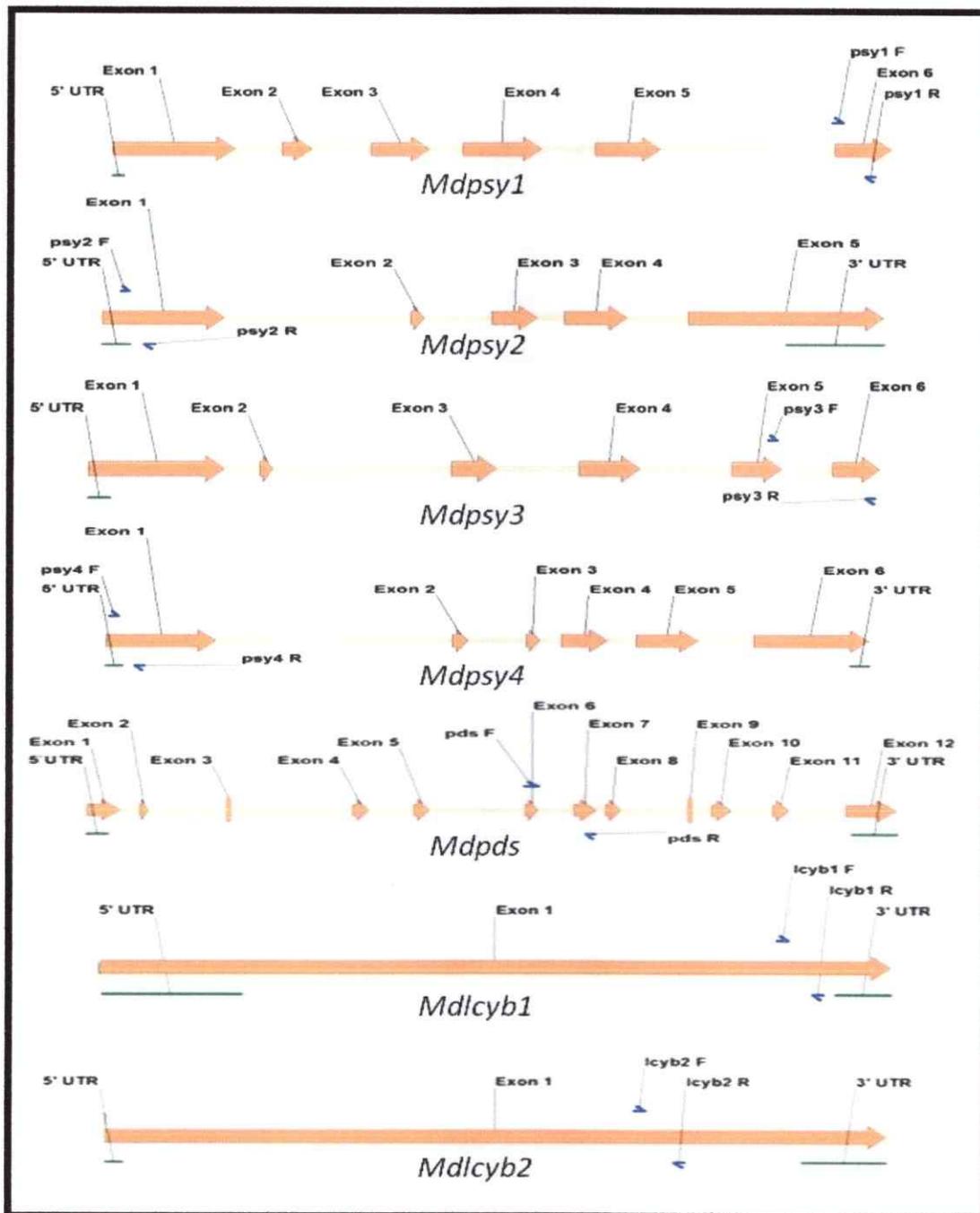
**Tabla V.- Posibles genes carotenogénicos identificados mediante ensamblaje de EST.**

Posible Gen	Longitud del transcrito (pb)	Longitud de la proteína codificada (aas)	Identidad de secuencia aminoacídica*
<i>Psy1**</i>	1219	400	72% - PSY ( <i>Ricinus communis</i> )
<i>Psy2</i>	1655	397	89% - PSY ( <i>Fragaria x ananassa</i> )
<i>Psy3</i>	1364	427	89 % - PSY ( <i>Prunus mume</i> )
<i>Psy4</i>	1309	395	96% - PSY ( <i>Eriobotrya japonica</i> )
<i>Psy5</i>	1364	427	89% - PSY ( <i>Prunus mume</i> )
<i>Pds1</i>	1954	470	94% - PDS ( <i>Prunus armeniaca</i> )
<i>Lcyb1</i>	2016	505	98% - LCYB ( <i>Eriobotrya japonica</i> )
<i>Lcyb2</i>	1713	496	76% - LCYB ( <i>Actinidia chinensis</i> )

\* Porcentaje de identidad basado en el 100% de la secuencia problema.

\*\* Se incluye en esta tabla el gen *Psy1* del cual no se encontraron evidencias de expresión mediante EST y cuya inclusión se rige en otros parámetros posteriormente mencionados.

Es importante mencionar, que el gen *Psy3* y *Psy5* son prácticamente idénticos ya que comparten sobre un 99.5 % de identidad de secuencia nucleotídica (incluyendo más de 1000 pb de la región promotora). Es muy probable que esta igualdad este dada por un mal alineamiento de los cóntigos al momento de ensamblar el genoma. Por ello, para efectos de este Seminario de Titulo, se analizaron ambos genes simultáneamente y se denominaron como *Psy3*. Por otro lado, para el gen *Psy1* no se encontraron evidencias de su expresión mediante las bases de datos de EST utilizadas, pero mediante el análisis *in silico* de su secuencia se observó que posee un promotor bien constituido y que codificaría una proteína potencialmente funcional. Es por ello que este gen fue considerado en los análisis de expresión en este Seminario de título. En la **Figura 3** se ilustra la estructura de cada gen (intrones, exones y regiones no traducibles) y los sitios en los cuales hibridan los partidores que se utilizaron para los posteriores análisis de expresión génica. En ella se observa que todos los genes *Psy* poseen entre 5 y 6 exones, el gen *Pds* 12 exones y los genes *Lcyb* solo comprenden un exón. Todo esto está de acorde a los genes carotenogénicos descritos en estudios previos realizados en tomate (*S.lycopersicum*), pimentón (*C.annuum*), cebada (*H.vulgare*) y maíz (*Z.mays*), entre otros. (Mann y col., 1994; Fu y col., 2010; Guzman y col., 2010; Rodriguez-Suarez y col., 2011).

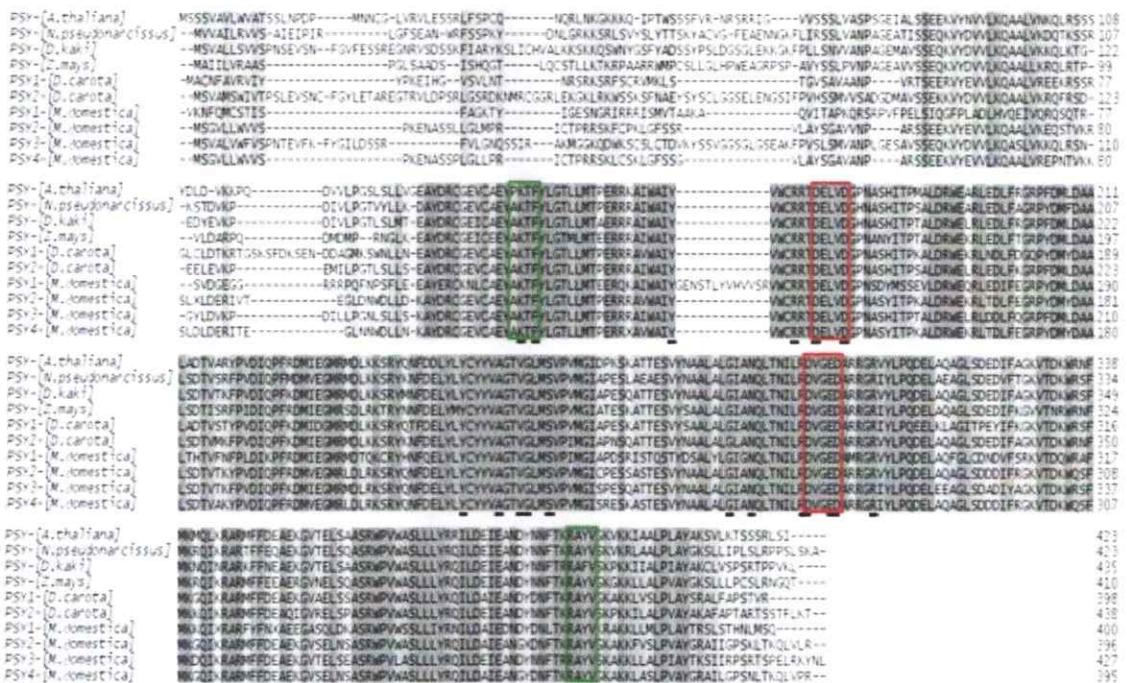


**Figura 3. Estructura de los genes identificados mediante ensamblaje de EST.** En la figura se muestra la estructura de cada gen de acuerdo a las bases de datos de EST utilizadas (KEGG y ESTIMA:Apple). Debajo de cada esquema se indica el nombre asignado al gen. También se muestran los exones probables (flechas naranjas), las regiones no traducibles (líneas verdes) y los sitios en los cuales hibridan los partidores para el análisis de expresión mediante PCR en Tiempo Real (flechas azules).

### 3.1.2 Análisis de la Secuencia Aminoacídica de las Enzimas PSY, PDS y LCYB.

Cada familia de las enzimas codificadas por los genes carotenogénicos analizados (*Psy*, *Pds* y *Lcyb*) se caracteriza por poseer un dominio funcional conservado que permite que ejerza su función biológica en la biosíntesis de carotenoides. Para evaluar si las proteínas codificadas por los genes identificados poseen estos dominios y por ende serían potencialmente funcionales, se realizó un alineamiento de secuencias aminoacídicas utilizando ClustaW. Para cada alineamiento realizado se consideraron proteínas que ya han sido caracterizadas funcionalmente y cuentan con los motivos suficientes para catalizar la reacción enzimática pertinente en cada caso.

En el caso de las enzimas fitoeno sintasa (PSY), todas las proteínas pertenecientes a esta familia génica poseen el dominio funcional de las Trans-Isoprenil Difosfato Sintetas que catalizan la condensación 1'-1 de 2 isoprenil difosfatos de 15 o 20 carbonos (Trans\_IPPS-HH, NCBI - Conserved Domains). En la **Figura 4** se observa el alineamiento de secuencias aminoacídicas de las 4 posibles enzimas PSY de *M. domestica* obtenidas junto con algunos representantes de la familia génica que ya han sido caracterizados funcionalmente. En esta, se indica que todos los genes identificados codifican proteínas que presentan los principales motivos del dominio funcional que caracteriza a una PSY funcional (Gu y col., 1998; Pandit y col., 2000; Tansey y Shechter, 2000). Además, se observa que a nivel del extremo N-terminal, donde se ubica el péptido señal, existe una baja identidad de secuencia. Adicionalmente, se predijo la localización celular de las proteínas mediante la utilización del software TargetP 1.1 en la cual se determinó que al menos en *Psy2* y *4* existe un péptido señal de destinación a plastidios, no obstante, dada la baja conservación de éste, la localización celular debe determinarse mediante análisis *in vivo*.



**Figura 4. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de distintas enzimas codificadas por genes *Psy*.** En la figura se observa el alineamiento de la secuencia aminoacídica de las proteínas codificadas por los 4 genes identificados mediante análisis *in silico* y enzimas PSY como *AtPSY* (Número de acceso en GenBank: AAA32836.1), *NpPSY* (CAA55391.1), *DkPSY* (ACM44688.1), *ZmPSY* (ACY70935.1), *DcPSY1* (DQ192186.1) y *DcPSY2* (DQ192187.1). Además se indican el dominio funcional característico de las enzimas PSY (Trans\_IPPS-HH); las zonas ricas en aspartato (rectángulos rojos), los residuos que cubren el sitio activo (rectángulos verdes) y aquellos residuos que comprenden tanto el sitio activo como el bolsillo de unión al sustrato (subrayados en negro). Aquellos residuos que se encuentran mayormente conservados entre las proteínas analizadas se muestran sobre un fondo gris, a mayor tonalidad de este color mayor es el grado de conservación.

Respecto a las enzimas fitoeno desaturasa (PDS), estas se caracterizan por poseer un dominio funcional que está constituido principalmente por dos zonas, un dominio de unión a dinucleótidos y un dominio de unión a carotenoides, ambos se indican en la **Figura 5**. En ésta, se muestra el alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de la posible enzima PDS de *M. domestica* con enzimas previamente caracterizadas. Si bien existe una alta identidad en secuencia entre los distintos representantes de enzimas PDS, nuevamente existe una baja identidad en la porción N-terminal de las proteínas. Además, la porción C-terminal posee todos los elementos necesarios para sugerir que *Pds* codificaría una proteína

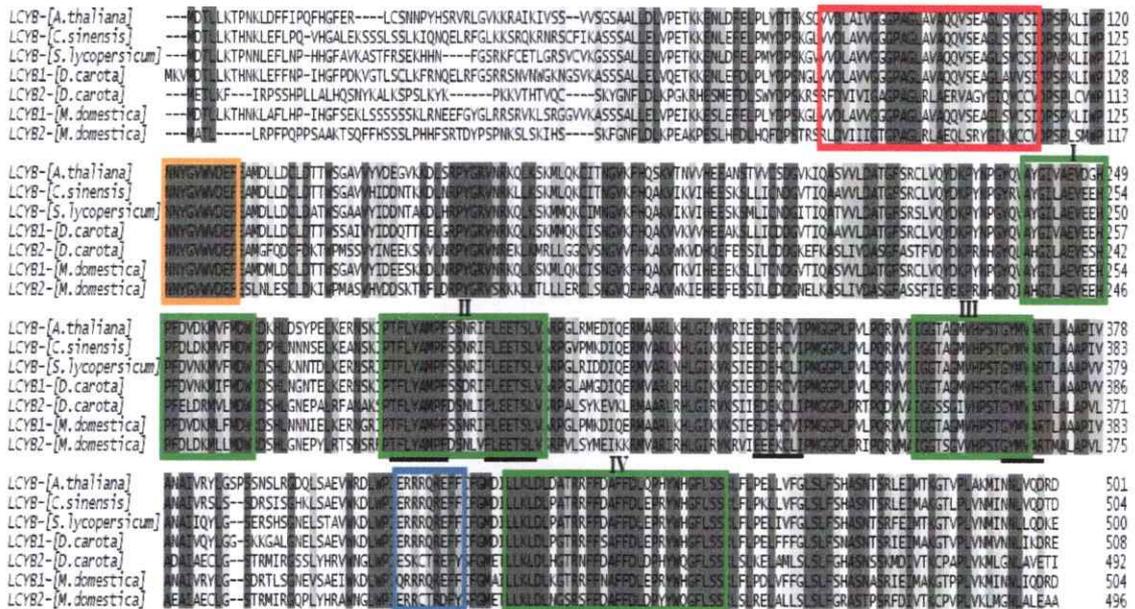
potencialmente funcional (Tuan y col., 2011; Yan y col., 2011). Por otro lado, al predecir su localización celular mediante TargetP 1.1 se determinó que la localización más probable sería a plastidios.



**Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de distintas enzimas codificadas por genes *Pds*.** Se muestra el alineamiento de la secuencia aminoacídica entre las proteínas codificadas por el gen identificado mediante análisis *in silico* y otras enzimas PDS como son: *AtPDS* (AAA20109.1), *NpPDS* (CAA55392.1), *DkPDS* (ACY78343.1), *SlPDS* (CAB59726.1) y *DcPDS* (DQ222429.1). Además se indican los motivos característicos de las enzimas PDS funcionales; un dominio de unión a dinucleótidos (rectángulo rojo) y un dominio de unión a carotenoides (rectángulo verde). Aquellos residuos que se encuentran conservados entre las proteínas analizadas se muestran sobre un fondo gris, a mayor tonalidad de este color mayor es el grado de conservación.

El análisis descrito anteriormente también se realizó con las dos enzimas licopeno  $\beta$ -ciclasas (LCYB) de *M. domestica* identificadas. En la **Figura 6** se muestra el alineamiento de secuencias aminoacídicas con otras licopeno  $\beta$ -ciclasas, y diversos motivos que caracterizan a las ciclasas, en particular a las  $\beta$ -ciclasas. (Hugueney y col., 1995; Cunningham y col., 1996). En la figura, se indica un motivo de unión a dinucleótidos y otros motivos esenciales para la actividad ciclasa que se encuentran en todas las LCYB funcionales de plantas descritas a la

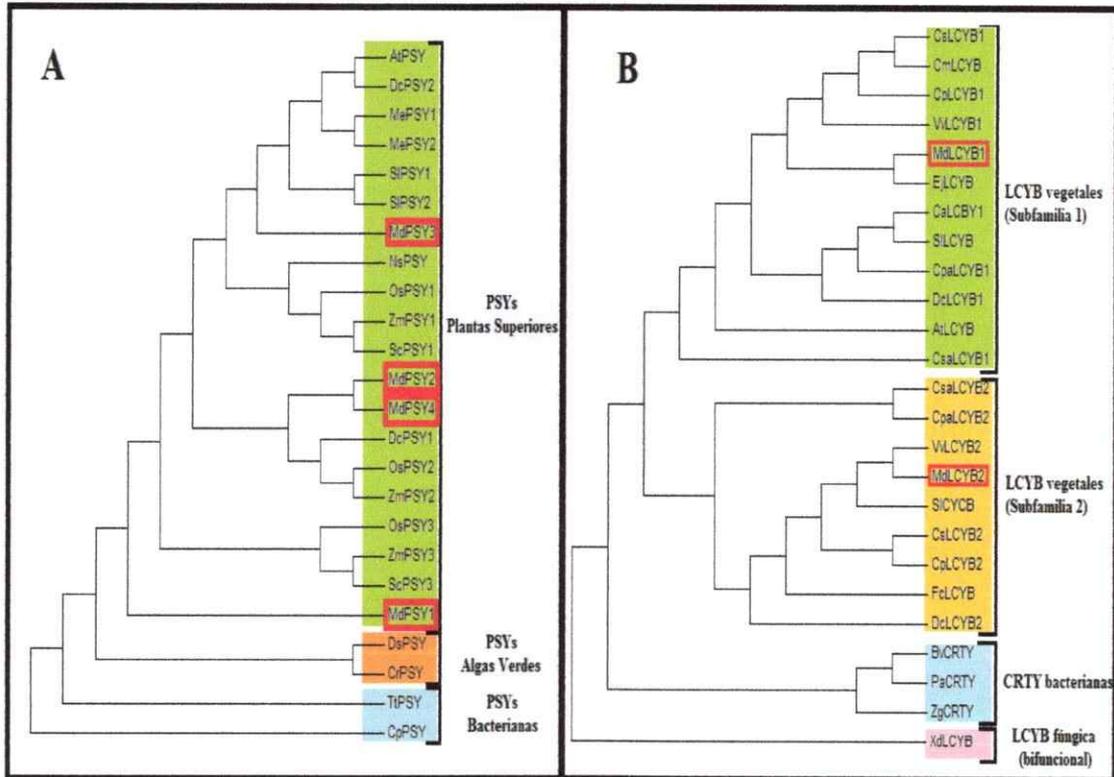
fecha. Al analizar la localización celular de ambas proteínas (LCYB1 y LCYB2) mediante TargetP 1.1, ambas resultaron ubicarse potencialmente en plastidios.



**Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de distintas enzimas codificadas por genes *Lcyb*.** Se muestra el alineamiento de la secuencia aminoacídica entre las proteínas codificadas por los genes *Lcyb* de *M. domestica* y algunos representantes de enzimas LCYB que ya han sido caracterizadas funcionalmente. Las proteínas utilizadas corresponden a; AtLCYB (AEE74874.1), CsLCYB (AEQ29510.1), SlLCYB (CAA60170.1), DcLCYB1 (DQ192190.1) y DcLCYB2 (DQ192191.1). Además, se indican los motivos que caracterizan a una enzima LCYB funcional; un dominio de unión a dinucleótidos (rectángulo rojo), un motivo específico de ciclasas (rectángulo naranja), 4 regiones de alta conservación en ciclasas (rectángulos verdes I-IV) y una región de aminoácidos cargados (rectángulo azul). Adicionalmente, se indican ciertos aminoácidos (línea negra) que han sido descritos como esenciales para la actividad  $\beta$ -ciclasa de la enzima. Aquellos residuos que se encuentran mayormente conservados entre las proteínas analizadas se muestran sobre un fondo gris, a mayor tonalidad de este color mayor es el grado de conservación.

Adicionalmente, se construyeron árboles filogenéticos para dilucidar el origen evolutivo de las distintas enzimas identificadas (Figura 7), dado que para las proteínas PSY y LCYB, este origen puede dar indicios de su función o especificidad. En la Figura 7A, se observan 3 grupos constituidos principalmente por las enzimas PSY provenientes de bacterias, algas verdes y plantas superiores, perteneciendo a este último grupo las 4 PSY identificadas en *M. domestica*.

Además, se observa que PSY3 pertenece a un clado que agrupa a distintas PSY provenientes de dicotiledóneas como *S. lycopersicum*, *A. thaliana*, *D. carota* y *Manihot esculenta*, diferenciado claramente de otro que agrupa a distintas PSY1 provenientes de monocotiledóneas. Por otro lado, PSY2 y PSY4, aparecen en un clado más alejado de los dos mencionados anteriormente que agrupa a representantes de dicotiledóneas (PSY1 de *D. carota*) y monocotiledóneas (PSY2 de *Z. mays* y *O. sativa*) Además, es importante mencionar que ambas aparecen estrechamente relacionadas, ya que comparten cerca de un 93% de identidad de secuencia aminoacídica. También se indica en la figura un clado descrito recientemente que agrupa a enzimas PSY3 provenientes de monocotiledóneas que se caracterizan por estar involucradas en respuestas mediadas por distintos tipos de estrés abiótico (Li y col., 2008; Welsch y col., 2008; Arango y col., 2010). Finalmente y alejada aparentemente de los clados anteriormente descritos, aparece PSY1, sin embargo, dado que esta proteína es codificada por el gen *Psy1*, del cual no se encontró evidencia para determinar su estructura génica completa y por ende, la secuencia utilizada no está validada mediante EST. En la **Figura 7B** se indican las relaciones filogenéticas de las enzimas LCYB1 y LCYB2. En ella se muestra que ambas proteínas predichas pertenecen a un clado que comprende a LCYBs provenientes de plantas superiores alejadas evolutivamente de representantes bacterianos o fúngicos. El clado que agrupa a todas las LCYB vegetales puede ser dividido en dos subfamilias; una cloroplasto-específica y una cromoplasto-específica. Mientras que LCYB1 pareciera ser un miembro de la subfamilia cloroplasto-específica, LCYB2 pertenecería al clado que define a la subfamilia cromoplasto-específica. Respecto a las enzimas PDS existe muy poca información disponible como para asociar una relación filogenética a una especialización o especificidad de la enzima.



**Figura 7. Análisis filogenético de las posibles enzimas PSY y LCYB de *M.domestica*.** En la figura se muestra el árbol filogenético construido con MEGA 5.05 a partir del alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas de los genes *Psy1*, *Psy2*, *Psy3*, *Psy4*, *Lcyb1* y *Lcyb2*. En **A** se muestra el árbol correspondiente a las enzimas PSY, en el cual se indican distintos clados en colores, según el origen de la enzima (Verde: plantas superiores, naranja: algas verdes y celeste: origen bacteriano). En **B** se muestra el árbol correspondiente a las enzimas LCYB y cada clado también ha sido coloreado para indicar el origen de la enzima (Verde: subfamilia 1 vegetal, amarillo: subfamilia 2 vegetal, celeste: origen bacteriano y rosado: origen fúngico). Las posibles proteínas de *M.domestica* pertinentes a este estudio han sido enmarcadas en un rectángulo rojo. Los códigos de acceso para las proteínas utilizadas en la construcción de este árbol se indican en Materiales y Métodos.

### **3.2 Evaluación de la Expresión de los Genes *Psy*, *Pds* y *Lcyb* en Frutos y en Hojas de *M. domestica* cv. *Fuji*.**

Para evaluar la expresión de los distintos genes carotenogénicos identificados mediante el análisis *in silico* se optimizó un protocolo de extracción de ARN a partir de hojas y frutos de manzano en distintos estadios de maduración. Posteriormente y comprobada la calidad del ARN obtenido, se procedió a la síntesis del ADNc que permitió el análisis de expresión tanto tejido específica (fruto y hoja) como temporalmente a través de distintos estadios de desarrollo de fruto mediante qPCR.

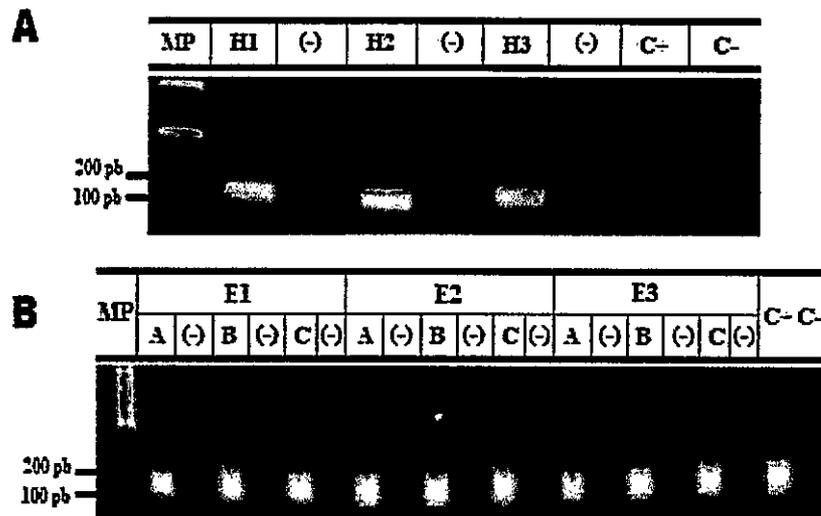
#### **3.2.1 Extracción de ARN Total a partir de Tejidos de *M. domestica***

Se extrajo ARN total tanto de frutos como de hojas utilizando una modificación del protocolo descrito por Meisel y cols. (2005). Posteriormente, se evaluó la cantidad y calidad de éste mediante espectrofotometría y geles de agarosa denaturante, tal y como se describe en Materiales y Métodos. En el caso de frutos, se definieron 3 estadios de maduración: E1, E2 y E3 basados en parámetros que caracterizan la maduración del fruto como; coloración de la piel, días post-antesis y contenido de almidón en el hipanto (**Figura 8**). En cada estadio se consideraron 3 grupos constituidos por 3 frutos cada uno. Respecto a las hojas, se escogieron hojas maduras con características similares en tamaño y color (3 grupos de 3 hojas cada uno).



**Figura 8. Estadios de desarrollo del fruto utilizados en el análisis de expresión génica y composición de carotenoides.** Se indica un fruto representativo de cada estadio de desarrollo. En **E1** se muestra un fruto verde de 127 dpa con una coloración verde en la piel, en **E2** se indica un fruto que comienza su maduración de 168 dpa con una coloración intermedia entre E1 y E3, mientras que en **E3** se muestra un fruto maduro de 211 dpa con una piel rojiza clara sobre un fondo verdoso amarillento, característica de *M.domestica cv Fuji*.

Una vez extraído el ARN total de hojas y frutos se procedió a la síntesis del ADNc. Para verificar tanto la calidad como la uniformidad respecto a la concentración del ADNc de cada muestra, se amplificó mediante PCR un fragmento de 156 pb correspondiente al gen de *actina* de *M. domestica*. En la **Figura 9** se muestra la amplificación homogénea del fragmento en todas las muestras analizadas. Además, se aprecia que ninguna de las muestras de ADNc presenta remanentes de ADN genómico en el ARN total utilizado como molde para la reacción de síntesis de ADNc (Control (-), **Figura 9A y B**). Los ADNc tanto de hojas como de frutos en estadio E3 se utilizaron en el análisis de expresión diferencial entre frutos y hojas de *M. domestica*, mientras que los ADNc provenientes de distintos estadios de maduración del fruto se utilizaron para observar la expresión de los genes en estudio a través del desarrollo de este tejido.



**Figura 9. Amplificación del gen *actina* desde ADNc de hojas y frutos en distintos estadios de desarrollo.** En la figura se observa un fragmento de aproximadamente 150 pb con una intensidad de banda homogénea entre todas las muestras. **A)** Se observa la amplificación del fragmento de *actina* en todas las muestras de hoja analizadas (H1-H3). **B)** Se observa la amplificación del mismo fragmento para cada uno de los estadios de maduración del fruto estudiados (E1-E3) con sus respectivas replicas biológicas (A-C). (-): control negativo en el que se ha utilizado ARN tratado con DNAsa I como molde de la reacción de PCR. C-: Sin agregar ADNc a la reacción y C+: Muestra de ADNc previamente analizado. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb.

### 3.2.2. Análisis de Expresión de los Genes *Psy*, *Pds* y *Lcyb* en Frutos Maduros y Hojas de *M. domestica*.

Para evaluar la expresión de los genes carotenogénicos mediante qPCR, se diseñaron partidores específicos a cada uno de ellos (Tabla II, además se indica la región amplificada en la Figura 3). En una primera instancia se evaluó la cantidad relativa del ARNm de cada uno de estos genes para comparar su expresión en hojas y frutos maduros de manzano (Estadio E3). En la Figura 10 se ilustra la comparación entre la expresión en hojas y frutos de cada uno de los genes carotenogénicos estudiados (*Psy1*, *Psy2*, *Psy3*, *Psy4*, *Pds*, *Lcyb1* y *Lcyb2*). A través de este análisis se logró concluir que los genes *Psy1*, *Psy2* y *Lcyb2*, se expresan preferentemente en frutos de manzano. Estos 3 genes se expresan

alrededor de 4 a 6 veces más en el hipanto de frutos maduros que en hojas de *M. domestica* (Figura 10A, B y G respectivamente). Por el contrario los genes *Psy3*, *Psy4* y *Lcyb1*, se expresan preferencialmente en hojas de manzano. Con relación a estos, *Psy3* se expresa alrededor de 4 veces más en hojas que en frutos, *Psy4* aproximadamente 6 a 7 veces y *Lcyb1* entre 2 y 3 veces (Figura 10C, D y F respectivamente). Por último, respecto al gen *Pds* se encontró que no existían diferencias significativas respecto a su expresión al compararla en hojas y frutos (Figura 10E). También se compararon los niveles de expresión de todos los genes recién descritos en una sola figura (Figura 11) de tal manera de poder determinar cuáles transcritos son más abundantes en hojas y fruto maduro. En ésta se observa que el caso de los genes *Psy*, los mensajeros más abundantes corresponden a los genes *Psy2* y *Psy3*, mientras que la expresión de los genes *Psy1* y *Psy4* es alrededor de 3 y 2 ordenes menor, respectivamente. Por otro lado, respecto a la abundancia de los transcritos de los genes *Lcyb1* y *Lcyb2* solo se observa la expresión diferencial en ambos tejidos ya mencionada anteriormente, pero los niveles de transcritos de ambos genes se encuentran dentro del mismo orden de magnitud. Además, es importante mencionar que de todos los genes analizados, el gen *Pds* correspondió al transcrito más abundante en ambos tejidos analizados (Frutos en estadio E3 y hojas).

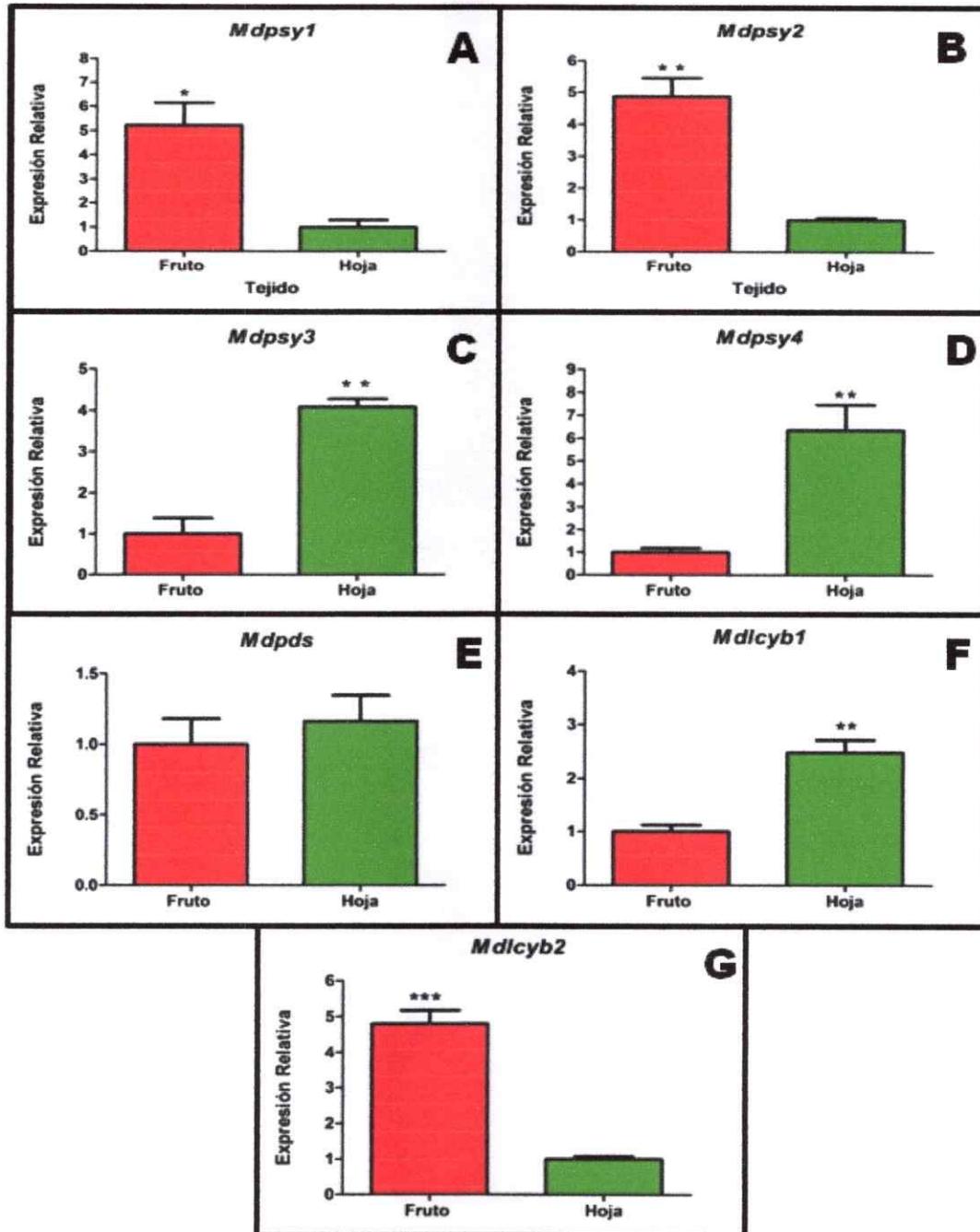
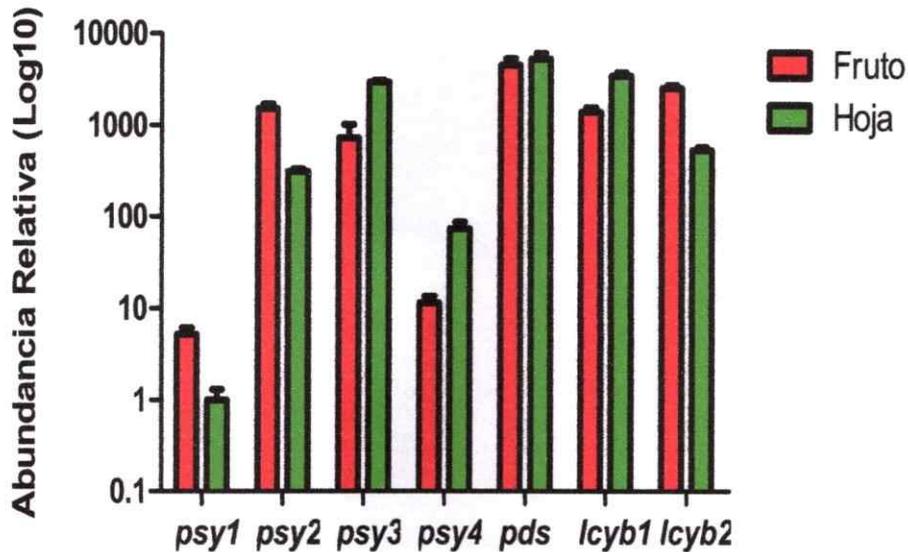


Figura 10. Niveles de expresión de los distintos genes *Psy*, *Pds* y *Lcyb* de *M. domestica* en hojas y frutos maduros. A-G: Expresión de los genes carotenogénicos *Psy1*, *Psy2*, *Psy3*, *Psy4*, *Pds*, *Lcyb1* y *Lcyb2* respectivamente, cada valor corresponde al promedio de 3 replicas biológicas, donde cada replica está constituida por una mezcla de tres tejidos (frutos u hojas) provenientes de árboles distintos. Los valores de expresión relativa fueron normalizados respecto al gen *actina* y en cada grafico se utilizó como calibrador el gen que poseía menor expresión independientemente del tejido. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor comparando siempre fruto y hoja, esta diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

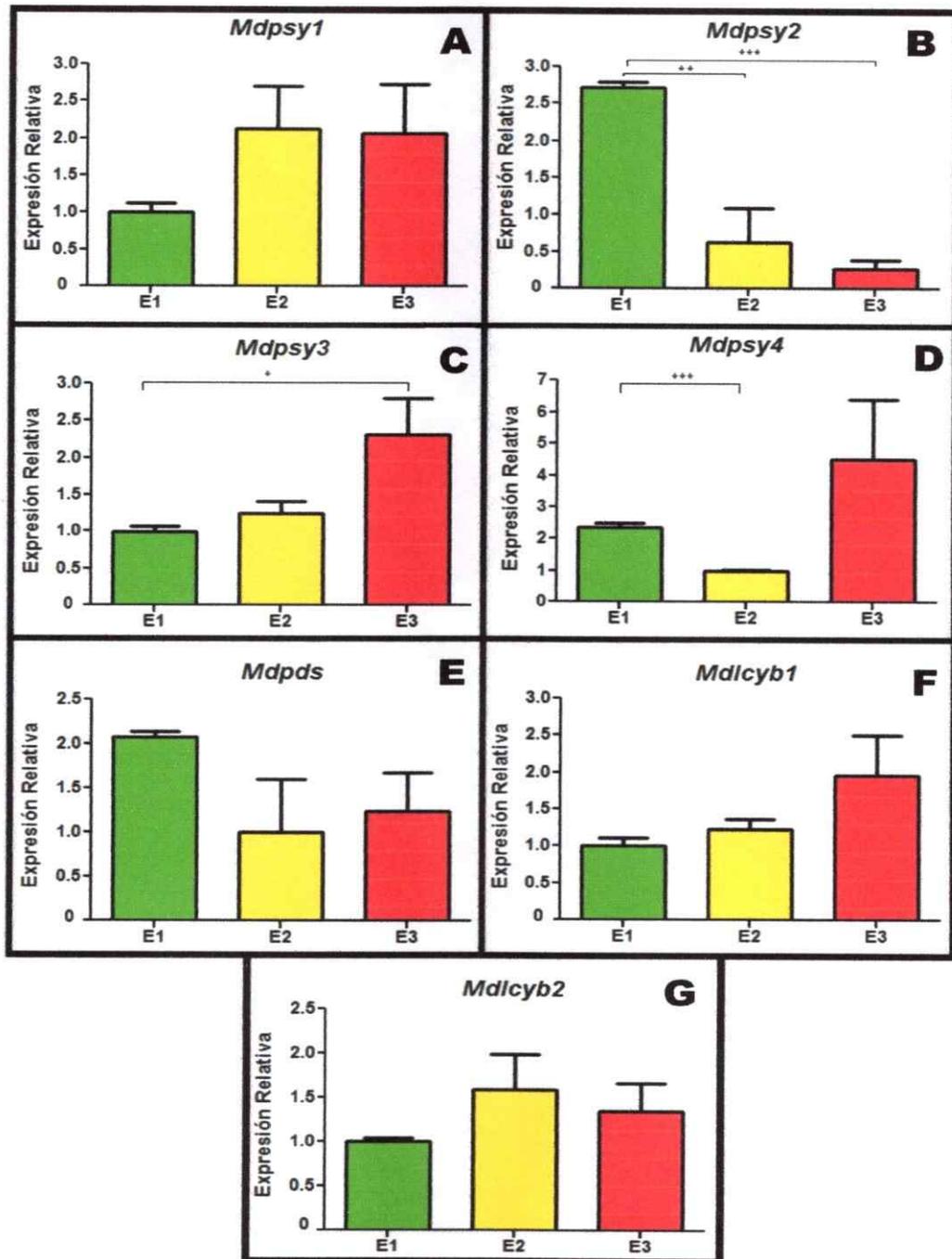


**Figura 11** Expresión relativa de los transcritos de los genes *Psy*, *Pds* y *Lcyb* en diferentes tejidos de *M. domestica*. En la figura se muestran los niveles de expresión relativa de los mensajeros de los genes carotenogénicos identificados en este estudio tanto en frutos maduros como hojas. Los niveles de transcrito se normalizaron respecto a la expresión del gen de *actina* y se utilizó como calibrador la expresión en hoja de *Psy1*. Los valores representan el promedio de 3 replicas, cada una de estas corresponde a una mezcla de 3 tejidos provenientes de plantas distintas pero seleccionadas bajo el mismo criterio. El análisis estadístico entre tejidos para cada uno de los genes, se indica en la figura 10.

### 3.2.3. Análisis de Expresión de los Genes *Psy*, *Pds* y *Lcyb* en distintos Estadios de Desarrollo del Fruto de *M.domestica*.

Dado que la acumulación de pigmentos carotenoides en frutos está asociada generalmente a una regulación transcripcional de los genes involucrados en la biosíntesis de estos, se evaluó mediante qPCR la expresión de los genes carotenogénicos de *M. domestica* en distintos estadios de maduración de fruto (**Figura 12**). Respecto a los genes *Pds*, *Lcyb1* y *Lcyb2* (**Figura 12E, F y G**, respectivamente) no se observaron cambios significativos respecto a su expresión durante el desarrollo del fruto. Por otro lado, en la mayoría de los genes *Psy* se observó una regulación transcripcional, ya sea de forma negativa o positiva, durante el desarrollo del fruto. Por un lado, la expresión de los genes *Psy2* y *Psy4*

disminuye 5 veces y 1 vez en el estadio E2 comparado con E1, respectivamente. En el primer caso esta disminución se mantiene hasta el estadio E3 (**Figura 12B**), mientras que en el caso de *Psy4*, no existe evidencia suficiente para afirmar que esa disminución se mantenga o varíe en E3 (**Figura 12D**). En *Psy3* también existe una variación en los niveles de expresión, no obstante, en este caso existe un aumento de 2 a 3 veces en la cantidad de transcrito presente en E3 al ser comparada con E1 (**Figura 12C**). Finalmente, en el caso de *Psy1* no se observaron diferencias significativas en sus niveles de expresión durante los distintos estadios analizados. Nuevamente, al comparar la expresión de todos los genes durante el desarrollo de frutos de manzano se pudo observar la abundancia relativa de cada transcrito (**Figura 13**). Respecto a esto, si bien existe una disminución en la expresión en los genes *Psy2* y *Psy4* (en este último caso esta disminución es de E1 a E2), la cantidad relativa de transcrito de *Psy2* es mucho mayor que la cantidad de *Psy4*. Además *Psy2* corresponde al gen con mayores niveles de expresión en el estadio E1 de frutos de manzano (fruto inmaduro verde), sin embargo, a medida que el fruto madura los niveles de transcrito disminuyen alrededor de 5 veces. Por el contrario en el caso de *Psy3*, se mencionó que existía una tendencia de aumento en su expresión a medida que el fruto maduraba, este aumento lleva los niveles de expresión del gen a valores similares que los genes *Psy2*, *Pds*, *Lcyb1* y *Lcyb2*. Por último, y como se mencionó en la **figura 11**, los niveles de expresión de los genes *Psy1* y *Psy4* también son muy bajos al ser comparados con el resto de los genes carotenogénicos identificados en *M. domestica* en los distintos estadios de maduración de fruto.



**Figura 12.** Niveles de expresión relativa de los genes *Psy*, *Pds* y *Lcyb* de *M. domestica* durante la maduración del fruto. E1, E2 y E3: corresponden a los distintos estadios de maduración del fruto descritos en la figura 6. **A-G:** Expresión de los genes carotenogénicos *Psy1*, *Psy2*, *Psy3*, *Psy4*, *Pds*, *Lcyb1* y *Lcyb2* respectivamente, cada valor corresponde al promedio de 3 replicas biológicas, donde cada replica está constituida por una mezcla de tres frutos provenientes de árboles distintos. Los valores de expresión relativa fueron normalizados respecto al gen *actina* y en cada grafico se utilizó como calibrador el gen que poseía menor expresión. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los estadios señalados, estas diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

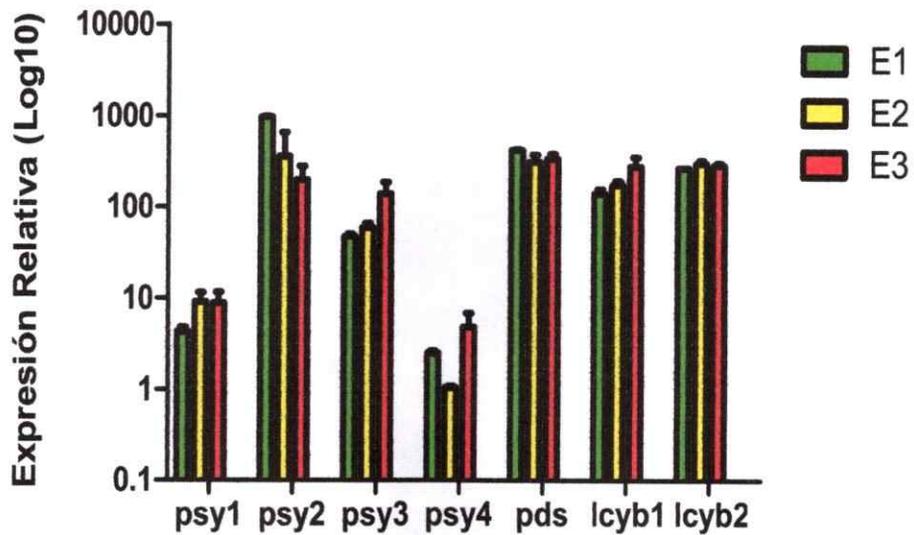


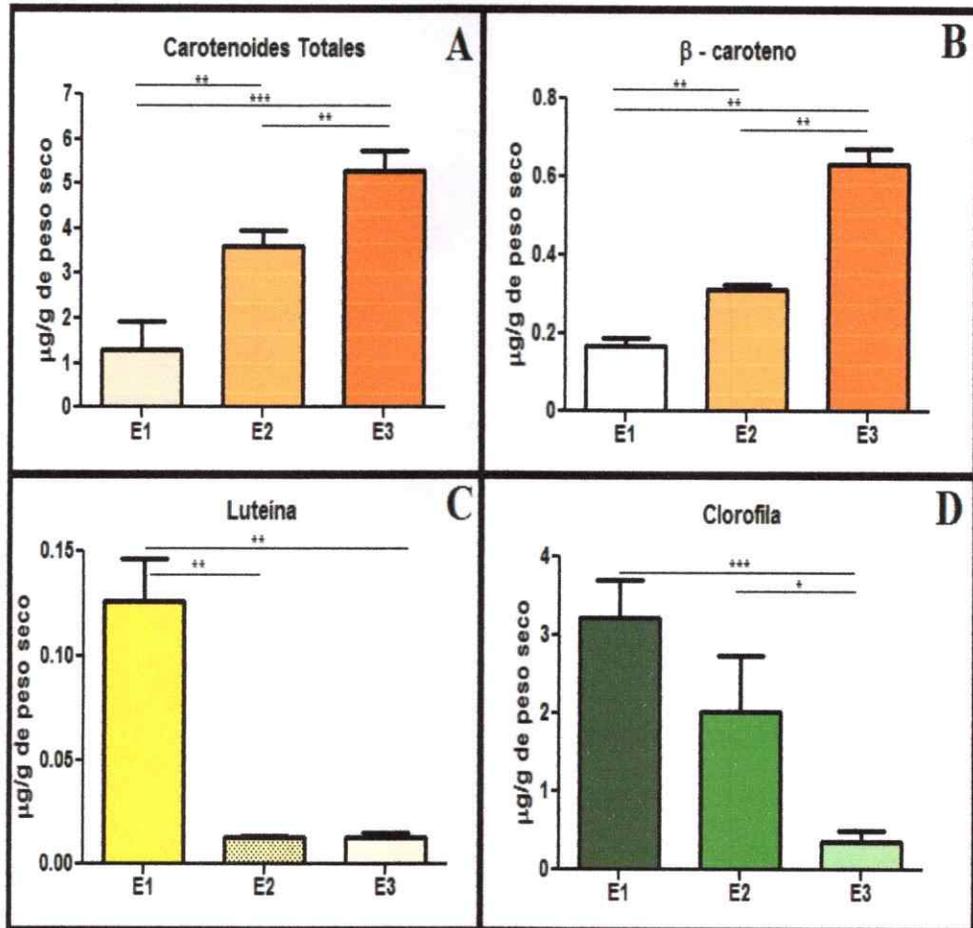
Figura 13. Expresión relativa de los transcritos de los genes *Psy*, *Pds* y *Lcyb* durante el desarrollo de frutos de *M. domestica*. En la figura se muestran los niveles de expresión relativa de los genes *Psy*, *Pds* y *Lcyb* durante los distintos estadios de desarrollo de fruto analizado (E1, E2 y E3). Los niveles de transcrito se normalizaron respecto a la expresión del gen de actina (*MdActin*) y se utilizó como calibrador la expresión en fruto en estadio E1 de *Psy1*. Los valores representan el promedio de 3 replicas, cada una de estas corresponde a una mezcla de 3 frutos provenientes de plantas distintas pero seleccionadas bajo el mismo criterio.

### 3.3. Determinación del Contenido de Pigmentos Carotenoides en Frutos de *M.domestica*.

Para conocer la composición y concentración de pigmentos carotenoides en el hipanto de frutos de *M.domestica* se realizó una extracción de pigmentos, la cuantificación de carotenoides totales mediante espectrofotometría y la determinación de la concentración de algunos de los principales compuestos carotenoides (Luteína y  $\beta$ -caroteno) mediante HPLC (Figura 14). Este objetivo se realizó con el fin de observar si existe una correlación entre los niveles de expresión de los genes carotenogénicos en frutos de manzano (*Psy1*, *Psy2*, *Psy3*, *Psy4*, *Pds*, *Lcyb1* y *Lcyb2*) y la concentración de algunos de los principales compuestos carotenoides a través de la maduración del fruto.

En la figura 14 se puede observar que al cuantificar los carotenoides totales (carotenos y xantófilas en este caso particular) se evidencia un incremento que correlaciona positivamente con el estadio de maduración del fruto, comenzando con 1 a 2  $\mu\text{g/g}$  de peso seco en E1 y alcanzando valores cercanos a los 5 a 6  $\mu\text{g/g}$  de peso seco en E3 (Figura 14A). Este incremento también se puede observar en uno de los principales pigmentos carotenoides, el  $\beta$ -caroteno, cuya concentración aumenta alrededor de 3 veces en E3 al ser comparado con un estadio E1 alcanzando valores cercanos a los 0.6  $\mu\text{g/g}$  de peso seco (Figura 14B). En una rama opuesta a la del  $\beta$ -caroteno en la ruta de biosíntesis de carotenoides se encuentra la luteína, cuya concentración presenta un correlación inversa con el desarrollo del fruto (Figura 14C), disminuyendo alrededor de 15 veces en el estadio E2 y sosteniendo esa disminución hasta E3. Por otro lado, también se cuantificó la clorofila presente en el fruto a través de su desarrollo por tener una estrecha relación funcional con los carotenoides (Figura 14D) y se observó que existía una disminución progresiva de esta cantidad de pigmento a medida que el fruto

maduraba, disminución que va desde los 3 a 4  $\mu\text{g/g}$  de peso seco hasta menos de 1  $\mu\text{g/g}$  de peso seco en el ultimo estadio de maduración de fruto evaluado.



**Figura 14. Concentración de pigmentos en distintos estadios de desarrollo de frutos de *M.domestica*.** Evaluación mediante espectrofotometría y HPLC de la composición y concentración de pigmentos durante la maduración del fruto de manzano. Cada barra corresponde a la cuantificación del determinado carotenoide utilizando 3 muestras compuestas de tres frutos distintos cada una. Los estadios de maduración E1, E2 y E3 corresponden a los señalados en la figura 6. **A:** Cantidad de carotenoides totales (carotenos y xantófilas), **B:** Cantidad de  $\beta$ -caroteno, **C:** Cantidad de luteína y **D:** Cantidad de clorofila, incluyendo clorofila a y b. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los estadios señalados, estas diferencias se determinaron por un test de T de dos colas, no pareado. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Identificación de las Secuencias Nucleotídicas de los Genes *Psy*, *Pds* y *Lcyb* en *M. domestica*.

El principal objetivo de este trabajo es entregar una primera aproximación al proceso de carotenogenesis en *M.domestica*, centrándose para ello en uno de los principales puntos de regulación en esta ruta; la regulación de la transcripción génica de genes claves en este proceso (*Psy*, *Pds* y *Lcyb*) y la correlación de ésta con la abundancia de pigmentos carotenoides en el hipanto. En el caso de los genes *Psy* y *Pds*, estos fueron seleccionados por su particularidad de ser descritos en diversos modelos vegetales como las principales etapas limitantes en la producción de pigmentos carotenoides (Hirschberg, 2001; Fraser y Bramley, 2004; Cazzonelli y Pogson, 2010). Además, PDS posee la particularidad de ser la primera enzima en participar en la síntesis de un pigmento coloreado en la ruta, razón por la cual ha sido objeto de múltiples investigaciones que buscan manipular el contenido de carotenoides en especies vegetales (Mann y col., 1994; Li y col., 1996; Zhu y col., 2002; Kim y col., 2012). Por otro lado, la inclusión del gen *Lcyb* recae en responsabilidad directa en la síntesis de  $\beta$ -caroteno, el carotenoide que ha reportado mayor beneficio para la salud humana a la fecha (Haskell, 2012; Horcajada y Offord, 2012; Kabat y col., 2012).

Para lograr este objetivo, la primera aproximación consistió en utilizar el reciente borrador del genoma de *M.domestica* para identificar los genes de interés en este Seminario de Título. Dada la condición de "borrador" de esta información, uno de los mayores problemas fue discriminar la información proveniente del ensamblaje erróneo de los contigs. Es por esto que se descartó la utilización de programas capaces de predecir estructura génica (exones e intrones) y se optó principalmente por el uso de librerías de expresión, como es el caso de bases de

datos de EST. Una clara alusión a este problema se puede observar al comparar las **Tablas IV y V**, ya que la primera tabla es generada utilizando aquellos programas que predicen patrones de estructura génica, mientras que la segunda es una tabla generada utilizando librerías de secuencias de expresión (EST). Al comparar ambas tablas podemos observar en primera instancia que en la **Tabla IV** aparece un número mayor de genes candidatos, sin embargo, muchos de éstos poseen una longitud de transcrito menor a lo descrito en la literatura o carecen de los sitios necesarios para inferir que la enzima codificada es capaz de cumplir una función biológica. Por otro lado al construir una tabla que complementa la información del genoma de *M. domestica* con librerías de expresión (**Tabla V**), se observa una considerable disminución de los posibles genes potencialmente funcionales, en donde además la mayoría de los genes descritos poseen una longitud de transcrito acorde a la literatura y además el porcentaje de identidad de secuencia aminoacídica con enzimas provenientes de otras especies, aumenta considerablemente, dando cuenta de una mejor representatividad en esta predicción. Esta última idea es reforzada, por el hecho de que las especies que aparecen con un mayor porcentaje de identidad a las enzimas codificadas en manzano en la **Tabla V**, corresponden en gran parte a especies del género *Eriobotrya*, *Fragaria* y *Prunus*, géneros representativos de la familia Rosaceae, cosa que no sucede con la predicción entregada por GDR en la **Tabla IV**. A pesar de esto, *Psy1* y *Lcyb2*, no poseen un alto porcentaje de identidad de secuencia con enzimas de la misma familia, lo que se puede explicar en el caso de *Psy1* teniendo en cuenta que corresponde al único gen del cual no se tenía evidencia de su expresión en *M. domestica* y se utilizó un criterio distinto para su inclusión en este trabajo.

Por otro lado, otro hecho importante de mencionar es la identidad de secuencia nucleotídica entre el gen *Psy3* y *Psy5* (> 99.5%), que si bien puede ser producto de una duplicación génica ancestral, también puede deberse a un error de ensamblaje cometido debido a la alta complejidad del genoma de *M. domestica*. Esta hipótesis se apoya en el origen evolutivo del manzano, pues el contenido génico y el orden de los cromosomas ensamblados, sugiere que han ocurrido dos eventos de duplicación del genoma, una antigua y otra reciente en términos evolutivos (Velasco y col., 2010). Además, ciertas zonas del genoma se repiten 6 veces, dando a entender que al parecer *M. domestica* posee un ancestro hexaploide (Giovannoni, 2010). Si bien estos datos pueden apoyar la teoría de duplicación génica, la extensión de la alta identidad nucleotídica entre ambos genes (gran parte de la zona promotora) podría sugerir que este primer borrador de genoma posee aún errores de ensamblaje debido al alto número de zonas duplicadas. Respecto a lo mismo llama la atención también, la alta similitud entre las secuencias nucleotídicas de los genes *Psy2* y *Psy4* (cercana al 90%), pues debido a esto para el análisis de su expresión en tejidos de manzano se debió utilizar parte de su región 5' no traducible (Figura 3), región en donde eran claramente distinguibles uno del otro, hecho que no sucedió con los genes *Psy3* y *Psy5*.

Ahora bien, en nuestro laboratorio y con el objetivo de demostrar la funcionalidad de las enzimas codificadas por los genes predichos, se utiliza *Escherichia coli* como sistema de expresión heteróloga de enzimas carotenogénicas. Para realizar esto es un requisito tener información certera de la secuencia de los genes a estudiar, y bajo este contexto los genes *Lcyb1* y *Lcyb2* se aislaron a partir de ADNc de *M. domestica* observándose una alta correlación entre el gen predicho y la secuencia obtenida luego de ser clonada y secuenciada (Díaz,

2013), demostrando la certeza en la predicción de estructura génica realizada en este trabajo.

#### **4.2. Expresión de los Genes *Psy*, *Pds* y *Lcyb* en Frutos y Hojas de *M.domestica*.**

En primera instancia, se evaluó la expresión de los genes *Psy*, *Pds* y *Lcyb* en la pulpa o hipanto de frutos y hojas maduras. Esto principalmente debido a que cuando existe más de un gen que codifica para isoenzimas carotenogénicas, se ha reportado la expresión órgano específica de éstas, vinculando su expresión a su función en hojas o frutos (Fraser y col., 1994; Ronen y col., 1999; Mendes y col., 2011). En el caso particular del tomate (*S.lycopersicum*) por ejemplo, los genes *Psy1* y *Lcyb1* están vinculados a la síntesis de carotenoides en tejidos verdes, como la hoja, mientras que *Psy2* y *Cycb* (nombre que recibe el gen *Lcyb* cromoplástico en tomate) a flores y frutos (Fraser y col., 1999; Giorio y col., 2008). Además, el bajo contenido de carotenoides en el hipanto (6 µg/g de peso seco en E3, **Figura 14A**), podría deberse a bases genéticas, de las cuales asoma como principal responsable la regulación transcripcional de los genes codificantes de las enzimas limitantes en la carotenogénesis (Ampomah-Dwamena y col., 2012).

Tomando en cuenta estos antecedentes recién mencionados, se analizó la expresión de los genes carotenogénicos identificados en frutos maduros y en hojas maduras, dado que en los cloroplastos de tejidos fotosintéticamente activos es donde los carotenoides cumplen una función esencial (Ritz y col., 2000; Koyama y col., 2004; Bode y col., 2009) y por lo tanto, los genes deben ser expresados. Este análisis, corroboró algunas de las observaciones realizadas en el análisis filogenético de las posibles enzimas PSY y LCYB de *M. domestica* (**Figura 7**). En este árbol, se observó que LCYB1 pertenecía a una subfamilia cloroplasto-específica, mientras que LCYB2, pertenecería al clado que define a la subfamilia

cromoplasto-específica, plastidios encontrados en órganos sumideros, como el fruto. Al realizar el análisis de expresión de los genes *Lcyb* en ambos tejidos (Figura 10F y G), se vio que *Lcyb1* poseía una mayor expresión en hojas maduras, mientras que *Lcyb2* en frutos, resultados consecuentes con lo visto anteriormente en el árbol filogenético.

En el caso de los genes *Psy*, también se encontró una expresión diferencial entre hojas y frutos maduros. Respecto a los genes *Psy2* y *Psy4*, a pesar de compartir un origen evolutivo muy similar (Figura 7) y que se refleja en una alta identidad de secuencia aminoacídica (> 93 %), presentan un patrón de expresión muy diferente. Pues, mientras que *Psy2* se expresa preferentemente en frutos, *Psy4* lo hace en hojas (figura 10B y D). *Psy1* comparte una expresión preferencial en frutos junto a *Psy2* (Figura 10A), no obstante, los niveles de transcrito de este gen son despreciables en comparación a las otras *Psy* de *M. domestica* (Figura 11), y es importante recordar que este gen fue el único del cual no se tenía evidencia alguna de expresión mediante las bases de datos utilizadas. Esto en particular, puede haber sido desencadenado por una predicción incorrecta de la estructura génica, hecho que es reflejado tanto en el bajo porcentaje de identidad de secuencia con otras proteínas en comparación a las otras PSY de *M. domestica* (Tabla V) como a lo alejado evolutivamente que se encuentra la proteína codificada del resto de PSY descritas en la literatura, pues constituye un clado único sin referentes aparentes (Figura 7). Una de las posibles explicaciones a la mala predicción de la estructura génica de *Psy1* es que en ninguna de las librerías de EST utilizadas consideraba la expresión de genes en *M. domestica* bajo condiciones de estrés abiótico (Sequía, salinidad o altas/bajas temperaturas). Esto puede ser un factor relevante dado que existe un grupo especializado de genes *Psy*, al cual podría pertenecer *Psy1*, descritos en especies monocotiledóneas como

sorgo, maíz y arroz (Li y col., 2008) cuya expresión solo aumenta bajo condiciones de estrés abiótico. Además, si bien esta expresión diferencial fue inicialmente descrita para especies monocotiledóneas también ha sido descrita para especies dicotiledóneas como la yuca (*M. esculenta*)(Arango y col., 2010).

Si bien la expresión de los genes *Psy1* y *Psy4* es considerablemente menor que la de los genes *Psy2* y *Psy3* (Figura 11 y 13), no podemos sólo con estos resultados hablar de una menor relevancia biológica desde el punto de vista de la carotenogénesis, pues es necesario primero demostrar que las enzimas codificadas por estos genes sean funcionales.

Respecto al gen *Pds*, no se observaron cambios significativos al comparar hojas y frutos maduros (Figura 10E) y durante los distintos estadios de maduración analizados (Figura 12E) Por lo tanto, la característica de ser la única copia en el genoma de *M. domestica* y la expresión constante durante la maduración del fruto pero comparable a la expresión en hojas maduras, hacen de *Pds* un candidato poco probable a representar un factor limitante en la biosíntesis de carotenoides en hipanto de manzanas.

#### **4.3. Contenido de Carotenoides y Expresión de Genes Carotenogénicos durante la Maduración del Fruto en *M.domestica*.**

Para buscar explicaciones al bajo contenido de carotenoides en el hipanto de manzanas, se evaluó si existía correlación entre el contenido de carotenoides y la expresión de los genes carotenogénicos durante distintos estadios de maduración de este fruto. Esto debido a que existen tejidos de reserva como frutos (Naranja y Tomate), semillas (Trigo y Maíz) y raíces modificadas (Zanahoria y Yuca) en los cuales el aumento en el contenido carotenogénico de éstos, durante la maduración del tejido, se correlaciona con un aumento de la transcripción de los

genes de la ruta carotenogénica (Fraser y col., 1994; Alquezar y col., 2008; Clotault y col., 2008; Li y col., 2008; Vallabhaneni y Wurtzel, 2009; Welsch y col., 2010).

Respecto a esto, los datos obtenidos mediante HPLC y espectrofotometría mostraron una tendencia al aumento en el contenido de carotenoides totales durante la maduración de la manzana (**Figura 14A**). Los pigmentos de mayor concentración en el hipanto correspondieron a luteína, clorofila (a y b) y  $\beta$ -caroteno alcanzando valores aproximados de 0.3, 0.01 y 0.6  $\mu\text{g/g}$  de peso seco en el último estadio evaluado, correspondiente a un fruto completamente maduro (**Figura 14**). Mientras que en los dos primeros, se observó una disminución progresiva a medida que maduraba el fruto (**Figura 14C y D**), en el caso particular de  $\beta$ -caroteno, se observó una correlación positiva con el proceso de maduración (**Figura 14B**). Este aumento de  $\beta$ -caroteno, correlaciona también con el aumento en los carotenoides totales (6  $\mu\text{g/g}$  de peso seco en E3, **Figura 14A**). En consecuencia con esto, el aumento de carotenoides durante el desarrollo del fruto podría relacionarse con la regulación transcripcional positiva del gen *Psy3* (**Figura 12C**), reforzando en cierta manera la hipótesis que establece la importancia de los genes *Psy* y la regulación de la ruta de biosíntesis de carotenoides en *M.domestica*. Esta correlación entre niveles de expresión de genes *Psy* y contenido carotenogénico ya ha sido reportada previamente en otros tejidos como raíz de zanahoria (Stange y col., 2008), naranjas (Rodrigo y col., 2004), limones (Kato y col., 2004) y tomate (Namitha y col., 2011), entre otros. Sin embargo, esta regulación no es capaz de reflejarse en un aumento visible de los pigmentos en el hipanto de manzanas (**Figura 14**). Además, *Psy2*, de expresión preferente en frutos, disminuye su expresión durante la maduración, en conjunto a *Psy4* (**Figura 12B y D**), por lo que otras razones, distinta a la regulación transcripcional, podrían dar cuenta de la baja cantidad de pigmentos en el hipanto de manzana. Ahora bien, las actividades de las enzimas PSY2, PSY3 y PSY4

también podrían explicar la baja cantidad de pigmentos en el hipanto, especialmente de PSY2, pues es el transcrito de ésta el que se transcribe preferencialmente en frutos y cuya expresión disminuye alrededor de 5 a 6 veces respecto al estadio E1 (Figura 12B). Por otro lado, al analizar la expresión de *Psy1*, *Pds1*, *Lcyb1* y *Lcyb2* durante el desarrollo del fruto, no se observó regulación alguna sobre el nivel de transcrito de estos genes (Figura 12A, E, F y G), de manera de evidenciar alguna correlación entre los niveles de transcrito y los niveles de pigmentos carotenoides en la pulpa de la manzana.

El aumento en la producción de  $\beta$ -caroteno en desmedro de luteína, durante la maduración del fruto (Figura 14C) puede relacionarse a la disminución de la expresión de *Lcye*, la cual ya fue reportado recientemente (Ampomah-Dwamena y col., 2012). Mientras que, la disminución progresiva de clorofila durante la maduración, puede ser explicada por la disminución de GGPP disponible, pues GGPP es un precursor común a otras vías de biosíntesis como; giberelinas, tocoferoles y clorofilas (Botella-Pavia y col., 2004). Por lo tanto, PSY podría estar desviando el flujo de metabolitos preferencialmente hacia la ruta de biosíntesis de carotenoides y al mismo tiempo disminuyendo la disponibilidad de estos para la ruta de biosíntesis de clorofilas, explicando el comportamiento de este último durante la maduración del fruto de *M.domestica*.

#### 4.4 Carotenogénesis en Frutos de *M. Domestica*.

En vista de los resultados se proponen algunas hipótesis para explicar el bajo contenido de pigmentos carotenoides en la manzana. Una de ellas se basa en la regulación transcripcional de los genes *Psy* durante la maduración del fruto, pues la enzima PSY corresponde al primer paso en la biosíntesis de carotenoides y en plantas como *A.thaliana* y tomate (*S.lycopersicum*) ha sido reportada como el paso limitante de la vía de síntesis y que define a grandes rasgos el contenido de carotenoides final del tejido en donde están presentes (Fraser y col., 2007; Rodriguez-Villalon y col., 2009; Cazzonelli y Pogson, 2010). Además, se ha encontrado que PSY, mediante retroalimentación positiva, regula los niveles de 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP) que a su vez es capaz de producir los precursores necesarios para la ruta de biosíntesis de carotenoides (Rodriguez-Villalon y col., 2009). No obstante, la regulación de la transcripción no es el único factor que podría explicar la baja cantidad de carotenoides en el hipanto de la manzana, pues aún falta evidencia respecto a la regulación post traduccional y la actividad de las enzimas carotenogénicas. Relacionado a esto, el gen *Lcyb2* se expresa constante y preferentemente en fruto, sin embargo, recientemente en nuestro laboratorio hemos demostrado mediante complementación heteróloga que solo LCYB1 pareciera ser funcional y no así LCYB2 (Díaz, 2013), lo cual podría responder en parte la evidente limitación en la formación de  $\beta$ -caroteno en el fruto.

Por otro lado, las concentraciones finales de carotenoides en un tejido también dependerán de tasa de recambio de estos pigmentos, la cual es explicada por la síntesis y por la degradación de los carotenoides en un tejido. Esto implica que existe la posibilidad de que éstos sean degradados a apocarotenoides y quede por lo tanto sólo un remanente en el hipanto de manzana. Asimismo, existen diversas publicaciones que han descrito que si la actividad de las enzimas que

degradan carotenoides, las carotenoide dioxigenasas (CCDs) es baja o disminuye la expresión de los genes *Ccd*, los niveles de carotenoides aumentan significativamente (Floss y col., 2008; Campbell y col., 2010; Brandi y col., 2011). Por lo tanto la medición de los niveles de expresión de esta familia génica junto con la actividad de las enzimas codificadas es una posibilidad aun no explorada completamente.

Adicionalmente a lo expuesto, en un estudio realizado en paralelo a este Seminario de Título en el cual se analizaron diversas especies de manzanas con fenotipos contrastantes respecto a la acumulación de pigmentos carotenoides e incluyendo variedades comerciales como "Royal Gala" y "Granny Smith", se detectó que la baja expresión del gen *Crtiso* correlaciona con el bajo contenido de carotenoides en el fruto (Ampomah-Dwamena y col., 2012). Este gen es responsable de codificar la enzima encargada de la isomerización a all-trans-licopeno, no obstante, al analizar el contenido de carotenoides en hipanto de manzanas, no se observaron cantidades cuantificables del precursor cis-licopeno (Datos no mostrados), unos de los requerimientos para demostrar que la actividad enzimática de CRTISO corresponde a un paso limitante en la carotenogenesis de *M. domestica* durante la maduración del fruto. Además, en este mismo estudio se menciona que la expresión de los genes *Psy* pareciera no mostrar una correlación evidente con el contenido de carotenoides en frutos. Esto afecta directamente una de nuestras hipótesis, sin embargo, en esta última investigación los genes fueron analizados utilizando partidores consenso que permitían evaluar la expresión global de los genes *Psy*, por lo que existe un claro enmascaramiento del efecto individual de cada uno de los genes *Psy* por separado (Ampomah-Dwamena y col., 2012).

Por último, si bien el contenido de  $\beta$ -caroteno en la pulpa de la manzana aumenta durante la maduración, los niveles alcanzados son muy bajos en

comparación a otras especies (Tabla I), ya que considerando el contenido de agua de la manzana, el contenido de  $\beta$ -caroteno alcanza los 0.09  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco en el hipanto. Estos valores son muy similares a los niveles de  $\beta$ -caroteno encontrados en *Fragaria*  $\times$  *ananassa* (frutilla) y *Solanum tuberosum* (papa), correspondiendo a 0.07 y 0.06  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco respectivamente. Esto es especialmente interesante, debido a que en el caso de *S.tuberosum*, se ha logrado aumentar considerablemente el contenido de pigmentos carotenoides totales y  $\beta$ -caroteno en sus tubérculos (20 y 3600 veces aproximadamente), utilizando los genes bacterianos que codifican para las enzimas PSY, PDS y LCYB (Diretto y col., 2007). Además, existen variedades no comerciales de manzanas como la variedad "Aotea", que poseen altas concentraciones de pigmentos carotenoides en el hipanto, lo que también da a entender que la capacidad de acumular carotenoides en manzanas fue seleccionada negativamente a través del fito-mejoramiento clásico al cual ha sido sometida *M. domestica*. Estos antecedentes, ponen de manifiesto que una estrategia similar podría ser utilizada en el caso de manzanas y apoyan la estrategia utilizada en el proyecto FONDEF denominado "Uso de Ingeniería Metabólica para el desarrollo de plántulas de manzano que poseen genes para la síntesis de vitamina A y antioxidantes en los frutos" bajo el cual se enmarca este Seminario de Título. Finalmente, toda la información aquí expuesta otorga una posible hipótesis respecto al bajo contenido carotenogénico en el hipanto de manzanas, y aporta valiosa información para establecer la mejor plataforma biotecnológica que permita un aumento de carotenoides en el hipanto de manzanas Fuji, de manera de generar un alimento funcional que además de entregar los beneficios propios de este fruto, suministre los beneficios nutricionales de los carotenoides.

## 5. CONCLUSIONES

- El origen evolutivo de *M. domestica* predispone a la idea de múltiples copias para los genes pertenecientes a la ruta de biosíntesis de carotenoides. Sin embargo, dentro de los genes estudiados esto solo sucede con los genes *Psy* (4 copias), sugiriendo una especialización de los parálogos que ha prevalecido frente a la presión selectiva. Mientras que para los genes *Pds* y *Lcyb* se encontraron 1 y 2 copias respectivamente.
- La mayoría de los genes estudiados poseen una expresión diferencial en los tejidos analizados (hoja y fruto). Pero, solo los genes *Psy* varían su expresión durante la maduración del fruto, esto apoya la idea de una especialización de los parálogos encontrados.
- En particular la expresión del gen *Psy3* posee una correlación positiva con el contenido de carotenoides durante la maduración del fruto. No obstante, esta regulación transcripcional no es capaz de reflejarse en un aumento significativo de los pigmentos en el hipanto (0,06 mg/g de peso seco).
- La regulación transcripcional negativa sobre *Psy2* y *Psy4* podría estar atenuando la acumulación de pigmentos carotenoides durante la maduración del fruto.
- La regulación de los genes *Psy* puede dar cuenta de una posible explicación al bajo contenido carotenogénico presente en el hipanto de la manzana y la información expuesta en este trabajo será muy útil a la hora de escoger futuros candidatos para el aumento del contenido de carotenoides en el hipanto de frutos de manzano.

## 6. PROYECCIONES

- Realizar ensayos de funcionalidad con las enzimas PSY, PDS y LCYB, mediante complementación heteróloga para dar robustez a este análisis de expresión.
- Sobreexpresar de manera fruto-específica los genes en *Malus domestica* para una alternativa comercial nacional cisgénica de una manzana con altos niveles de carotenoides.
- Estudiar los elementos regulatorios involucrados en esta expresión diferencial de los genes *Psy* durante la maduración del fruto

## 7. REFERENCIAS

- Akiyama K, Ogasawara S, Ito S, Hayashi H (2010) Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol* **51**: 1104-1117
- Alba R, Payton P, Fei Z, McQuinn R, Debbie P, Martin GB, Tanksley SD, Giovannoni JJ (2005) Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell* **17**: 2954-2965
- Alquezar B, Rodrigo MJ, Zacarias L (2008) Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant Cara Cara. *Phytochemistry* **69**: 1997-2007
- Altincicek B, Kovacs JL, Gerardo NM (2012) Horizontally transferred fungal carotenoid genes in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Biol Lett* **8**: 253-257
- Aluru M, Xu Y, Guo R, Wang Z, Li S, White W, Wang K, Rodermeil S (2008) Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *J Exp Bot* **59**: 3551-3562
- Ampomah-Dwamena C, Dejnopratt S, Lewis D, Sutherland P, Volz RK, Allan AC (2012) Metabolic and gene expression analysis of apple (*Malus domestica*) carotenogenesis. *J Exp Bot* **63**: 4497-4511
- Ampomah-Dwamena C, McGhie T, Wibisono R, Montefiori M, Hellens RP, Allan AC (2009) The kiwi fruit lycopene beta-cyclase plays a significant role in carotenoid accumulation in fruit. *J Exp Bot* **60**: 3765-3779
- Andersen C, Jensen J, Orntoft T (2004) Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research* **64**: 5245-5250
- Arango J, Wust F, Beyer P, Welsch R (2010) Characterization of phytoene synthases from cassava and their involvement in abiotic stress-mediated responses. *Planta* **232**: 1251-1262
- Auldrige ME, McCarty DR, Klee HJ (2006) Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 315-321
- Bai L, Kim EH, DellaPenna D, Brutnell TP (2009) Novel lycopene epsilon cyclase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis. *Plant J* **59**: 588-599
- Barrero JM, Rodriguez PL, Quesada V, Alabadi D, Blazquez MA, Boutin JP, Marion-Poll A, Ponce MR, Micol JL (2008) The ABA1 gene and carotenoid biosynthesis are required for late skotomorphogenic growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **31**: 227-234
- Ben-Amotz A, Fishier R (1998) Analysis of carotenoids with emphasis on 9-cis  $\beta$ -carotene in vegetables and fruits commonly consumed in Israel. *Food Chemistry* **62**
- Beyer P, Al-Babilli S, Ye X, Lucca P, Schaub P, Welsch R, Potrykus I (2002) Golden Rice: introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *J Nutr* **132**: 506S-510S
- Bhosale P, Bernstein PS (2005) Microbial xanthophylls. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 445-455
- Bode S, Quentmeier CC, Liao PN, Hafi N, Barros T, Wilk L, Bittner F, Walla PJ (2009) On the regulation of photosynthesis by excitonic interactions between carotenoids and chlorophylls. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 12311-12316
- Bone RA, Landrum JT (2010) Dose-dependent response of serum lutein and macular pigment optical density to supplementation with lutein esters. *Arch Biochem Biophys* **504**: 50-55

- Botella-Pavia P, Besumbes O, Phillips MA, Carretero-Paulet L, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M (2004)** Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J* **40**: 188-199
- Bouvier F, Rahier A, Camara B (2005)** Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res* **44**: 357-429
- Brandi F, Bar E, Mourgues F, Horvath G, Turcsi E, Giuliano G, Liverani A, Tartarini S, Lewinsohn E, Rosati C (2011)** Study of 'Redhaven' peach and its white-fleshed mutant suggests a key role of CCD4 carotenoid dioxygenase in carotenoid and norisoprenoid volatile metabolism. *BMC Plant Biol* **11**: 24
- Britton G (1995)** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* **9**: 1551-1558
- Campbell R, Ducreux LJ, Morris WL, Morris JA, Suttle JC, Ramsay G, Bryan GJ, Hedley PE, Taylor MA (2010)** The metabolic and developmental roles of carotenoid cleavage dioxygenase4 from potato. *Plant Physiol* **154**: 656-664
- Carretero-Paulet L, Cairo A, Botella-Pavia P, Besumbes O, Campos N, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M (2006)** Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Mol Biol* **62**: 683-695
- Cazzonelli CI, Pogson BJ (2010)** Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* **15**: 266-274
- Cazzonelli CI, Roberts AC, Carmody ME, Pogson BJ (2010)** Transcriptional control of Set domain group 8 and carotenoid isomerase during *Arabidopsis* development. *Mol Plant* **3**: 174-191
- Clotault J, Peltier D, Berruyer R, Thomas M, Briard M, Geoffriau E (2008)** Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *J Exp Bot* **59**: 3563-3573
- Collins AR (1999)** Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* **21**: 238-246
- Cordoba E, Salmi M, Leon P (2009)** Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *J Exp Bot* **60**: 2933-2943
- Covington MF, Maloof JN, Straume M, Kay SA, Harmer SL (2008)** Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol* **9**: R130
- Cunningham FX, Gantt E (1998)** Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 557-583
- Cunningham FX, Jr., Pogson B, Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D, Gantt E (1996)** Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* **8**: 1613-1626
- Dall'Osto L, Cazzaniga S, North H, Marion-Poll A, Bassi R (2007)** The *Arabidopsis* aba4-1 mutant reveals a specific function for neoxanthin in protection against photooxidative stress. *Plant Cell* **19**: 1048-1064
- Dall'Osto L, Lico C, Alric J, Giuliano G, Havaux M, Bassi R (2006)** Lutein is needed for efficient chlorophyll triplet quenching in the major LHCII antenna complex of higher plants and effective photoprotection *in vivo* under strong light. *BMC Plant Biol* **6**: 32
- Deruere J, Bouvier F, Steppuhn J, Klein A, Camara B, Kuntz M (1994)** Structure and expression of two plant genes encoding chromoplast-specific proteins: occurrence of partially spliced transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* **199**: 1144-1150

- Deruere J, Romer S, d'Harlingue A, Backhaus RA, Kuntz M, Camara B (1994)** Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *Plant Cell* **6**: 119-133
- Dfáz G (2013)** Identificación de genes que codifican para la enzima licopeno  $\beta$ -ciclase en *M. domestica* y su evaluación por expresión heteróloga en *E.coli*. Tesis de Pregrado para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular Facultad de Ciencias Universidad de Chile
- Diretto G, Al-Babill S, Tavazza R, Papacchioli V, Beyer P, Giuliano G (2007)** Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. *PLoS One* **2**: e350
- Facella P, Lopez L, Carbone F, Galbraith DW, Giuliano G, Perrotta G (2008)** Diurnal and circadian rhythms in the tomato transcriptome and their modulation by cryptochrome photoreceptors. *PLoS One* **3**: e2798
- Floss DS, Schliemann W, Schmidt J, Strack D, Walter MH (2008)** RNA interference-mediated repression of MtCCD1 in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula* causes accumulation of C27 apocarotenoids, shedding light on the functional role of CCD1. *Plant Physiol* **148**: 1267-1282
- Fraser PD, Bramley PM (2004)** The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* **43**: 228-265
- Fraser PD, Enfissi EM, Halket JM, Truesdale MR, Yu D, Gerrish C, Bramley PM (2007)** Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell* **19**: 3194-3211
- Fraser PD, Klano JW, Truesdale MR, Schuch W, Bramley PM (1999)** Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Mol Biol* **40**: 687-698
- Fraser PD, Schuch W, Bramley PM (2000)** Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts--partial purification and biochemical properties. *Planta* **211**: 361-369
- Fraser PD, Truesdale MR, Bird CR, Schuch W, Bramley PM (1994)** Carotenoid Biosynthesis during Tomato Fruit Development (Evidence for Tissue-Specific Gene Expression). *Plant Physiol* **105**: 405-413
- Fu Z, Yan J, Zheng Y, Warburton M, Crouch J, Li J-S (2010)** Nucleotide diversity and molecular evolution of the *Psy1* gene in *Zea mays* compared to some other grass species. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* **120**: 709-720
- Fuentes P (2011)** Identificación y análisis estructural y funcional de los promotores de los genes carotenogénicos *Psy2* y *Lcyb1* de *Daucus carota*. Tesis de Magister para optar al título de Magister en ciencias biológicas Facultad de Ciencias Universidad de Chile
- Fuentes P, Pizarro L, Moreno JC, Handford M, Rodriguez-Concepcion M, Stange C (2012)** Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Mol Biol* **79**: 47-59
- Galpaz N, Wang Q, Menda N, Zamir D, Hirschberg J (2008)** Abscisic acid deficiency in the tomato mutant high-pigment 3 leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content. *Plant J* **53**: 717-730
- Gardner MJ, Hubbard KE, Hotta CT, Dodd AN, Webb AA (2006)** How plants tell the time. *Biochem J* **397**: 15-24
- Glorio G, Stigliani AL, D'Ambrosio C (2007)** Agronomic performance and transcriptional analysis of carotenoid biosynthesis in fruits of transgenic HighCaro and control tomato lines under field conditions. *Transgenic Res* **16**: 15-28

- Giorio G, Stigliani AL, D'Ambrosio C** (2008) Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *FEBS J* **275**: 527-535
- Giovannoni J** (2001) Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 725-749
- Giovannoni J** (2010) Harvesting the apple genome. *Nat Genet* **42**: 822-823
- Grotewold E** (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 761-780
- Gu P, Ishii Y, Spencer TA, Shechter I** (1998) Function-structure studies and identification of three enzyme domains involved in the catalytic activity in rat hepatic squalene synthase. *J Biol Chem* **273**: 12515-12525
- Guzman I, Hamby S, Romero J, Bosland PW, O'Connell MA** (2010) Variability of Carotenoid Biosynthesis in Orange Colored Capsicum spp. *Plant Sci* **179**: 49-59
- Hadley CW, Miller EC, Schwartz SJ, Clinton SK** (2002) Tomatoes, lycopene, and prostate cancer: progress and promise. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**: 869-880
- Hannoufa A, Hossain Z** (2012) Regulation of carotenoid accumulation in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **1**
- Haskell MJ** (2012) The challenge to reach nutritional adequacy for vitamin A: beta-carotene bioavailability and conversion--evidence in humans. *Am J Clin Nutr* **96**: 1193S-1203S
- Hirschberg J** (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 210-218
- Holden M, Eldrige A, Beecher G, Buzzard I, Bhagwat S, Davis C, Douglass L, Gebhardt S, Haytowitz D, Schakel S** (1999) Carotenoid Content of U.S. Foods: An Update of the Database. *Journal of Food Composition and Analysis* **12**
- Horcajada MN, Offord E** (2012) Naturally plant-derived compounds: role in bone anabolism. *Curr Mol Pharmacol* **5**: 205-218
- Howitt CA, Pogson BJ** (2006) Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ* **29**: 435-445
- Huguenev P, Badillo A, Chen HC, Klein A, Hirschberg J, Camara B, Kuntz M** (1995) Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annum* chromoplasts. *Plant J* **8**: 417-424
- Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, Rolland N** (2009) Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Mol Plant* **2**: 1154-1180
- Kabat GC, Kim MY, Sarto GE, Shikany JM, Rohan TE** (2012) Repeated measurements of serum carotenoid, retinol and tocopherol levels in relation to colorectal cancer risk in the Women's Health Initiative. *Eur J Clin Nutr* **66**: 549-554
- Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M** (2004) Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol* **134**: 824-837
- Kim J, DellaPenna D** (2006) Defining the primary route for lutein synthesis in plants: the role of *Arabidopsis* carotenoid beta-ring hydroxylase CYP97A3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3474-3479
- Kim J, Smith JJ, Tian L, Dellapenna D** (2009) The evolution and function of carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **50**: 463-479
- Kim JE, Cheng KM, Craft NE, Hamberger B, Douglas CJ** (2010) Over-expression of *Arabidopsis thaliana* carotenoid hydroxylases individually and in combination with a beta-carotene ketolase provides insight into in vivo functions. *Phytochemistry* **71**: 168-178

- Kim MJ, Kim JK, Kim HJ, Pak JH, Lee JH, Kim DH, Choi HK, Jung HW, Lee JD, Chung YS, Ha SH (2012) Genetic Modification of the Soybean to Enhance the beta-Carotene Content through Seed-Specific Expression. *PLoS One* **7**: e48287
- Kita M, Kato M, Ban Y, Honda C, Yaegaki H, Ikoma Y, Moriguchi T (2007) Carotenoid accumulation in Japanese apricot (*Prunus mume Siebold & Zucc.*): molecular analysis of carotenogenic gene expression and ethylene regulation. *J Agric Food Chem* **55**: 3414-3420
- Koyama Y, Rondonuwu FS, Fujii R, Watanabe Y (2004) Light-harvesting function of carotenoids in photo-synthesis: the roles of the newly found 1(1)Bu- state. *Biopolymers* **74**: 2-18
- Krinsky NI, Johnson EJ (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* **26**: 459-516
- Laur LM, Tian L (2011) Provitamin A and vitamin C contents in selected California-grown cantaloupe and honeydew melons and imported melons. *Journal of Food Composition and Analysis* **24**: 194-201
- Li F, Vallabhaneni R, Wurtzel ET (2008) *Psy3*, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the *Poaceae* and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiol* **146**: 1333-1345
- Li F, Vallabhaneni R, Yu J, Rocheford T, Wurtzel ET (2008) The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiol* **147**: 1334-1346
- Li ZH, Matthews PD, Burr B, Wurtzel ET (1996) Cloning and characterization of a maize cDNA encoding phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Mol Biol* **30**: 269-279
- Lichtenthaler HK (1999) The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 47-65
- Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV VIS Spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*
- Lois LM, Rodriguez-Concepcion M, Gallego F, Campos N, Boronat A (2000) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J* **22**: 503-513
- Lopez AB, Yang Y, Thannhauser TW, Li L (2008) Phytoene desaturase is present in a large protein complex in the plastid membrane. *Physiol Plant* **133**: 190-198
- Maass D, Arango J, Wust F, Beyer P, Welsch R (2009) Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS One* **4**: e6373
- Mann V, Harker M, Pecker I, Hirschberg J (2000) Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nat Biotechnol* **18**: 888-892
- Mann V, Pecker I, Hirschberg J (1994) Cloning and characterization of the gene for phytoene desaturase (*Pds*) from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Mol Biol* **24**: 429-434
- Maronedze C, Thomas LA (2012) Apple hypanthium firmness: new insights from comparative proteomics. *Appl Biochem Biotechnol* **168**: 306-326
- Meier S, Tzfadia O, Vallabhaneni R, Gehring C, Wurtzel ET (2011) A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Syst Biol* **5**: 77

- Mendes AF, Chen C, Gmitter FG, Jr., Moore GA, Costa MG (2011)** Expression and phylogenetic analysis of two new lycopene beta-cyclases from *Citrus paradisi*. *Physiol Plant* **141**: 1-10
- Merzlyak M, Solovchenko A (2002)** Photostability of pigments in ripening apple fruit: a possible photoprotective role of carotenoids during plant senescence. *Plant Science* **163**
- Millar AJ (2004)** Input signals to the plant circadian clock. *J Exp Bot* **55**: 277-283
- Misawa N (2011)** Pathway engineering for functional isoprenoids. *Curr Opin Biotechnol* **22**: 627-633
- Moehs CP, Tian L, Osteryoung KW, Dellapenna D (2001)** Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Mol Biol* **45**: 281-293
- Moran NA, Jarvik T (2010)** Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science* **328**: 624-627
- Namitha KK, Archana SN, Negi PS (2011)** Expression of carotenoid biosynthetic pathway genes and changes in carotenoids during ripening in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Food Funct* **2**: 168-173
- North HM, De Almeida A, Boutin JP, Frey A, To A, Botran L, Sotta B, Marion-Poll A (2007)** The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J* **50**: 810-824
- Pandit J, Danley D, Schulte G, Mazzalupo S, Pauly T, Hayward C, Hamanaka E, Thompson J, Harwood H (2000)** Crystal structure of human squalene synthase. A key enzyme in cholesterol biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* **275**: 30610-30617
- Pfaffl M (2001)** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: 2002-2007
- Pott I, Breithaupt DE, Carle R (2003)** Detection of unusual carotenoid esters in fresh mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Kent'). *Phytochemistry* **64**: 825-829
- Ritz T, Damjanovic A, Schulten K, Zhang JP, Koyama Y (2000)** Efficient light harvesting through carotenoids. *Photosynth Res* **66**: 125-144
- Rodrigo MJ, Marcos JF, Zacarias L (2004)** Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *J Agric Food Chem* **52**: 6724-6731
- Rodríguez-Concepcion M (2010)** Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Arch Biochem Biophys* **504**: 118-122
- Rodríguez-Concepcion M, Ahumada I, Díez-Juez E, Sauret-Gueto S, Lois LM, Gallego F, Carretero-Paulet L, Campos N, Boronat A (2001)** 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant J* **27**: 213-222
- Rodríguez-Suarez C, Atienza SG, Piston F (2011)** Allelic variation, alternative splicing and expression analysis of *Psy1* gene in *Hordeum chilense* Roem. et Schult. *PLoS One* **6**: e19885
- Rodríguez-Urbe L, Guzman I, Rajapakse W, Richins RD, O'Connell MA (2012)** Carotenoid accumulation in orange-pigmented *Capsicum annuum* fruit, regulated at multiple levels. *J Exp Bot* **63**: 517-526
- Rodríguez-Villalon A, Gas E, Rodríguez-Concepcion M (2009)** Colors in the dark: a model for the regulation of carotenoid biosynthesis in etioplasts. *Plant Signal Behav* **4**: 965-967
- Rodríguez-Villalon A, Gas E, Rodríguez-Concepcion M (2009)** Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* **60**: 424-435

- Romer S, Fraser PD (2005) Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta* **221**: 305-308
- Ronen G, Cohen M, Zamir D, Hirschberg J (1999) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *Plant J* **17**: 341-351
- Ruiz-Sola M, Rodríguez-Concepción M (2012) Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **10**
- Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY (1999) Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J* **20**: 401-412X
- Simkin AJ, Gaffe J, Alcaraz JP, Carde JP, Bramley PM, Fraser PD, Kuntz M (2007) Fibrillin influence on plastid ultrastructure and pigment content in tomato fruit. *Phytochemistry* **68**: 1545-1556
- Skelton RL, Yu Q, Srinivasan R, Manshardt R, Moore PH, Ming R (2006) Tissue differential expression of lycopene beta-cyclase gene in papaya. *Cell Res* **16**: 731-739
- Sogi DS, Siddiq M, Roidoung S, Dolan KD (2012) Total phenolics, carotenoids, ascorbic acid, and antioxidant properties of fresh-cut mango (*Mangifera indica L., cv. Tommy Atkin*) as affected by infrared heat treatment. *J Food Sci* **77**: C1197-1202
- Stange C, Flores C (2012) Carotenoids and Photosynthesis. Regulation of Carotenoid Biosynthesis by Photoreceptors. Ed. Mohammad Mahadi N. INTECH
- 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
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731-2739
- Tansey T, Shechter I (2000) Structure and regulation of mammalian squalene synthase. *Biochimica et biophysica acta* **1529**: 49-62
- Thompson AJ, Jackson AC, Parker RA, Morpeth DR, Burbidge A, Taylor IB (2000) Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol* **42**: 833-845
- Tuan P, Kim J, Kim H, Lee S, Park N, Park S (2011) Carotenoid accumulation and characterization of cDNAs encoding phytoene synthase and phytoene desaturase in garlic (*Allium sativum*). *J Agr Food Chem.* **59**: 5412-5417
- Umeno D, Tobias AV, Arnold FH (2005) Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 51-78
- Vallabhaneni R, Wurtzel ET (2009) Timing and biosynthetic potential for carotenoid accumulation in genetically diverse germplasm of maize. *Plant Physiol* **150**: 562-572
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troglio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald LM, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell JT, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu VT, King ST, Vick J, Tao Q, Mráz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchietti A, Kater MM, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan AC, Bus V, Chagne D, Crowhurst RN, Gleave AP, Lavezzo E, Fawcett JA, Proost S, Rouze P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens RP, Durel CE, Gutin A, Bumgarner RE,

- Gardiner SE, Skolnick M, Egholm M, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nat Genet* **42**: 833-839
- Vishnevetsky M, Ovadis M, Vainstein A (1999) Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci* **4**: 232-235
- von Lintig J, Welsch R, Bonk M, Giuliano G, Batschauer A, Kleinig H (1997) Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J* **12**: 625-634
- Walter MH, Strack D (2011) Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Nat Prod Rep* **28**: 663-692
- Wan Y, Yang S, Sun F, Wang J, Chen Q, Hong A (2012) All-trans retinoic acid induces chromatin remodeling at the promoter of the mouse liver, bone, and kidney alkaline phosphatase gene in C3H10T 1/2 cells. *Biochem Genet* **50**: 495-507
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**: 1189-1191
- Welsch R, Arango J, Bar C, Salazar B, Al-Babilli S, Beltran J, Chavarrriaga P, Ceballos H, Tohme J, Beyer P (2010) Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene. *Plant Cell* **22**: 3348-3356
- Welsch R, Wust F, Bar C, Al-Babilli S, Beyer P (2008) A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiol* **147**: 367-380
- Woitsch S, Romer S (2003) Expression of xanthophyll biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation. *Plant Physiol* **132**: 1508-1517
- Woodall AA, Britton G, Jackson MJ (1997) Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1336**: 575-586
- Xie X, Yoneyama K (2010) The strigolactone story. *Annu Rev Phytopathol* **48**: 93-117
- Yan P, Gao XZ, Shen WT, Zhou P (2011) Cloning and expression analysis of phytoene desaturase and zeta-carotene desaturase genes in *Carica papaya*. *Mol Biol Rep* **38**: 785-791
- Yeum KJ, Russell RM (2002) Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu Rev Nutr* **22**: 483-504
- Yoneyama K, Awad AA, Xie X, Takeuchi Y (2010) Strigolactones as germination stimulants for root parasitic plants. *Plant Cell Physiol* **51**: 1095-1103
- Zhao X, Aldini G, Johnson EJ, Rasmussen H, Kraemer K, Woolf H, Musaeus N, Krinsky NI, Russell RM, Yeum KJ (2006) Modification of lymphocyte DNA damage by carotenoid supplementation in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* **83**: 163-169
- Zhu C, Yamamura S, Koiwa H, Nishihara M, Sandmann G (2002) cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea*. *Plant Mol Biol* **48**: 277-285

## 8. ANEXOS

### Secuencias nucleotídicas posibles de los genes carotenogénicos identificados.

A continuación se muestran las secuencias nucleotídicas de los genes carotenogénicos identificados. Estas secuencias se obtuvieron por medio de ensamblaje de ESTs utilizando el borrador del genoma de *M. domestica* como referencia. También es indicado el marco de lectura abierto o "ORF" en cada caso (subrayado)

#### Gen *Psy1*

5' ACCCTTTCGAAAAGAAGTAAAAACTTCCAAATGTGTTCTACAATTTCCCTTCGCAGGAAAGACTTACATCGGAG  
AGAGCAATGGAAGAATTCGGCGTCGAATATCTATGGTCACAGCAGCAAAGCTCAAGTGATTACAGTCCCAGCA  
AAGAAGCAGGCCCTGTTTTCTGAGCTTTCGATTCAAGGCTTTCCTCTTGCTGATTTACAGTGCAGAAATCGTT  
CAAAGGCAGTCTCAGACTCGTAGTGTGGACGGGGAAGGCCGGCCGGCCGAGTTC AACCCTAGCTTTCTGTG  
AAGAAGCATATGAGAGGTGCAAGAACCCTTGTGCAGAAATATGCCAAGACATTTCTATCTAGGCACCTTACTTATGAC  
AGAGAGCGCTCAAAGGCAATATGGGCAATCTATGGTGAGAATTC AACTCTCTATGTTTCAATGTAGTATCACGCTGT  
TGGTGTAGGAGGACAGATGAACTGGTGGATGGCCGAATTCGATTACATGAGCTCGGAAGTCTTTGATAGATGGG  
AACAGAGACTGGAAGACATTTTCGAAGGACGGCCTTATGACATGCTTGATGCTGCGCTGACTCATAACCGTTTTTAA  
TTTTCTTTAGACATCAAGCCTTTTCGGGACATGATTGAGGGTATGCGAATGGACACGCAAAAATGCCGATACCAT  
AATTTTCAAGAGCTCTATCTTACTGCTACTATGTGGCAGGACGGTCGGCCTAATGAGTGTTCCTATAATGGGAA  
TTGCACCAGATTTCTCGAATTTCTACTCAAAGTACATATGATTCTGCATTATATTTGGGCATAGGAAACCACTCAC  
AAACATCCTTAGAGATGTTGGAGAGGATGCAATGAGAGGAAGAGTTTATCTTCCCAAGATGAGCTTGGCCAGTTT  
GGGTGTGCGATAACGATGTTTTTTCAAGAAAAGTCACTGATCAATGGAGAGCATTATGAAAAACAGATTAMAA  
GAGCAAGGTTTTATTCAACSTAGCAGAAGAAGGAGCTTCTCAGCTTGATAAGGCTAGCCGTGGCCGGTATGGTC  
ATCGTTACTGATATATCGAACATACTAGACGGATCGAAGACAATGATTACGATAACTTGACAAAAGAGAGCGTAC  
GTAAGAGAGCCAAGAACTTCTCATGCTGCCTTTGGCATACACAAGATCTCTATCAACACATAATTTGATGTCCC  
AATAA 3'

#### Gen *Psy2*

5' ACTGCTTTCAAAACCTTTCGCTTACCTCCAATCTCCATAAGAGARGCCACAACCTCACAGCTCACATACTCACA  
CCCTCACACTCAAACCTAAAACCCAAATGTCAAGTGTCTACTCTGGGTGGTGAGCCCCAAGAGAAATGCCAGCTC  
CCTACTGGGTCTGATGCCAGAAATTCACCCCAAGGAGGTCTAAATTTGCCCCAAGCTGGGATTTTCAAGTAGG  
GTTTTGGCCTACTCGGGTGCAGTTGTAAACCCAGCAAGATCTTCAGAAGAGAAGGTGTATGAGTTGGTCTGAAGC  
AGGCTGCGCTGGTGAAGAACAGAGCACGGTAAAAAGGAAATCTCTGRATTTGGATGAACGGATTGTACTGAAGG  
TTTGGACAACCTGGCATTACTGGATAAGGCTTATGATCGGTGTGGTGAAGTCTGTGCTGAGTATGCCAAAACTTTT  
TACCCTGGGCACATGCTCATGACACCCGAGCGGCACGAGCTGTTGGGCAATCTATGTGTGGTGCAGAAGGACAG  
ATGAGCTAGTGGATGGACCTAATGCTTCATACATTACGCCCAAAGCTCTTGACAGATGGGAGAAAAGACTGACTGA  
TCTCTTTGAAGCCGACCTTACGATATGTATGATGCTGCTCTATCTGATACTGTCACCAAGTACCCTGTTGACATT  
CAGCCCTTCAGAGACATGGTAGAAGGAATGAGATTGACTTGAGGAAGTCAAGATACCAGAACTTTGATGAACCTT  
ACCTTACTGCTACTATGTTGCTGGAAGTGTGGATTGATGAGTGTCCGGTAAATGGGGATATGCCAGAAATCAAG  
CGCCTCAACAGAAAGCGTTTACAATGCTGCATTTGGCCCTTGGAAATGCTAATCAGCTCACTAACATTTCTGAGAGAT  
GTTGGAGAAGATGCTAGGAGAGGAAGAGTATATCTCCCCAAGATGAGCTTGGCCCAAGCCGGCTTATCAGACGATG  
ACATCTTTTCGGGGAAAGGTGACTGCAAGTGGCAAAGTTTCATGAAGGGACAAATAAGAGAGCTAGGATGTTCTT  
TGATGAGCTGAGAAGGTTGCTCAGAGCTCAACTCAGCCAGTAGATGGCCAGTATGGGCATCTTTGTTGCTGTAT  
AGGCAGATTCTAGATGCAATTTGAAGCAATGGTTWTGACAATTTCAAAAAAGGCTTATGTGGGAAAAGCAAAGA  
AGTTTGTATCAATGCCCTGTTGGCCATATGGAAGAGCCATATAGGACCCCTTAAATTAACCTAAGCATTGGTGTCTAG  
ATGAATTAGATGTTTAAATAGATGATATTTGAAGTCTCAATCTTAAATTTTATAGACAAGTCCAACCTGAAGTTG  
GGTCTCAAGTCGAAATATGTAATTTTTTATACTAATTTTTTTTGTAGTCAATCTTTAATTAACCTGCGTGTGG  
ATGATGGATATAAAGTAGTAATTAGTGGTAGAGGTTAATAGATGTGTGGTGAAGTGGTCCGCATGGAGTGGTTG  
ATAGATGTGTAGGGGGGTTAGAGTGTCTCCTAGTGATAAGATGGTAGCAATTTGTGGTTGTGGCATTGGCCGGTGGT  
GATGGTTGTGGAGGTTGGTATGACAGTGTGGTGGATACGGTCCGAATGATGGTGGCAAT 3'

### Gen Psy3

5' AGTGTAAAGACGACAAGGCATATCTGGCTAGAGTTRTTTGGTTGGTGGGCTGAGGTTGGTGYTTTCAAGTTGAA  
ACAAACATGTCCTGTGGCATTAGTTTGGTTTGTTCCTCCCAACACCGAGGTGTTCAAATTCATATGGGATTTTAGATT  
CATCGAGGTTTGTTFGGGGAATCAAAGTTCGATTTAGAGCAAAGATGGGTGGGAAACAGGATTTGAAATCTTGCTC  
TCTCTGCACAGATGTGAAGTATTCATCAGTAGGAGGGTCTGGTTTAGGGAGTGAAGCCAAATTTCCAGTTTCATTA  
AGCATGGTGGCCAAACCCGCTTGAGAAATCAGCTGTCTCGTCCGAACAGAAGGTGTATGACGTGGTGCCTGAAGCAGG  
CATCCCTGGTTAAGAAGCAGTTGAGGTCTAATGGATATCTTGATGTGAAGCCGGATATTCCTCTCCCGGGAATCT  
GAGCTTGTGAGTAAAGCTTATGATCGATGTGGAGAAGTATGTGCAGAGTATGCCAAGACTTTTACCTCGGTACT  
CTGCTTATGACGCCCGAAAGAGAAGGGCCATCTGGGCAATATATGTGTGGTGCAGGAGGACGGATGAGCTTGTG  
ATGGGCCCTAATGCTTACACATAACCCACAGCTTTAGATAGGTGGGAAATTGAGATTGGACGATCTGTTCCAAGG  
TCGTCCATTTGATATGCTTGATGCTGCTTTGTGAGTACCGTCACCAAATTTCCGGTTGACATTCAGCCRTTCAA  
GATATGATTAAGAGGATGAGATGGACTCAGGAGTCAAGATACCAAATTCGATGAACATATCTTTACTGCT  
ATATGTTGCCGGAACTGTTGGATTAAAGAGTGTCCAGTTATGGGCATTTACCTGAATCGCAAGCAACAACAGG  
GAGTGTATATAATGCTGCCCTGGCATTGGGATTCGAATCAGCTAACAAACATACTCCGTGATGTTGGGAGGAG  
TAAGTATAACAACATTAACGATTTATAACTGAACATTTTAGTCATGTTAGCAACATGTTGAAACAAAAGTGCCAA  
AGCTATAGAGTAWCTGGTATATTCAATTTGAAGATAGCTCTGCACAAAGTCTGATATTTTACTGCTTCTTTCCAA  
AGTCACATAAGACTGCAAGACACAATTCCTAATCTTAGTTGAATTAGAGCGAGAGAAGACAGAGATGCAATTTG  
GAATCTTATAACAGACTTCATTCCTCACTCTCTCTTTGATCTCTTACTCTCGATATTAGTACTATGCAAGGAGAGG  
AAGATTTATTTACCCCAAGATGAGCTTGAAGAAGCAGGGCTCTCCGACGCTGATATATATGCTGGAAGGTCACA  
GACAAATGGAGGAGTTTCATGAAGGATCAAATTAAGAGGGCAAGGATGTTCTTCGACGAGGCAGAGAAGGGAGTGA  
CAGAGTTGAGTGAAGCCAGCAGATGGCCGGTATGGCCGCTACTCTCTGATCGCCAAATATTGGACGAGATAGA  
AGCTAACGATTACAACTTCAACAAGAGGGCTTATGTAGCAAAGCTAAGAACTACTTGCCTTGCTATTGGC  
TATACTAAATCGATAATTCGCCCTCAAGAACCTCTCCAGAGCTTAGAAAATACAATCTTTGA 3'

### Gen Psy4

5' TCAAGACCCAAAACCCAAAACCCAAAACCCAGCAGATTAATTATATTTTGGATATGTCAGGTGTTCTTCT  
CTGGGTGGTGAAGTCCCAAAGAGAATGCCAGCTCTCCGCTGGGTCTGTGCGGAGAATTTGCACCCCAAGGAGTCT  
AAATTGTGCTCAAAGCTGGGTTTTTCAAGTGGGTTTTTGGCCTACTCGGGTGCAGTTGCAACCCAGCCAGATCTT  
CAGAGGAGAAGGTGTATGAAGTGGTCTGAAGCAGGCTGCTCTAGTCAGAGAACC GAACACGGTAAAAAAGAAATC  
TTTGGATTGATGAACGGATTACTGAAGGTTGAACAACCTGGGATTTACTGAATAAGGCGTATGACCGGTGTGGT  
GAGGTCTGTGCAGAGTATGCCAAGACTTTTACCTAGGCCGTTTTTCCGGCACACTGAAAAATCTCATCTGCCCTT  
GTAGTTRAGACAACCTGTTAAGGACATGCTCATGACACCGGAGCGGACRAGCTGTTTGGCAATCTATGTGTG  
GTGCAGAAGGACGGATGAGCTAGTGGATGGACCTAATGCTTCATACATTACCCCAAAGCTTTGACAGATGGGAG  
AAAAGACTGACAGATCTCTCGAAGGCCGGCCTTATGATATGTATGATGCTGCTCTATCTGATACAGTCCCAAGT  
ACCTGTGTGACATTCAGCCCTTCAGAGACATGTTAGAAGGAATGAGATTAGACTTGAGAAAATCAAGATACCAGAA  
CTTTGATGAACTTTACCTTTACTGCTACTATGTTGCTGGAACCTTTGGATTGATGAGTGTTCGGTAAATGGGGATA  
TCCCGGAATCAAAGCCCTCAACAGAAAGTGTTTACAATGCTGCATTTGGCCCTTGGAAATGCTAATCAGCTCACTA  
ACATTCAGAGATGTTGGAGAAGATGCTAGGAGAGGAAGGATATATCTCCCAAGACGAGCTTGCCTAAGCCGG  
CCTATCAGACGATGACATCTTTCGGGGAAGGTGACTGACAAGTGGCAAAGTTTCATGAAGGGACAAAATAAGAGA  
GCTAGGATGTTCTTTGATGAGGCTGAGAAGGTTGCTCAGAGCTCAACTCAGCTAGTAGATGGCCAGTATGGCAT  
CTTTGTGCTGTACAGGCAGATTCAGATGCAATTTGAAGCAAATGGTTATGACAATTTCAAAAAGGGCATATGT  
GGGAAAAGCAAAGAAGTTAGCATCATTGCCCTTGGCCCTATGGAAGGGCCATTTTAGGACCTCTAATTTAATAAG  
CAGTTGGTGCCTAGATGAATTAGATGTTAATTAGATATTTAATTAGATGGTATTTTGGGTCTCAATCTCTAAAT  
TTT 3'

## Gen Pds1

5' ATGGCGCAGTGGGCTTGTGTCTCCGCTGCTAACTTGAGCTGCCAAGCTACCATCGTAAACACTCAAAGCAACG  
AAACAGTCCCTGGATGCCATGCCCTTTCTTTCAAAGGCAGTGAATTTATGGCTCAGAGCTGTAGATTTTCAAGCCCA  
CAAGCTGTTTATAGAAGGCCCAGGAATGGTGTGGCCCTTGAAGGTGTTGCGTTGATTATCCAAGACCAGACC  
TTGACAGTACTGCTAATTTCTTAGAAGCTGCGTACTCTCTTCCACTTCCGAGCCTCTCCTCGTCCAACCAAGCC  
GTTAAAAGTTGTGATTGCTGGTGCAGGTTGGCTGGTCTGGCAACTGCAAATAATTTGGCGGATGCGGGTCATCAA  
CTATACTACTAGAAGCGAGAGATGTTTTAGGCGGAAAGGTGCCAGCATGGAAGATAGTGTGGGACTGGTATG  
AAACAGGCCCTGCATATATTTCTTTGGGGCATATCCAAATATTCAGAATCTGTTTGGAGAGCTGGTATTAACGATCG  
GTTGCAGTGGAAAGAACATTCTATGATATTTGCAATGCCAAACAAGCCAGGGGAGTTCAGTCGGTTTGATTTCCCTG  
GAAGTCTTCCAGCACCCATAAATGGAATATGGGCCATATTGAAGAACAATGAGATGCTGACTTGGCCAGAGAAAA  
TCAGTTTGCATTTGGACTACTGCCAGCAATCCTTGGTGGGCAGGCTTATGTTGAAGCCCAAGATGGCTTGAGCGT  
AAAAGACTGGATGAGGAAACAGGCCATACCTGATCGAGTAACACAGAGGTGTTTATAGCCATGTCAAAGGCCCTT  
AACCTTATTAACCTTGATGAACCTTCAATGCAGTGCATATTGATGCTTTGAACCGATTCTCCAGGAGAAACAGC  
GTTCCAAGATGGCTTCTTGGATGGTAGTCCCCCGAGAGACTCTGTGCTCCAATGTTGATCATATCCAGTCATT  
GGCGGTGAAGTCCGAACTAATTCGCCAATACAGAAAATTGATCTAAATAACGATGGAAGTGTGAAGAGTTTGTGA  
CTAAATAATGGGAGCGTGATTGAAGCAGATGCGTATGTGTTGCCACTCCAGTTGATATCTTAAAGCTTCTATTGC  
CTGAAACTGGAAAGAGATGCCATATTTCAAGAAATGGAGAAATTAGTGGAGTTCAGTTATCAATGTTCCAT  
ATGGTTCGCACAGAAAGCTGAAGAACACATATGATCACCTACTTTTTAGCAGAAGTCCCTCTTTAAGTGTGTATGCT  
GACATGTCGGTAACAATGAAGGAATATACAATCCAAACCAATCTATGCTGGAGTTGGTTTTGACCCGGCAGAAG  
AATGGATTCATGTAGTGATCTGAAATTTATGATGCTACACTCAAAGAACTTGCAAAACCTTTCCGACGAAAT  
AGCTGCAGATCAGAGCAAAGCAAGATTTGAAGTACCATGTTGTGAAAACACCAGGCTCTGTTTACAGACTGTA  
CCAGGTTGTGAACCTTGCCTCCCTTGCAAAGATCTCCCTTAGAGGGTTCTATTAGCTGGTGTATTACACAAAAC  
AAAAGTATTTAGCCTCAATGGAAGGAGCGGTTCTATCAGGGAAACTTTGTGCTCAGGCGATTGTACAGGATTATGA  
ATTGCTTCTGCCCGGGTAAAAAACACGTTGGCTGAGGCAGCCGCTCGATGACGAGAATCTGAATGCCCCCA  
CCTTAGGCAATTATACGAAGATAAGCCTGTTACGTCCTTTGGTACTGCATCTCTTCACAAATGACGTTATCTTTT  
GTTTACCGTGTGATATATCGTGTAATGTACAAAATATGATCCCTATGATTCATCAAGGAGATCTGTTAACAAAG  
AAATCAATCCCGAAAGAAATTAAGTGGAGACGATGTTAATGTTGTCGAAATGTTACTCTACAGTTTGTCTTG  
CTAAGCAACACAAAGACTCTAAGAGTTGTGATGTGGTCAGAACTAGCAAATCCATCTGATCATTTCATTGCAT  
TGCATCTTAATTTTCCTCTGTTTTTCTATTACATTTTTGAGGGGATTTTGTAAATCTTTGCCTAATGAAGTA  
ATGCATGAGTTTTCGTTTGATC 3'

## Gen Lcyb1

5' CCCACATAAGCTTACCTTCACAATATCTCTTGGAACTTTCTCATCTCTCTTGGCTCTTCGGTAAGCAATCAC  
TTCTCTGCTCTTTCAATTCAGTATGAGCTTCCCTCTTTGTATATTTTCATACTTGTGTTGTTCTTTCTAAATTC  
CAGAAAATCTTTTCGAATTTAAGGATGTTTCAAGCTTTAATACTGCTCTTCTAGTAGCTTTCCTGTATCTGTAT  
GTGAAATTCAGTTTCTCAGAGAAAACCCATATCAGAAATCGGGTCTCAGTCGAGAATTTCTCACACCCAGATTGT  
ATTTTCAGGAACCTGTTGTGTCATATTAGAGAGATATTCGGGACAGTGTGGAATTTTCATGGATACATTGCTTA  
AAACGCATAACAAGCTTGCATTTTGCACCCAATTCATGGGTTTTCCGGAGAAATTGAGTAGTTCGAGCTCTTCGAA  
GCTTCGCAACGAGGATTTGGGTATGGCCTTAGGAGTCTCGTGTGAAATTGAGTAGGGTGGTGTGTTAAGGCT  
AGTAGCAGTCTCTTCTGGAGCTTGTGCCGAAATTAAGAAGGAAAGTCTTGAATTTGAGCTTCCCTTGTATGACC  
CATCAAAGGGTCTTGTGTTGAGACCTAGCTGTTGTGGCGGTGGCCCTGCCGGCTCGCCGACAGGATTTTC  
GGAGGCAGGCCTTTCTGTTTGTCTCAATTGACCCGCTCTCCAAGTTGATTTGGCCCAATAATTATGGTGTGTTGGGTG  
GATGAATTTGAGGCCATGGATATGCTTGAATGCTGGTACTACCTGGTCTGGTCTGTTGTGTACATAGACGAGG  
AATCGAAGAAGGATCTTAATAGACCTTATGGAAGGGTTAATCGGAAGCAGCTTAAGTCGAAAATGCTGCAAAAATG  
CATATCAAACGGTGTAAATTTCAACAAGCTAAAGTTACTAAGTTATTTCATGAGGAGGAAAAATCACTGTTGACT  
TGCAATGACGGTGTCAAAATTCAGCTTCTGTGGTCTCGATGCAACTGGTTTTTCAAGATGCTTGTACAGTATG  
ATAAGCCGTACAAATCCAGTTACCAAGTGGCTTATGGGATTTTGGCGGAGGTTGAAGAGCATCCATTTGATGTTGA  
TAAGATGCTTTTTATGGACTGGAGAGATTCGCACTTGAACAATAATTCGAAATGAAGGAGAGAAATGGTAGATC  
CCTACTTCTTTATGCAATGCCTTTTTTCATCCAACAGGATATTTCTCGAAGAACTTCCTGGTAGCTCGGCCTG  
GTTTACCCATGAAAGATATCCAAGAAGGATGGCCGCTAGGTTAAGCATCTGGGCATAAAAGTTAAGAGCATTTGA  
GGAGGATGAGCATTGTGTATCCCAATGGGCGGACCGCTCCCGGTGCTCCCTCAGAGAGTTGTTGGAATCGTGGT  
ACAGCAGGGATGGTGCACCTTCAACTGGGTATATGGTGGCGGACTCTGGCAGCGCTCCTATTGTTGCAAAATG  
CAATAGTTCGGTACCTTGGTTTCAATAGAACACTTTCAAGAAATGAAGTGTCCGCAGAAATTTGGAAGATTTATG

GCCCATACAAAGGAGGAGACAAAGGGAGTTCCTCTGTTCGGTATGGCTATTCCTGCTTAAGCTTGATTTGAAAGGT  
ACTCGGAGGTTTTTCAATGCTTTTTTTGACCTAGAACCCCGCTATTTGGCATGGATTCCTGTCACTCGACTGTTTC  
TTCCCGATCTTGATTTTTTCGGGCTTTCACTGTTTTTTCATGCTTCTAATGCTAGTAGAATAGAATATGGCCAA  
GGGGACTCCTCCTTTGGTAAAGATGATCAACAACCTTGATACAGGATAGAGATTAGGGTGACAGATATTTGTAA  
TATGAAAGTTATGTTGGTGAATTTCCATATCAAAGATACTTACTGTTGCTAATAGTTGTCAACCAACTATTTATGAG  
TTAGTACTCTTCAGAAACAAAAATAACCATCTATAATGCT 3'

### Gen *Lcyb2*

5' CACTTCCACTTTCCTTTGACCTTCATTCCTCGCTCTAATGGCCACCCTCCTCCGGCCATTTCCACSGCCACCA  
TCCGCCGCCAAAACCTCCCAATTCCTCCACTCCTCCAGCCTTCTCATCATTTCTCCAGAACCAGATTACCCATCTC  
CAATAAATCTCTCTCCAAAATCCACAGCAGCAAGTTCCGGCAACTTTCTCGACTTAAACCAGAGGCCAAAACCCGA  
GTCTTTGCACCTTCGATCTCCATCAATTCGACCCGTCACCCGGTCTCGCTTAGATGTGATCATCATCGGACCGGC  
CCGCCCGGCTTCGCCCTTCGGGAGCACTTCTCGCTACGGCATTAGGTATGCTGCGTTGATCCTTCTCCTCTCT  
CTATGTGGCCAAATAACTATGGAGTTTGGGTGATGAATTTGAAAGCTTGAATCTGAAAGTTGCTTGGACAAAAT  
ATGCCTATGGCTTCGGTTCATGTGAATGATAGTAAGATTAGTTTTTTGGACCGCCCTTATGGCAGAGTCAGTAGG  
AAGAACTCAAGACTTTGTGCTGGAGAGGTGCTCTCSAATGGGGTTCAATTCATAGGGCCAGGTTTGGAAAA  
TTGAACACGAAAGAGTTTGTGCTTCGATTTTGTGTGATGATGGGAATGAGCTCAAGGCAAGCTTGATTTGTTGATGC  
TAGTGGGTTTGCACAGCAGTTTCATAGAGTATGAGAAGCCTAGGAACCATGGATATCAGATTGCTCATGGTATTTG  
GCTGAAGTGAAGAACACCCCTTTGATTTGGATAAGATGCTTCTAATGGATTGGAGAGATTTCCATCTCGGAAACG  
AGCCTTATTTGCGCACTAGTAATCTAGATTTCCACTTTTTTGTATGCAATGCCGTTTGAATCGAACTTGGTGT  
TTTGAAGAACTTCGCTTGTAGTAGGCCGGTGTGTTCTTATATGGAGATTAAGAAACGAATGGTTGCGAGGCTA  
AGGCATTTGGGGATTAGAGTGAAGAGGGTAATTGAAGAGGAGAAGTGTGATCCCAATGGGGGTCCGCTTCCTC  
GGATCCCCAACGTGTGATGGCAATTTGGAGGGACTTCTGGGGTGGTTACCCCTTCGACTGGGTACATGGTGGCTCG  
GACCATGGCTCTAGCCCCAGTATTTGGCTGAAGCCATTGCAGAGTGCCTTGGCTCAACCAGAATGATCCGAGGGCAR  
CCGCTTTATCATAGAGCGTGGAAATGGCTTGTGGCCCAATCGAGAGGAGATGCACGAGGGACTTTTACTCATTTGTA  
TGGAGACTTTGTTGAAGCTTGATCTGAATGGGAGTAGAAGCTTCTTTGACGCTTCTTTGACTTGGATCCTTATTA  
CTGGCAAGGCTTTTTATCGTCAAGGTTGCTCTAAGAGAGCTCGCTTTGTTGAGCTTATCCTGTTTGGCCGAGCC  
TCCACCCATCTAGGTTTGTATTTGTTACAAAGTCTCCTGTGCCCTTGGTTAAACTGATGGGCAATCTCGCACTTG  
AAGCTGCATAATAATGCAACACATGAAATAATTTTGTGAGAAACAAGAGTTTGGCTTTTGTCCATAGCTTATA  
CAGAATAATGATGTTATTACAACCTAGTTTCAAGTGATCCTTGTCAAATGATCTGCTCGGACACAGAGCATGT  
GTAAAATGCTATTTGATGGTATACTTAATTCCTGAATTTCTT 3'