

INDICE

RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. FORMULACIÓN DEL MARCO TEÓRICO	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
2.1. Generalidades de los carotenoides	3
2.2. Biosíntesis de carotenoides en plantas	5
2.3. Regulación de la biosíntesis de carotenoides en plantas	8
2.4. Fitoeno sintasa, enzima clave en la síntesis de carotenoides	10
2.5. Diversificación funcional de familias de genes <i>PSY</i> en otras especies vegetales	11
2.6. <i>Brassica napus</i> , origen y su importancia como cultivo oleaginoso	12
2.7. Familia de genes <i>PSY</i> en <i>B. napus</i>	14
2.8. Manipulación del metabolismo de carotenoides en plantas superiores	16
2.9. Incremento en el contenido de carotenoides en <i>B. napus</i> a través de ingeniería metabólica	18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
4. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS	21
4.1. Hipótesis de trabajo	21
5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	22
5.1. Objetivo general	22
5.2. Objetivos específicos	22
CAPITULO I	
Análisis funcional de la familia de genes fitoeno sintasa (PSY) de <i>Brassica napus</i> L.	23
1. INTRODUCCIÓN	24

2. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1. Material vegetal	27
2.2. Aislación de ácidos nucleicos y síntesis de cDNA	27
2.3. Clonación de genes <i>PSY</i> de <i>B. napus</i>	27
2.4. Rápida amplificación de los extremos de cDNA (RACE) de los genes <i>PSY</i> de <i>B. napus</i>	28
2.5. Clonación de la secuencia codificante de las proteínas <i>PSY</i> de <i>B. napus</i>	28
2.6. Análisis de la secuencia codificante de las proteínas <i>PSY</i> de <i>B. napus</i>	29
2.7. Modelamiento molecular de las proteínas <i>PSY</i> de <i>B. napus</i>	30
2.8. Test de complementación funcional de las proteínas <i>PSY</i> de <i>B. napus</i> en <i>E. coli</i>	30
2.9. Análisis estadístico	32
2.10. Análisis de la abundancia relativa de transcritos para los 6 genes <i>PSY</i> endógenos por RT-PCR durante el desarrollo de semillas de <i>B. napus</i>	32
2.11. Números de accesoión	33
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.1. Aislación y análisis de secuencias de los genes <i>PSY</i> de <i>B. napus</i>	35
3.2. Predicción de la estructura tridimensional de las enzimas de los genes <i>PSY</i> de <i>B. napus</i>	45
3.3. Caracterización funcional de los genes <i>PSY</i> de <i>B. napus</i>	47
3.4. La familia de genes <i>PSY</i> provee un pool de genes funcionales para su uso en ingeniería metabólica del contenido de carotenoides	53
3.5. Análisis de la abundancia relativa de los transcritos <i>PSY</i> durante el desarrollo de la semilla	54
4. CONCLUSIONES	56

CAPITULO II

Ingeniería metabólica del contenido de carotenoides en <i>Brassica napus</i> L. a través de la sobreexpresión semilla-específica de un gen <i>PSY</i> endógeno	57
---	----

1. INTRODUCCIÓN	58
2. MATERIALES Y MÉTODOS	60
2.1. Construcción del vector binario pCambia2300-Lec:: <i>BnaC.PSYa-6XHis</i>	60
2.2. Transformación de <i>B. napus</i>	61
2.3. Test de segregación	64
2.4. Análisis de la abundancia relativa de transcritos para el transgen <i>BnaC.PSY.a-6XHis</i> -tag y de los 6 genes <i>PSY</i> endógenos durante el desarrollo de semillas mediante RT-PCR	64
2.5. RT-PCR cuantitativo en tiempo real	66
2.6. Extracción, purificación y detección de la proteína <i>BnaC.PSY.a-6XHis</i> -tag	66
2.7. Extracción de carotenoides y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	68
2.8. Análisis estadístico	69
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
3.1. Construcción del vector binario pCambia2300-Lec:: <i>BnaC.PSYa-6XHis</i>	70
3.2. Transformación de <i>B. napus</i> e identificación de eventos transgénicos	72
3.3. Análisis de la abundancia relativa de transcritos del transgen <i>BnaC.PSYa-6XHis</i> y los 6 genes <i>PSY</i> de <i>B. napus</i> en semilla	74
3.4. Análisis del nivel de transcritos del transgen <i>BnaC.PSYa-6XHis</i> y el nivel de transcritos <i>PSY</i> totales en semillas de <i>B. napus</i>	78
3.5. Detección de proteína <i>BnaC.PSYa-6XHis</i>	80
3.6. La sobreexpresión del gen <i>BnaC.PSY.a</i> en dirección a semilla de <i>B. napus</i> afecta su contenido de carotenoides	81
4. CONCLUSIONES	88
CONCLUSIONES GENERALES	90
BIBLIOGRAFÍA GENERAL	92
ANEXO	110

1. MATERIAL SUPLEMENTARIO	110
TablaS1	110
Figura S1	113
Tabla S2	113
Figura S2	114
Figura S3	116
Figura S4	117
2. LISTA DE ABREVIACIONES	118