

---

**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD FUNCIONAL DE LA FAMILIA FITOENO  
SINTASA (PSY) EN *Brassica napus* L. E INGENIERÍA METABÓLICA DEL  
CONTENIDO DE CAROTENOIDES****ADA ELIZABETH LÓPEZ EMPARÁN  
DOCTOR EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL****RESUMEN**

Fitoeno sintasa (PSY) es la enzima que cataliza el primer paso de la ruta de síntesis de carotenoides. En *Arabidopsis thaliana*, PSY es codificada por un único gen. En otras especies se ha reportado la existencia de familias de genes PSY. En *Brassica napus*, se ha determinado la existencia de una familia de genes PSY conformada por seis miembros que presentan expresión tejido-específica, sin embargo, se desconoce si todos ellos codifican proteínas funcionales. Por otra parte, se ha demostrado que en esta especie, PSY es un paso limitante en la síntesis de carotenoides. Esta limitación fue demostrada a través de un trabajo donde la sobreexpresión de un gen PSY de origen bacteriano resultó en un incremento de 50 veces los niveles de  $\beta$ -caroteno en semilla de *B. napus*. Además, se ha demostrado que el uso de diferentes fuentes de transgen PSY puede aumentar el contenido de carotenoides a diversos niveles. En este contexto, resultó importante investigar si los seis genes PSY de *B. napus* son funcionales y determinar cuáles representaban la mejor alternativa para seleccionar uno y sobreexpresarlo en semillas de *B. napus* L. En este estudio se aislaron las secuencias CDS de los seis miembros de la familia de genes PSY de *B. napus* y se confirmó que los seis codifican proteínas con alta identidad de secuencias, con una estructura tridimensional similar y que poseen un sitio activo putativo PSY. Significativamente, la evaluación de su funcionalidad *en vivo* por medio de un test de complementación heteróloga, mostró que los seis miembros de la familia de genes PSY de *B. napus* son funcionales. En la siguiente etapa se seleccionó el gen *BnaC.PSY.a-6xHis* y se sobreexpresó en semilla de *B. napus*. En los seis eventos transgénicos estudiados, se observó nivel de transcritos del transgen y en alguno de los eventos, cambios en el patrón de transcritos de los genes *BnaX.PSY* y probable detección de la proteína *BnaC.PSYa-6xHis* en semilla (30-60 dpa). Finalmente, se determinó un incremento dos veces la concentración de carotenoides, compuesto principalmente por luteína en semillas transgénicas respecto al control, demostrando que la sobreexpresión en semilla de

---

un gen endógeno *PSY* incrementó los niveles de carotenoides en *B. napus*. A la vez que proporciona un pool de genes *PSY* funcionales idóneos para su uso en ingeniería metabólica del contenido de carotenoides en cultivos oleaginosos.

## ABSTRACT

Phytoene synthase (PSY) has been shown to catalyze the first committed step of carotenoid biosynthesis. PSY is encoded by a single copy gene in *Arabidopsis thaliana*, but most plant species contain a small gene family. In *Brassica napus* L., the existence of a PSY family of six members that exhibit tissue-specific expression has been identified, however, the question of whether this large PSY family actually encodes six functional enzymes remained to be answered. Moreover, it has been shown in this species, that PSY activity is a rate-limiting factor in seed carotenoid biosynthesis. This limitation was demonstrated through initial work when the sole over-expression of a bacterial phytoene synthase gene in seeds raised  $\beta$ -carotene levels 50-fold. The use of different PSY transgene sources, however, can enhance carotenoid content to various degrees. In this context, it was important to investigate whether all six *B. napus* PSY genes were functional and to determine which ones could represent a better alternative to select and overexpress in *B. napus* seed. In this study the complete coding sequences of six *B. napus* PSY genes were isolated. This further confirmed that the six do encode proteins had high sequence identity and similar tridimensional structures with a putative PSY active site. Significantly, evaluating their functionality *in-vivo* using a heterologous complementation system showed all six *B. napus* PSY enzymes were functional. Six transgenic events were generated with the *BnaC.PSYa-6xHis* transgene. Expression of the transgene was confirmed in all events and changes in the transcript pattern of *BnaX.PSY* genes were detected in some events. The presence of the *BnaC.PSYa-6xHis* protein could not be undoubtedly detected in seed at both developmental stages evaluated (30-60 dpa). Finally, a 2- fold increase in carotenoid concentration in transgenic relative to control seeds was detected. Seed carotenoid extract consisted mainly of lutein. Altogether, these results indicated that overexpression of an endogenous gene PSY produced a modest increase of carotenoid levels in *B. napus* seeds. In addition, this work provides a pool of functional PSY genes suitable for metabolic engineering of seed carotenoid content.

 UNIVERSIDAD DE TALCA | CHILE

**SISTEMA DE  
BIBLIOTECAS**

---