



INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS, MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL

**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

Talca, Agosto 2017

**AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN
DE MEMORIAS DE PREGRADO Y TESIS DE POSTGRADO**

Yo, **Ada Elizabeth López Emparán**, cédula de Identidad N° 13.625.947-4, autor de la memoria o tesis que se señala a continuación, **SI** autorizo a la Universidad de Talca para publicar en forma total o parcial, tanto en formato papel y/o electrónico, copias de mi trabajo¹.

Esta autorización se otorga en el marco de la Ley N° 20.435 que modifica la Ley N° 17.336 sobre Propiedad Intelectual, con carácter gratuito y no exclusivo para la Universidad.

Título de la memoria o tesis:	“ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD FUNCIONAL DE LA FAMILIA FITOENO SINTASA (PSY) EN <i>Brassica napus</i> L. E INGENIERÍA METABOLICA DEL CONTENIDO DE CAROTENOIDES”
Unidad Académica:	INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Carrera o Programa:	PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL
Título y/o Grado al que se opta:	DOCTOR EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL
Nota de Calificación:	6,3

Timbre Escuela



Firma del Estudiante: Ada López E.

Rut: **13.625.947-4**

Fecha: **17 / 01 / 2018**

¹ En el párrafo debe escribir su nombre completo en negrita y omitir la palabra que corresponda SI o No, de acuerdo a su preferencia.

A mi esposo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. María Laura Federico por ser directora de tesis y haber contribuido de manera significativa a mi formación profesional y rigurosidad científica.

Agradezco al Dr. Peter Caligari por ser profesor patrocinante de esta tesis y en especial por su ayuda en la selección de un gran centro de investigación para conducir la investigación.

Al cuerpo docente del Programa de Postgrado en Ciencias Mención Ingeniería Genética Vegetal, que me entregó las herramientas iniciales para mi formación como Doctora. A mis compañeros de doctorado por su aporte en la discusión de temas científicos en las horas de descanso, haciendo de este un valioso uso del tiempo.

Al personal científico, técnico y administrativo del Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola (CGNA), en forma particular al Dr. Takahiro Ogura, Humberto Gajardo, Jimena Carril, Fernando Westermeyer, Daniela Quezada y especialmente al Dr. Haroldo Salvo por su confianza y apoyo a esta investigación.

A la Dra. Claudia Stange por su valiosa contribución durante el tiempo que realicé parte de mi investigación en la Universidad de Chile. A sus estudiantes, en particular a Ariel Cerda, Orlando Acevedo y Carolina Rosas, por su cooperación en la realización de los experimentos. Al Dr. León Bravo por facilitar la conducción de análisis en su laboratorio en la Universidad de la Frontera. Agradezco a la Dra. Wendy González y Matías Zúñiga de la Universidad de Talca por su colaboración en el modelamiento de proteínas.

Al proyecto FONDECYT 1090726 por el financiamiento otorgado para el desarrollo de esta investigación. A la Universidad de Talca, por la beca Universidad de Talca. Al programa MECESUP, por su beca de financiamiento de arancel y mantención y finalmente al CGNA por financiar la última etapa de esta tesis.

A mis padres por su amor y principios sólidos que me han dirigido. De manera muy especial, agradezco a Andrés Leyton, mi esposo, quien sacrificó horas de sueño y tiempo con tal de

estar siempre juntos durante el desarrollo de esta investigación, sin su dedicación y amor, estos años no habrían sido de los más gratificantes y felices de mi vida. Gracias.

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

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 dónde la sobreexpresión de un gen *PSY* de origen bacteriano resultó en un incremento de 50 veces los niveles de β -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 β -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.

INTRODUCCIÓN

1. FORMULACIÓN DEL MARCO TEÓRICO

Los carotenoides son compuestos isoprenoides sintetizados en todos los organismos fotosintéticos, presentando numerosas funciones fisiológicas en plantas superiores como precursores de pigmentos esenciales durante la fotosíntesis y de moléculas de señalización como ácido abscísico (ABA) que participa en la respuesta a estrés abiótico en plantas. Debido a que animales y humanos deben ingerir en la dieta los carotenoides como fuente de retinoides (incluyendo vitamina A) ya que no pueden sintetizarlos *de novo*, existe gran interés en aumentar los niveles de carotenoides en los cultivos a través de la ingeniería genética.

Fitoeno sintasa (PSY) es la primera enzima de la ruta de síntesis de carotenoides, cataliza la condensación cabeza a cabeza de dos moléculas de GGPP para producir fitoeno. En *Arabidopsis thaliana*, PSY es codificada por un único gen, sin embargo, en otras especies se ha reportado la existencia de familias de genes *PSY*. Aunque la actividad de múltiples enzimas PSY puede parecer redundante, en estos casos los genes presentan subfuncionalización, teniendo cada gen *PSY* papeles únicos en la síntesis de carotenoides.

Brassica napus L. (AACC; n=19), es una especie alotetraploide originada desde la hibridación interespecífica de dos genomas diploides base. Cada una de estas especies diploides parentales, *Brassica rapa* L. ((AA; n=10) y *Brassica oleracea* L. (CC; n=9), posee tres subgenomas parálogos similares al de *Arabidopsis thaliana*, ó “*Arabidopsis-like*”. Estudios previos realizados por el grupo de investigación, han confirmado que los genes PSY en estas especies han sido retenidos en estado triplicado en ambos genomas diploides de Brassica (A, C) y que *B. napus* tiene la mayor familia de genes *PSY* (seis copias) descrita hasta la fecha. Esto a pesar del documentado proceso de fraccionamiento de los subgenomas de Brassica. Además se demostró, que los seis miembros de la familia de genes *PSY* de *B. napus*, presentan expresión tejido-específica exhibiendo señales de subfuncionalización. Estos antecedentes dan cuenta de la importancia de esta enzima en esta especie, sin embargo hasta ahora se desconoce si todos ellos codifican proteínas funcionales.

Por otra parte, *B. napus* es conocido por ser uno de los principales cultivos oleaginosos a nivel mundial, esto lo ha hecho foco de estudios en ingeniería metabólica. En este sentido, un estudio pionero utilizando sólo el gen de origen bacteriano *CrtB* en la transformación de *B. napus*, produjo un incremento en los niveles de carotenoides de hasta 50 veces superior en semillas. Lo que ha demostrado, al menos en esta especie, que PSY es un paso limitante en la síntesis de β -caroteno. Al mismo tiempo, dio cuenta de que la semilla de *B. napus* posee un alto potencial para la acumulación de carotenoides. También es importante destacar que otras investigaciones han demostrado que diferentes fuentes de transgen *PSY* pueden favorecer la acumulación de carotenoides en distintos niveles.

En este contexto, es interesante establecer si los seis genes *PSY* de *B. napus* son funcionales y predecir cual de éstos puede ser más eficiente en su uso en ingeniería metabólica. Es por esto que el objetivo que guía esta tesis se centra inicialmente en evaluar la funcionalidad de los 6 miembros de la familia *PSY* de *B. napus* L. y con este fin, aislar, caracterizar y comparar sus secuencias codificantes (CDS), para luego modelar la estructura tridimensional de cada enzima y finalmente evaluar su actividad fitoenosintasa en un sistema de complementación heteróloga. Una segunda etapa se centra, a diferencia de estudios previos, en seleccionar un homólogo *PSY* que presente expresión tanto en tejidos ricos en cloroplastos como cromoplastos y sobreexpresarlo específicamente en semilla. Luego evaluar los eventos transgénicos respecto de los niveles de expresión génica del PSY introducido (transgen) y de los seis genes PSY endógenos, para posteriormente determinar la detección de proteína transgénica producida y el contenido total y la composición de carotenoides obtenidos en semilla.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. Generalidades de los carotenoides

Los carotenoides son un grupo de más de 750 pigmentos derivados de los isoprenoides biosintetizados en plantas, bacterias, algas, áfidos y hongos (Moran y Jarvik, 2010; Shumskaya et al., 2012). En plantas, son acumulados principalmente en los plastídios y almacenados en las membranas tilacoidales (Peter y Thornber, 1991; Cunningham y Gantt, 1998). Más allá de ser simples pigmentos, los carotenoides presentan numerosas funciones biológicas en plantas superiores: (1) por ejemplo el color amarillo característicos presente en cotiledones y plántulas crecidas en oscuridad (etioladas) es debido a la presencia de carotenoides en los etioplastos, donde facilitan la transición al desarrollo fotosintético tras la iluminación durante la fotomorfogénesis (Park et al., 2002; Rodríguez-Villalón et al., 2009); (2) como estabilizadores de membranas en los cloroplastos despliegan dos papeles principales durante la fotosíntesis: colección de luz y foto-protección. En el primer caso, actúan como pigmentos accesorios colectores de luz en el rango de los 450 – 570 nm (donde la clorofila no absorbe de forma eficiente) (Demmig-Adams et al., 1996) y en el segundo caso, cumplen un rol esencial en el complejo antena que capta la luz protegiendo el centro de reacción de la auto-oxidación causada por un exceso de energía lumínica (Demmig-Adams et al., 1996; Niyogi et al., 1997; Pogson et al., 1998; Baroli y Niyogi, 2000; Kim y DellaPenna, 2006; Dall'Osto et al., 2007; Kim et al., 2009; Dall'Osto et al., 2007); (3) son precursores de moléculas de señalización que influyen en el desarrollo de las plantas en respuesta a componentes ambientales, como la hormona ácido abscísico (ABA) responsable de la regulación de funciones fisiológicas así como dormancia de semillas, germinación y respuesta a estrés abiótico (Zeevaart y Creelman, 1988; Koornneef et al., 2002; Lindgren et al., 2003; Howitt y Posón, 2006; Nambara y Marion-Poll, 2005); (4) como precursor de la fitohormona estrigolactona que inhibe la ramificación de los tallos y estimula la asociación simbiótica con hongos en la rizósfera (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008; Pichersky, 2008); (5) confieren a flores y frutos distintos colores y son precursores de compuestos aromáticos destinados a la atracción de organismos polinizadores y dispersores de semillas (Hirschberg, 2001); (6) productos del catabolismo de los carotenoides también están involucrados en el

mecanismo de defensa de las plantas, por ejemplo β -ionona, está envuelta en la interacción planta insecto, protegiendo a éstas del daño por insectos (Grubert et al., 2009; Wei et al., 2011). Por lo tanto, la biosíntesis de carotenoides se encuentra regulada durante todo el ciclo de vida de una planta, adaptándose a las necesidades de desarrollo durante la germinación, fotomorfogénesis, fotosíntesis, desarrollo del fruto y en respuesta a estímulos externos del medio ambiente (Cazzonelli y Pogson, 2010).

Animales y humanos deben ingerir en la dieta los carotenoides como fuente de retinoides (incluyendo vitamina A) ya que sólo con la excepción de algunos tipos de áfidos, no pueden sintetizarlos *de novo* (Moran y Jarvik., 2010). En humanos, los carotenoides actúan como fitonutrientes que promueven la salud por su actividad antioxidante, reduciendo el riesgo de varios tipos de cáncer y enfermedades coronarias (Giuliano, 2000; Giuliano, 2017). Se ha relacionado la vitamina A, por ejemplo, con el crecimiento normal del cuerpo humano y la reparación de tejidos. Tanto el sistema inmune como el visual, son dependientes de esta vitamina. Se ha descrito que β -caroteno, α -caroteno, γ -caroteno y β -criptoxantina poseen actividad de vitamina A. Otros carotenoides como luteína y zeaxantina protegen contra la degeneración macular relacionada con la edad (McGraw et al., 2006; Rao y Rao, 2007; Farré et al., 2010). Por otra parte, en animales los carotenoides son críticos en determinar su reproducción, supervivencia, evitando su depredación así como el parasitismo. Por ejemplo, estos son usados como pigmentos que proporcionan a muchas aves, peces e invertebrados sus colores característicos (Baron et al., 2008).

Dado que los carotenoides presentan numerosas funciones biológicas en plantas, animales y humanos, además de ser fuente de pigmentos naturales en la industria de los alimentos y cosméticos, existe una oportunidad comercial para la producción de los mismos. Al respecto, según el “mercado global de carotenoides”, el mercado de β -caroteno, astaxantina y cantaxantina, es estimado en \$250, 200 y 100 millones de dólares al año, respectivamente (The Global Market for Carotenoids, 2008). Por lo tanto, considerando que la producción industrial de carotenoides está principalmente basada en la síntesis química existe una oportunidad para la producción de carotenoides desde fuentes naturales (Ralley et al., 2004; Fujisawa et al., 2009; Giuliano et al., 2008; Giuliano, 2017). Esto ha generado interés en la

perspectiva de aumentar los niveles de carotenoides en los cultivos a través de la ingeniería genética. *Brassica napus* L., es uno de los cultivos oleaginosos más importantes a nivel mundial y considerando que presenta un alto potencial para la acumulación de carotenoides en semilla, resulta importante el estudio de los genes que regulan la síntesis de carotenoides y su uso en la manipulación genética de su síntesis.

2.2. Biosíntesis de carotenoides en plantas

Los carotenoides son sintetizados a partir del compuesto de cinco carbonos isopentenil difosfato (IPP) y su isómero de doble enlace, dimetilalil difosfato (DMAPP). En plantas, dos rutas independientes existen para la producción de estos precursores prenil difosfato, pero los carotenoides son principalmente sintetizados desde IPP y DMAPP de la ruta localizada en los plastídios 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) (Fig. 1) (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002; Phillips et al., 2008; Rodríguez-Concepción, 2010; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012)). La condensación de tres moléculas de isopentenildifosfato (IPP) y una molécula de dimetilalildifosfato (DMAPP) catalizada por la enzima geranylgeranyl-bifosfato sintasa (GGPPS), generan el intermediario geranylgeranyl-bifosfato (GGPP) (C₂₀) (Lichtenthaler H, 1999; Bouvier et al., 2005), precursor de varios grupos de isoprenoides plastidiales (entre ellos carotenoides, citoquininas, gibberalinas, brassinoesteroides, terpenos, tocoferoles, clorofila), y es este punto donde el flujo de síntesis puede continuar hacia la producción de estos compuestos o la síntesis de carotenoides (Figura1) (DellaPenna D y Pogson BJ, 2006).

El primer paso irreversible en la síntesis de carotenoides es la condensación de dos moléculas de GGPP en 15-*cis*-fitoeno por la enzima fitoeno sintasa (PSY). Cuatro reacciones de desaturación realizadas por las enzimas fitoeno desaturasa (PDS) y ζ-caroteno desaturasa (ZDS), generan el carotenoide cromóforo (Fig. 1). El primer producto de la desaturación es 9,15,9'-tri-*cis*-ζ-caroteno, es isomerizado por la luz, para obtener 9,9'-di-*cis*-ζ-caroteno, el sustrato de ZDS (Breitenbach J y Sandmann G, 2005). El producto final de las reacciones de desaturación es convertido en trans-licopeno por la enzima carotenoide isomerasa (CRTISO) (Isaacson et al., 2004). El trans-licopeno es ciclado al final, por la licopeno ε-ciclasa (LYCB).

Son introducidos grupos ϵ y β en el extremo, ya sea por licopeno ciclasa (LYCE) o también por LYCB resultando en la producción de α y β -caroteno, respectivamente (Fig.1).

La introducción de motivos hidroxilo por la enzima β -caroteno hidroxilasa (HYDB), resulta en la formación de zeaxantina desde β -caroteno y luteína a partir de α -caroteno (Sun et al., 1996; Bouvier et al., 1998; Tian et al., 2003). Zeaxantina puede ser convertida en anteraxantina y luego en violaxantina por zeaxantina epoxidasa (ZEP), que cataliza dos reacciones de epoxidación (Marín et al., 1996). A su vez, anteraxantina y violaxantina son convertidos en neoxantina por la enzima neoxantina sintasa (NXS) (Bouvier y col., 2000; Al-Babili et al., 2000). Finalmente, neoxantina y violaxantina se fragmentan en xantocina por la acción de la enzima 9-cis-epoxycarotenoide dioxigenasa (NCED) (Seo et al., 2002) y esto es seguido por una conversión en dos pasos a ácido abscísico (ABA), vía ABA aldehído (Schwartz et al., 2003; Ferré et al., 2010).

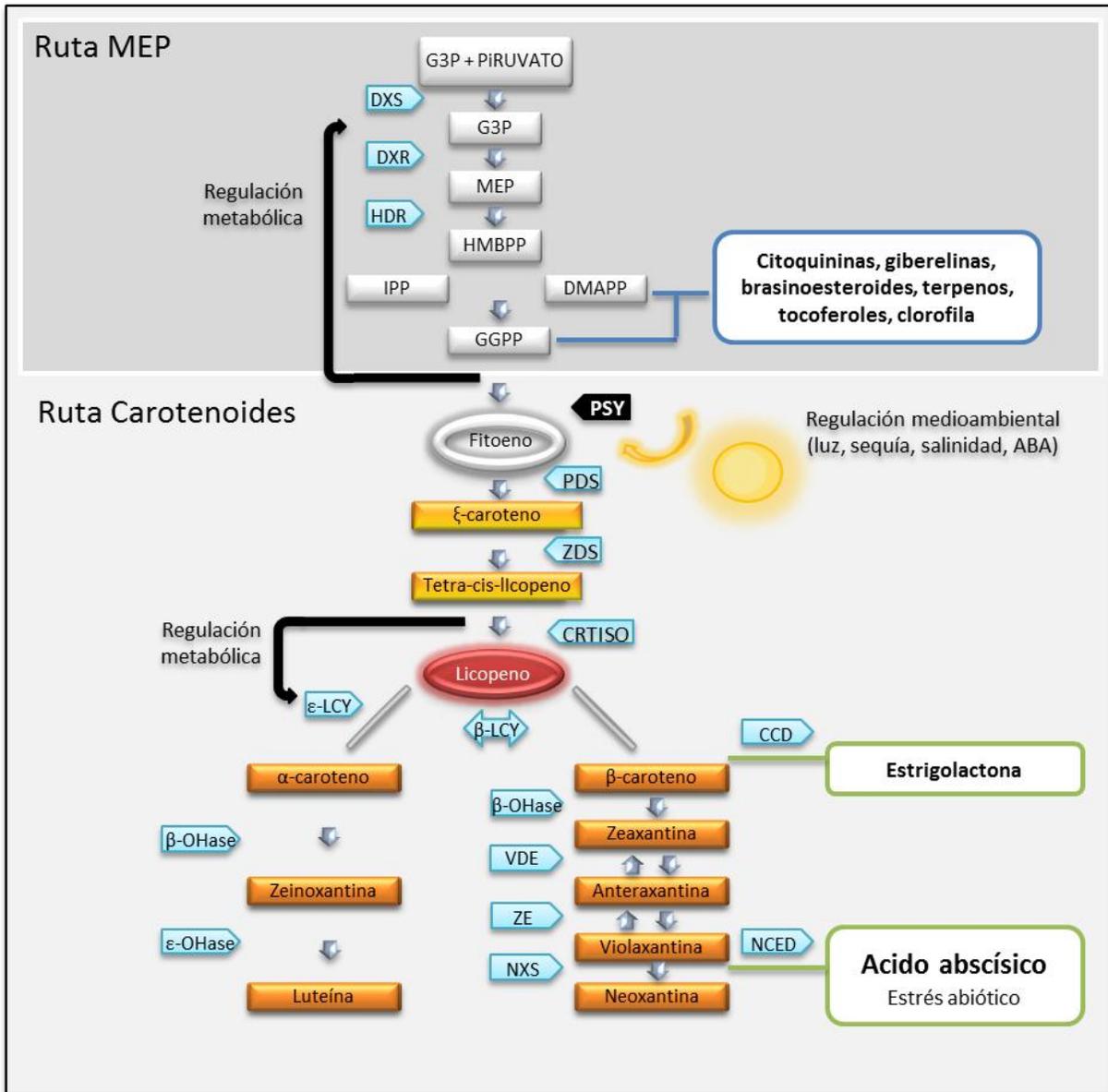


Figura 1. Ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas. Principales pasos de la síntesis de carotenoides en plantas mostrando enzimas (pentágonos), carotenoides y precursores (rectángulos), carotenoides que derivan en señales hormonales (rectángulos verde), otros metabolitos derivados de la vía MEP (rectángulo azul) Adaptado de Cazzonelli y Pogson, 2010.

2.3. Regulación de la biosíntesis de carotenoides en plantas

La regulación de la biosíntesis de carotenoides está interconectada con otras rutas metabólicas relacionadas con la diferenciación plastidial y con las respuestas a señales de desarrollo y medioambientales, donde estos pigmentos están envueltos. En *Arabidopsis*, se han descrito dos mecanismos principales que controlan la acumulación de carotenoides en células vegetales, la regulación transcripcional y post-transcripcional (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012).

El primer nivel de regulación de la acumulación de carotenoides en plantas es el control de la transcripción de genes biosintéticos a través de: (1) Señales de desarrollo (2) Señalización por luz (3) Reloj circadiano (4) Retroalimentación mediada por ABA y (5) Mecanismos epigenéticos (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Como ejemplo de estos, diversos estudios han demostrado que varios genes de la ruta de síntesis de carotenoides incluyendo *PSY* y la mayoría de los genes de la ruta MEP, son regulados por el reloj, mostrando usualmente una fase pico de abundancia de transcritos en torno al amanecer (Thompson et al., 2000; Woitsch y Römer, 2003; Hsieh y Goodman, 2005; Covington et al., 2008; Facella et al., 2008; Córdoba et al., 2009; Fukushima et al., 2009; Pan et al., 2009). Mientras que se observa un pico en el nivel de transcritos de otros genes como *VDE*, al atardecer (Covington et al., 2008). Además se han observado oscilaciones diurnas de isoprenoides plastidiales derivados de la ruta MEP. Por otra parte, se ha determinado la existencia retroalimentación de la ruta que modula el suministro de substratos isoprenoides y la acumulación de carotenoides y ABA (Cazzonelli y Pogson, 2010). Esto incluye la retroalimentación dentro de la ruta de síntesis de carotenoides y entre la ruta de síntesis de carotenoides, MEP y ABA. Al respecto, se ha demostrado que bajo condiciones de estrés por sequía, osmótico ó salinidad es requerida una activa producción de ABA. Es en este punto dónde la expresión de *PSY* tanto de *Arabidopsis* como de especies que tienen más de un gen *PSY*, es mediada por ABA en los genes parálogos envueltos en la síntesis de carotenoides en raíces, confirmando un mecanismo regulatorio de retroalimentación (Fig.1) (Li et al., 2008a; Li et al., 2008b; Welsch et al., 2008; Li et al., 2009; Meier et al., 2011). Un ejemplo de regulación a través de mecanismos epigenéticos es reportada por Cazzonelli et al. (2009) quienes mostraron que el gen que codifica para la

isoforma CRTISO1 parece ser específicamente regulada por CCR1/SDG8, una enzima metiltransferasa modificadora de histonas en la cromatina. Además probaron que SDG8 es requerido para mantener el estatus de metilación y favorecer la expresión de *CRTISO1* durante el desarrollo de plántulas, en hojas, apéndices de tallos y algunos órganos florales (Cazzonelli et al., 2010).

A nivel post-transcripcional los mecanismos regulatorios son principalmente cuatro: (1) modulación de los niveles de actividad enzimática (2) canalización de los metabolitos por complejos multi-enzimáticos (3) capacidad de secuestro y almacenamiento de pigmentos y (4) rotación de carotenoides (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Como ejemplos de éstos, se ha observado una regulación positiva de las enzimas DXR, HDS y HDR por tiorredoxina reducida fotoquímicamente (Balmer et al., 2003; Lemaire et al., 2004). También estudios *in vitro* de PSY de *Narcissus pseudonarcissus* establecieron que para obtener una actividad óptima de la enzima, se requiere el corte proteolítico de parte de su secuencia N-terminal y la adición de motivos lipídicos a la enzima (Schledz et al, 1996). Es bien conocido que un factor crítico para la actividad de muchas de las enzimas de la ruta de síntesis de carotenoides es la asociación a membranas (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). En estos casos, ellas mismas tienen dominios de unión a membrana o bien están asociadas con proteínas que tienen estos dominios y que actúan como anclas para el complejo. Un típico ejemplo de este mecanismo es el modelo propuesto donde el complejo multi-enzimático formado por las enzimas isopentenil difosfato isomerasa (IDI), GGPPS y PSY, permite la síntesis de fitoeno a partir de IPP y DMAP (Cunningham F, 2002; Cunningham y Gantt, 1998). Un aumento en la capacidad de almacenamiento también puede gatillar un incremento de la síntesis de carotenoides. Esto se observa claramente en la mutación natural por inserción de un retrotransposón en el gen Orange (*Or*) de *Brassica oleracea* L. var. botrytis, que desencadena la diferenciación de proplastidios en cromoplastos confiriendo de esta manera una alta capacidad de acumulación de β -caroteno de manera semidominante en tejidos que normalmente no contienen carotenoides (Li y col., 2001; Li y Garvin, 2003; Li y col., 2006). La rotación de los carotenoides es otra manera importante de regular su contenido en plantas a través de la biosíntesis y degradación. La degradación puede ocurrir por oxidación no-enzimática y enzimática. Los productos de la degradación enzimática de los carotenoides

(apocarotenoides) son generados por la acción de oxigenasas (Giuliano, 2003). Un ejemplo es lo observado en mutantes de *Arabidopsis* que presentan pérdida de función de la enzima Dioxigenasa de clivaje de carotenoides 1 (CCD1), y como resultado, muestran un aumento de aproximadamente 40% en los niveles de carotenoides totales en semilla (Auldridge et al, 2006).

2.4. Fitoeno sintasa, enzima clave en la síntesis de carotenoides

PSY es la enzima clave de la ruta de síntesis de carotenoides. En *Arabidopsis*, se ha descrito un mecanismo de retroalimentación, por el cual PSY controla el flujo metabólico de la ruta de carotenoides, donde la expresión de un transgen *PSY* y no *DXS*, resulta en un incremento en los niveles de carotenoides y la acumulación de *DXS*, controlando el flujo de enzimas de la ruta MEP ubicadas río arriba de PSY (Fig.1) (Rodríguez et al., 2009).

Por otra parte, la transcripción del gen *PSY* es regulada en respuesta a ABA, salinidad, alta luz, temperatura, sequía y fotoperíodo (Cazzonelli y Pogson, 2010). A nivel transcripcional, se ha visto que la expresión de *PSY* es regulada por luz durante la conversión de etioplastos en cloroplastos durante la fotomorfogénesis, mediada por el sistema de fitocromo, presentando expresión basal en plántulas germinadas en oscuridad, y presentando aumento de expresión a diferentes calidades de luz (von Lintig et al., 1997; Welsch et al., 2000). Estudios tempranos realizados por Welsch et al., (2003) a nivel de secuencias regulatorias del gen *PSY* de *Arabidopsis* identificaron en el promotor elementos *cis* (ATCTA) involucrados en la fotosíntesis y foto-protección. Más recientemente, se ha descrito que la expresión del gen *PSY* en *Arabidopsis* es regulado por factores de interacción a fitocromo (PIF) (Toledo et al., 2010). PIF1 y otros PIFs, se unen al promotor a través del motivo G-box1, resultando en la represión del gen *PSY* en oscuridad. La luz gatilla la activación de fitocromo que media la degradación de PIFs por el sistema proteosoma durante la de-etiolación resultando en la de-represión de la expresión del gen *PSY* (Toledo et al., 2010). Por otra parte, se ha descrito la combinación, ABRE-CE como un regulador crucial que media la respuesta tanto a señales medioambientales (sequía, salinidad) como ABA (Zhang et al., 2005; Yamaguchi y Shinozaki, 2005). Ambos

motivos han sido encontrados en el promotor del gen *PSY* de arroz, regulando transcripcionalmente la expresión del gen y mediando la carotenogénesis y síntesis de apocarotenoides en respuesta a estrés (Welsch et al., 2008). Sin embargo, el gen *PSY* de *Arabidopsis* presenta en su promotor sólo el elemento de acoplamiento (CE), mientras que no se encuentra el motivo de respuesta a ABA (ABRE) (Welsch et al., 2008). (Fig.1).

2.5. Diversificación funcional de familias de genes *PSY* en otras especies vegetales

Si bien en *Arabidopsis* existe un único gen *PSY*, se ha reportado la existencia de familias de genes *PSY* en otras especies con dos o más homólogos, como en tomate (*Lycopersicon esculentum*), arroz (*Oryza sativa*), álamo (*Populus trichocarpa*), trigo (*Triticum aestivum*) y maíz (*Zea mays*) (Li et al., 2008; Welsch et al., 2008; Chaudhary y Khurana, 2010; Howitt et al., 2009; Li et al., 2008). Aunque la actividad de múltiples enzimas *PSY* puede parecer redundante, en estos casos los genes presentan subfuncionalización, teniendo cada gen *PSY* papeles únicos en la síntesis de carotenoides en distintos estados de desarrollo y tejidos, como también, en respuesta a los estímulos del medio ambiente.

En maíz, se han descrito tres genes parálogos que presentan funciones específicas en cuanto a la regulación de la carotenogénesis en el endosperma, fotomorfogénesis, en respuesta a estrés abiótico y a altas temperaturas (Li et al., 2008a; Li et al., 2008b). Por ejemplo, se ha observado una relación temporal de la acumulación de transcritos *ZmPSY1* con la acumulación de carotenoides durante el desarrollo del endosperma (Li et al., 2008b). *ZmPSY1* presenta un papel adicional en tejido fotosintético, donde es requerido para la carotenogénesis en oscuridad y la tolerancia a estrés térmico (Gallagher et al., 2004; Li et al., 2008b). Por otra parte, durante el proceso de de-etiolación, se ha descrito un incremento en la expresión de *ZmPSY2* siendo el único parálogo en maíz que es regulado por luz en tejido fotosintético mediado por fitocromo (Li et al., 2008b). En respuesta a estrés abiótico, salinidad, sequía y aplicaciones de ABA, se ha observado un aumento de los niveles de expresión de *ZmPSY3*, lo que se correlacionó con la síntesis de carotenoides y ABA en las raíces, hormona que modula la respuesta a respuesta estrés abiótico induciendo la carotenogénesis en raíz (Li et al., 2008a).

En arroz, se han reportado resultados similares en plantas sometidas a estrés salino, donde *OsPSY3* presenta un aumento de expresión e induce la síntesis de ABA en raíz (Welsch et al., 2008). Los genes parálogos *OsPSY1* y *OsPSY2* son los únicos regulados por luz durante la detiolación (Welsch et al., 2008).

Sin embargo, en yuca (*Manihot esculenta* Crantz), uno de los tres genes *PSY* presentes en esta especie (*MePSY3*) y que presenta mayor porcentaje de identidad con los genes *PSY3* de maíz y arroz, no regula la carotenogénesis en respuesta a estrés abiótico en las condiciones evaluadas (Arango et al., 2010). Por otra parte, los otros dos parálogos, *MePSY1* y *MePSY2*, responden a estrés y contribuyen diferencialmente a la biosíntesis de carotenoides en hojas, raíces y flores (Arango et al., 2010; Welsch et al., 2010).

En tomate, existen dos genes parálogos *PSY*, que presentan expresión tejido específico (Bartley y Scolnik, 1993). *PSY1* se expresa preferentemente en flores y frutos, mientras que *PSY2* se expresa de forma constitutiva en todos los tejidos fotosintéticos (Giuliano et al., 1993; Fraser et al., 1999). El *knock-out* de *PSY1* resulta en frutos carentes de carotenoides, demostrando que *PSY2* no puede compensar la ausencia de la otra copia del gen (Fraser et al., 2000).

En este proyecto nos centraremos en el estudio de la familia de genes *PSY* que codifican para la enzima fitoeno sintasa en *B. napus*, considerada un paso limitante de la síntesis de carotenoides.

2.6. *Brassica napus*, origen y su importancia como cultivo oleaginoso

B. napus (*Brassica napus* L. var *oleifera* Delile), llamada comúnmente raps o colza, pertenece a la familia de las Brassicaceae y es una de las seis especies cultivada que forman parte del “triángulo U” (U, 1935). Genéticamente, *B. napus* es una especie alopoliploide (AACC, $2n=4x=38$) considerada una especie formada recientemente (5000-10000 millones de años de antigüedad) probablemente originada desde independientes y espontáneas hibridaciones entre

genotipos de *Brassica rapa* (AA, $2n=2x=20$) y *Brassica oleracea* (CC, $2n=2x=18$)(Fig. 2) (U N, 1935; Palmer et al., 1983; Iniguez-Luy y Federico, 2011; Xiong et al., 2011).

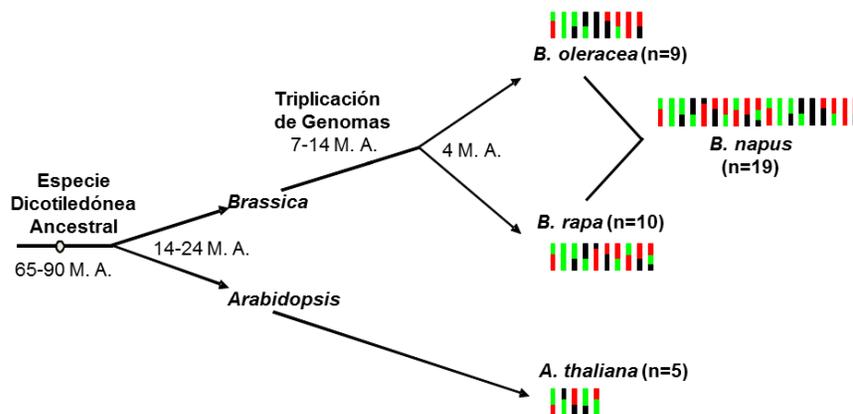


Figura 2. Relación filogenética de los linajes de *Arabidopsis* y *Brassica*. Triplicación del genoma en *Brassica* (7-14 millones de años), especiación de *B. rapa* y *B. oleracea* (4 millones de años) e hibridación interespecífica que origino a *B. napus*. Las barras de colores representan los cromosomas haploides para cada especie y rearrreglos genómicos. Basado en Inaba y Nishio. 2002; Lysak et al., 2005; Parkin et al., 2005.

A través de la historia la semilla de raps ha sido empleada como fuente de aceite vegetal industrial, pero con la aparición de líneas con bajo contenido de ácido erúico ($<2\%$ en el aceite) y glucosinolatos ($< 30 \mu\text{molg}^{-1}$ en el afrecho), denominadas CanOLA (Canadian Oil Low Acid), raps se transformó en una excelente fuente de aceite comestible (Shahidi 1990; Buzza 1995). El perfil oleico del aceite de CanOLA es muy equilibrado presentando bajo contenido de grasas saturadas, alto contenido en grasas monoinsaturadas y buena relación Omega 3/6, lo que la ha convertido en el tercer aceite consumido mayormente a nivel mundial (Stringam et al. 2003).

El cultivo de raps ha crecido rápidamente durante los últimos 30 años, llegando a establecerse como uno de los principales cultivos oleaginosos en todo el mundo, ocupando un segundo lugar después de soya con un 13,85% de la superficie mundial dedicada a la producción de este tipo de cultivos (USDA 2014). Esto es debido en parte a que es un cultivo atractivo por su alto capital de retorno, excelente producción en su uso en rotación con cultivos anuales, alta calidad de aceite y harina (fuente de proteína), sumado a otras aplicaciones industriales como fuente de productos químicos, farmacéuticos, enzimas y biocombustibles de origen renovable (Banuelos y col., 2013). En 2013, los principales productores de raps fueron: la Unión Europea con (20,85 MTM), Canadá (18 MTM), China (14,2 MTM), India (7 MTM) (20,85 MTM) y Japón, llegando a una producción total de 70,073 MTM (USDA 2014). En Chile, el aumento en los precios internacionales y el desarrollo de la producción de salmones han hecho posible el crecimiento persistente de la siembra, destinándose el 42% (40.883 há) de la superficie dedicada a cultivos industriales (96.557 há) a la producción de este cultivo, con un incremento en la última temporada del 24,83% (ODEPA, 2013). Su cultivo se concentra principalmente en variedades de polinización abierta, desde la Región de Valparaíso hasta la Región de Los Ríos, dónde se distribuye principalmente en la Región del Biobío (18,14%), Región de la Araucanía (65,37%), Región de los Ríos (7,34%) y la Región de los Lagos (7,14%) (ODEPA, 2013).

2.7. Familia de genes *PSY* en *B. napus*

Experimentos realizados por nuestro grupo de investigación han determinado la existencia de una familia de genes *PSY* en *Brassica* (Cárdenas et al., 2012). Como puede observarse en la Figura 3, se ha determinado la existencia de tres parálogos *PSY* en *Brassica rapa* (*BraA.PSY.a*; *BraA.PSY.b*; *BraA.PSY.c*) y *B. oleracea* (*BolC.PSY.a*; *BolC.PSY.b*; *BolC.PSY.c*) y determinándose la existencia de al menos seis genes homólogos *PSY* en *B. napus* (*BnaC.PSY.a*; *BnaA.PSY.b*; *BnaA.PSY.c*; *BnaA.PSY.d*; *BnaC.PSY.e*; *BnaC.PSY.f*). Los genes homólogos *PSY* de *B. napus* exhiben una alta conservación a nivel de exones, con un porcentaje de identidad que oscila entre un 85% a un 96% (Cárdenas et al., 2012). Se ha determinado que los 6 genes *PSY* presentes en *B. napus* son transcritos y se han establecido los

patrones de expresión tejido específico de cada uno de ellos mediante el uso de ADN-SSCP. Sin embargo, hasta ahora se desconocen sus funciones específicas en distintos estadios de desarrollo, en respuesta a luz y a estrés abiótico. Considerando que se desconoce si estos genes son funcionales, aislar las secuencias CDS de cada uno de los genes *BnaX.PSY* para completar sus ORFs permitirá probar en un sistema heterólogo si poseen actividad fitoeno sintasa. De ser así, sería la familia de genes PSY que codifica enzimas funcionales más grande descrita a la fecha, con un potencial uso en ingeniería metabólica del contenido de carotenoides en semilla.

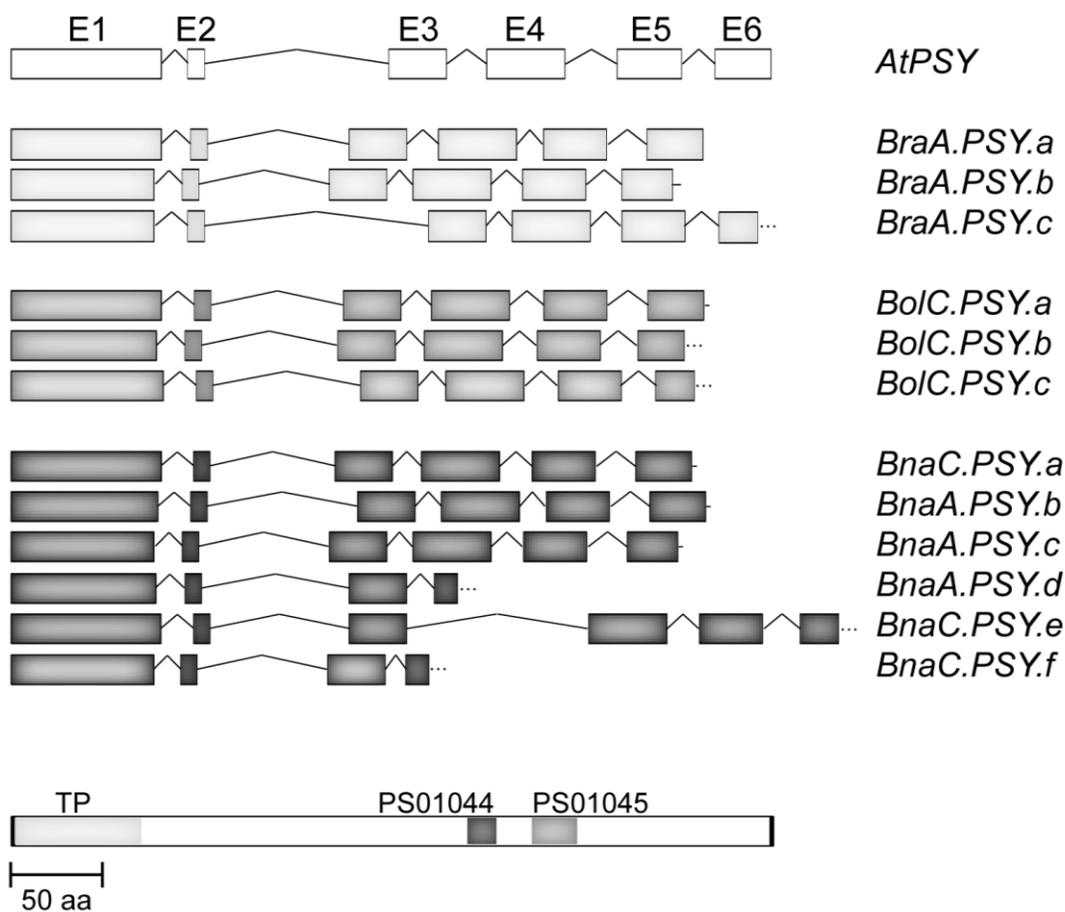


Figura 3. Familia de genes PSY identificados en Brassica. Se indica la posición relativa de cada gen PSY de Brassica en relación al gen PSY de Arabidopsis (*AtPSY*, At5g17230). Se muestran los 3 genes PSY de *B. rapa* (*BraA.PSY.a-c*), 3 genes de *B. oleracea* (*BolC.PSY.a-c*) y 6 genes de *B. napus* (*BnaX.PSY.a-f*). Exones e intrones fueron dibujados a escala y representados por cajas (E1-E6) y líneas respectivamente (Cárdenas et al., 2012).

2.8. Manipulación del metabolismo de carotenoides en plantas superiores

Los carotenoides son componentes esenciales en la alimentación humana debido en parte a que el sistema visual es dependiente de estos pigmentos. A pesar de esto, en países dónde la alimentación se basa en un cultivo básico que es carente de varios nutrientes esenciales, los suministros de vitamina A no son los adecuados (Fitzpatrick et al., 2012). Es así como los cálculos actuales reflejan deficiencia de vitamina A en 122 países (concentración de retinol en el suero $<0,70 \mu\text{mol} / \text{l}$) (WHO, 2009). También se ha determinado que 45 países presentan deficiencia de vitamina A en base a la ceguera nocturna en niños de edad preescolar (WHO, 2009).

El mayor conocimiento obtenido en los últimos años de la biosíntesis, transporte y almacenamiento de los carotenoides en plantas, ha permitido la obtención de variedades elite con niveles incrementados de pigmentos provitamina A. Al respecto, diversas estrategias han sido utilizadas con el fin de incrementar los niveles de carotenoides en plantas (DellaPenna y Pogson, 2006; Naqvi et al., 2009; Farré et al., 2011). El ejemplo más conocido es el “Arroz Dorado”, dónde la expresión con dirección al endosperma de arroz (*Oryza sativa*) del gen *PSY* de narciso y el gen *crtI* de *Erwinia uredovora* incrementó los niveles de carotenoides a $1,6 \mu\text{g/g}$ en el endosperma, lo que incluyó β -caroteno y xantófilas (Ye et al., 2000). Una segunda generación, el “Arroz Dorado- 2” fue producido utilizando el gen *Zm-PSY1* de maíz en combinación con el gen *crtI* de *Erwinia uredovora* que resultó en incrementar los niveles de carotenoides hasta 23-veces ($37 \mu\text{g/g}$) comparado con el “Arroz Dorado” original, y una acumulación principal de β -caroteno (Paine et al., 2005).

En tomate (*Lycopersicon esculentum*), la sobreexpresión del gen *CrtB* (*PSY*) de *Erwinia uredovora*, resultó en un incremento de carotenoides en fruto de 2 a 4 veces (Fraser et al., 2002).

En papa (*Solanum tuberosum*), diversas estrategias se han utilizado para incrementar los niveles de carotenoides en el tubérculo que normalmente carece de estos pigmentos. Por ejemplo, la cotransformación con los genes *crtB*, *crtI* y *crtY* de *Pantoea ananatis*, incrementó los niveles de carotenoides 20 veces ($114 \mu\text{g/g}$) respecto a la planta sin transformar,

obteniéndose la “Papa Dorada” (Diretto et al., 2007). Aumentar la capacidad de almacenamiento al expresar el gen *Or* (orange) de *B. oleracea* en papa, también resultó en un incremento (10 veces) de los niveles de carotenoides en este cultivo (López et al., 2008). A su vez, mediante el uso de RNA de interferencia, se disminuyó la expresión de la licopeno ϵ -ciclase, obteniéndose niveles incrementados de carotenoides totales (2,5 veces) y de β -caroteno (14 veces) (Diretto et al., 2006).

En la naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), el silenciamiento por ARN interferente del gen endógeno que codifica la β -caroteno hidroxilasa (*Cs β – CHX*), enzima involucrada en la conversión de β -caroteno a xantofilas, resultó en la obtención de un fenotipo de color amarillo intenso y un aumento en su contenido de β -caroteno en la pulpa hasta 36 veces superior, obteniéndose la “naranja dorada”. A la vez, mediante un estudio *in vivo* con *Caenorhabditis elegans* se determinó un incremento del 20% en el efecto antioxidante de las naranjas enriquecidas en β -caroteno respecto al control (Pons et al., 2014).

En otras especies como maíz (*Zea mays*), la cotransformación con múltiples genes han permitido considerar el suministro de múltiples vitaminas a través de un solo cultivo. Un ejemplo de esto es lo reportado por Naqvi et al. (2009). Al introducir los genes *ZmPSY1* y *PaCRT1* (ruta de carotenoides), *Dhar* (ruta del ascorbato) y el gen *folE* (ruta del folato) en el endosperma, incrementaron significativamente los niveles de β -caroteno (169 veces), ascorbato (6 veces) y folato (2 veces), proporcionando de esta manera un primer paso para la obtención de cereales “super-nutritivos”.

Así, el consumo de estos cultivos genéticamente mejorados puede permitir suplir las necesidades diarias de vitamina A. A este respecto, los cálculos indican que considerando a α -caroteno y β -caroteno como precursores de vitamina A y con una relación de conversión de 6:1 en retinol que el 100% de la vitamina A para niños y el 38% para adultos podrían ser alcanzados con 5 g/día del aceite Dorado de canola (Shewmaker et al., 1999), 60 g/día (PS) 'Arroz Dorado- 2' (Paine et al., 2005) y 150 g/día (PF) de “Papa Dorada” (Diretto et al., 2007; Giuliano et al., 2008; Giuliano, 2017).

2.9. Incremento en el contenido de carotenoides en *B. napus* a través de ingeniería metabólica

Considerando que la producción industrial de carotenoides está principalmente basada en síntesis química, existe una oportunidad comercial para la producción de carotenoides desde fuentes naturales como las plantas (Giuliano et al., 2008, Giuliano, 2017). *B. napus*, por ser un cultivo con un contenido de carotenoides en semilla entre 22-33 µg/g de peso seco, pero principalmente por tener un alto potencial para su almacenamiento, es considerado un blanco para ingeniería metabólica (Nakvi et al., 2009). Al respecto, estudios previos han demostrado que es posible manipular la ruta de síntesis de carotenoides en esta especie. Por ejemplo, Shewmaker y col (1999) incrementaron 50 veces los niveles de carotenoides en semilla (1180 µg de carotenoides /g de peso seco) al expresar el gen fitoeno sintasa de *Erwinia uredovora* (*CrtB*). Resultados similares fueron obtenidos por Ravanello y col (2003), expresando el mismo gen bacteriano (1341 µg de carotenoides/g de peso seco). Adicionalmente, Fujisawa et al.,(2009), observaron que al introducir siete genes incluyendo *CrtB*, *CrtW* y *CrtZ*, bajo el control de promotores semilla específicos y constitutivos, el contenido total de carotenoides en la semilla aumentó 30 veces, además de presentar un incremento en el nivel de ketocarotenoides. Estos resultados evidencian una alta capacidad de síntesis y acumulación de carotenoides en semilla, a la vez que demuestran que la enzima PSY es limitante en la acumulación de carotenoides en esta especie. A diferencia de estudios previos, este trabajo plantea sobreexpresar un gen *PSY* endógeno. Dado que las enzimas involucradas en las primeras reacciones de la ruta de síntesis de carotenoides se agrupan en un complejo enzimático ubicado en los plastídios, se estima que la expresión de genes *PSY* de mayor cercanía filogenética puede resultar en una mejor interacción con las demás enzimas del complejo (Cunningham y Gantt, 1998; Cunningham et al., 2002). Esto ha sido reportado en el caso del “Arroz Dorado- 2” donde la sobreexpresión de un gen *PSY* de maíz aumentó 23 veces los niveles de carotenoides en el endosperma de arroz en comparación con el gen *PSY* de narciso (Paine et al., 2005). Considerando que la mayor diferencia a nivel de secuencia codificante de las 6 copias *PSY* de *B. napus* se encuentra justamente localizada en la región N-terminal que corresponde al péptido de tránsito (TP) y dada la alta identidad a nivel de secuencia de las 6 proteínas PSY, en este proyecto se propone seleccionar un gen endógeno

PSY que presente expresión en semilla como también en tejidos ricos en cloroplastos y cromoplastos para sobreexpresarlo en semillas de *B. napus* con el objetivo de generar líneas transgénicas con mayor contenido de carotenoides.

Es importante mencionar que en diversos organismos se ha encontrado una correlación directa entre la dosis de genes y la actividad de una proteína particular (Osborn et al., 2003). Por ejemplo, el gen Flowering Locus C (*FLC*) presente en copia única en *Arabidopsis thaliana* pero representado por 5 copias en *B. rapa*, exhibe un claro efecto aditivo (dosaje) en el tiempo de floración (Ramsey y Schemske, 1998). Así, se piensa que la expresión de un gen regulado por dosaje puede resultar un componente clave en la selección medioambiental de algunos genes duplicados, especialmente de los que regulan importantes procesos de desarrollo, en organismos poliploides (Osborn et al., 2003). En el caso de *PSY* que es un gen clave en la síntesis de carotenoides y considerando la conservación de las 6 copias en *B. napus*, se propone evaluar el nivel de expresión de los 6 genes homólogos y del gen endógeno sobreexpresado, a la vez que se evalúa el nivel de proteína de este último en semilla de *B. napus* transgénicas con el fin determinar si existe un efecto de dosaje en este tejido.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando que los carotenoides son pigmentos esenciales para plantas, animales y humanos y que existe una oportunidad comercial para la producción de carotenoides a partir de fuentes naturales, resulta oportuna una mejor comprensión del gen clave (*PSY*) de la ruta de síntesis de estos pigmentos en *B. napus*, una de las especies oleaginosas más importantes a nivel mundial. En este sentido, estudios previos han determinado la existencia en esta especie de una familia de genes *PSY* compuesta por seis miembros, sin embargo, hasta ahora se desconoce si todos estos genes son funcionales. Al respecto, aislar las secuencias CDS de cada uno de los genes *BnaX.PSY* para completar sus ORFs permitirá probar en un sistema heterólogo si poseen actividad fitoeno sintasa.

Por otra parte, estudios previos han demostrado que *PSY* es un factor limitante en la síntesis de carotenoides en semilla de *B. napus*, a la vez que se ha demostrado que es posible incrementar el contenido de carotenoides en este tejido. A diferencia de estudios previos, este trabajo plantea sobreexpresar un gen *PSY* endógeno. Dado que las enzimas involucradas en las primeras reacciones de la ruta de síntesis de carotenoides se agrupan en un complejo enzimático ubicado en los plastídios, se estima que la expresión de genes *PSY* de mayor cercanía filogenética puede resultar en una mejor interacción con las demás enzimas del complejo, como ha sido observado en arroz. En esta tesis se propone seleccionar un gen endógeno *PSY*, que posea actividad fitoeno sintasa y que presente expresión en tejidos ricos en cloroplastos y cromoplastos con el fin de sobreexpresarlo en semillas de *B. napus* con el objetivo de generar líneas transgénicas con mayor contenido de carotenoides.

4. FORMULACION DE HIPÓTESIS

Considerando que *Brassica napus* L. es una especie poliploide que presenta una familia de genes *PSY* compuesta por al menos 6 miembros que son expresados en diversos tejidos y que se ha demostrado que la actividad fitoeno sintasa es limitante en la síntesis de β -caroteno en esta especie, las hipótesis de trabajo propuestas son:

4.1. Hipótesis de trabajo

- 1.** La familia *PSY* en *B. napus* L. está compuesta por seis genes homólogos funcionales.
- 2.** La sobreexpresión en semilla de un gen endógeno *PSY* y el consecuente aumento en los niveles de proteína fitoeno sintasa en este tejido, generará líneas transgénicas de *B. napus* L. con mayor acumulación de carotenoides.

5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la funcionalidad de los 6 miembros de la familia *PSY* de *Brassica napus* L. y seleccionar un homólogo *PSY* que presente expresión tanto en tejidos ricos en cloroplastos como cromoplastos a fin de sobreexpresarlo específicamente en semilla utilizando transgenia, con el propósito de generar líneas con mayor capacidad de síntesis de carotenoides.

5.2. Objetivos específicos

- 1.** Determinar la funcionalidad de los seis miembros de la familia *PSY* de *B. napus* L.
- 2.** Obtener plantas transgénicas de *B. napus* L. que sobreexpresen en semillas un gen *PSY* endógeno funcional seleccionado por su expresión tanto en tejidos ricos en cloroplastos como cromoplastos.
- 3.** Determinar el contenido de carotenoides en semillas de líneas transgénicas que sobreexpresan un gen *PSY* endógeno funcional.

CAPITULO I

Análisis funcional de la familia de genes fitoeno sintasa (PSY) de

***Brassica napus* L.**

1. INTRODUCCIÓN

Estudios previos han sugerido que el control del flujo hacia la síntesis de carotenoides es mediado por la enzima codificada en el núcleo, fitoeno sintasa (PSY), la primera enzima comprometida en la ruta de síntesis de estos compuestos localizada en los plastídios. PSY cataliza la condensación de dos moléculas GGPP en 15-*cis*-fitoeno que es el primer carotenoide de la ruta y la columna vertebral para la síntesis de los demás carotenoides de C₄₀ y apocarotenoides (Misawa et al., 1994; Hirschberg J, 2001; Fraser y Bramley, 2004; Giuliano et al., 2008; Rodríguez-Villalón et al., 2009; Cazzonelli y Pogson B, 2010; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012, Giuliano, 2017).

PSY es codificada por un gen de copia única en *Arabidopsis thaliana*, por lo tanto, en esta especie el control del flujo de la ruta es limitado a la regulación de éste único gen (Cazzonelli y Pogson, 2010). Esto se traduce además en que PSY en *Arabidopsis* es expresado virtualmente en todos los tejidos (Welsch et al., 2003) Sin embargo, la mayoría de las especies vegetales contienen pequeñas familias de genes PSY compuestas de tres o más miembros (Bartley et al., 1992; Bartley y Scolnik 1993; Busch et al., 2002; Gallagher et al., 2004; Li et al., 2008a; Arango et al., 2010). En estas especies, sus isoformas presentan subfuncionalización, dónde algunas están envueltas en la biosíntesis de los carotenoides en tejido fotosintético rico en cloroplastos, mientras que otras participan en la producción de carotenoides en tejidos no fotosintéticos como en frutos, semillas y raíz (Bartley y Scolnik, 1993; Giuliano et al., 1993; Fraser et al., 1999; Fraser et al., 2000; Li et al., 2008a; Li et al., 2008b; Welsch et al., 2008), modulando en este último caso la síntesis de ácido abscísico (ABA) inducido por estrés abiótico (Li et al., 2008b; Welsch et al., 2008).

B. napus L. (*Brassica napus* L. var *oleifera* Delile AACC; n=19) es una especie alotetraploide originada desde la relativamente reciente (~5000-10000 millones de años de antigüedad) hibridación de dos genomas diploides base (U, 1935; Palmer et al., 1983; Iniguez-Luy y Federico, 2011; Xiong et al., 2011). Estas especies diploides parentales, *Brassica rapa* L. (AA; 2n=2x=20) y *Brassica oleracea* L. (CC; 2n=2x=18), son consideradas poliploides antiguos, cada una compuesta de tres subgenomas parálogos similares al genoma de *A. thaliana*, ó “*Arabidopsis*-like” (Lysak et al., 2005; Parkin et al., 2005; Xiong et al., 2011; The

Brassica rapa Genome Sequencing Project Consortium, 2012). Así, *B. napus* presenta seis subgenomas, tres provenientes de *B. rapa* y tres de *B. oleracea*. Sin embargo, en *B. napus* las familias de genes no necesariamente están presentes en seis copias (O'Neill y Bancroft 2000; Town et al., 2006; Yang et al., 2006; Wells et al., 2014). Por el contrario la mayoría de los genes duplicados se han perdido mientras que sólo algunos fueron conservados durante el proceso de diploidización, mediante el cual el genoma tiende a su complemento original (Yang et al., 2006; Cheng et al., 2012; Rensing, 2014). Esto explica por qué menos del 10% de los genes modelos predichos de *A. thaliana* han sido encontrados retenidos como ortólogos sinténicos en los tres subgenomas del recientemente secuenciado genoma de *B. rapa* (The Brassica rapa Genome Sequencing Project Consortium, 2012)

Al respecto, nuestro grupo de investigación ha reportado recientemente que los genes *PSY* han sido retenidos en estado triplicado en ambos genomas diploides de Brassica (A y C) y en *B. napus* se han retenido sus seis copias, siendo la familia de genes *PSY* más numerosa descrita hasta la fecha en plantas (Cárdenas et al., 2012). En otras palabras, cada gen *PSY* en *B. napus* posee una pareja homeóloga fruto de aloploidización que terminó reuniendo a los genomas A y C en un mismo núcleo (Glover N et al., 2016). Todos los miembros de la familia de genes *PSY* de Brassica son expresados, exhibiendo redundancia, y signos de subfuncionalización. En *B. napus*, la expresión de los genes *BnaC.PSY.a* y *BnaA.PSY.b* fue detectada en todos los tejidos, pero las parejas de genes homeólogos *BnaA.PSY.d/BnaC.PSY.f* y *BnaA.PSY.c/BnaC.PSY.e* presentan expresión preferencial en tejidos ricos en cloroplastos y cromoplastos respectivamente (Cárdenas et al., 2012). Sin dudas, la retención de los genes *PSY* no sólo demuestra la importancia de la enzima, sino que también es evidencia de subfuncionalización en estas especies.

Sin embargo, si bien se ha avanzado en el estudio de esta familia de genes *PSY* en *B. napus*, hasta ahora, los estudios realizados no presentan evidencia de que los seis miembros de la familia conduzcan a la formación de fitoeno desde GGPP. Es por esto que los objetivos de este estudio fueron determinar si los 6 miembros de la familia *PSY* en *B. napus* L corresponden a copias funcionales mediante el aislamiento de sus respectivas secuencias codificantes (CDS),

caracterización y modelamiento de sus estructuras tridimensionales y posterior evaluación de su actividad fitoenzimática en un sistema de complementación heterólogo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Plantas de *Brassica napus* cv. Westar fueron crecidas en invernadero bajo condiciones controladas en ciclos de 16-h-día/8-h-noche. Para la extracción de ADN genómico (gADN) y extracción de RNA total, el tejido fue colectado e inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C.

2.2. Aislación de ácidos nucleicos y síntesis de cDNA

La aislación de ADN fue conducida siguiendo el procedimiento CTAB descrito por Kidwell y Osborn (1992) a partir de hojas jóvenes desde plantas maduras. Para las extracciones de RNA, cotiledones, plántulas con 3-4 hojas verdaderas, hojas jóvenes desde plantas maduras, fueron colectadas como se describe en Cárdenas et al. (2012). El RNA total fue extraído usando RNA-Solv Reagent (Omega Bio-Tek, GA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. RNA total (2 µg) de todos los tejidos fue tratado con RQ1 DNase (Promega, WI, USA) y la síntesis de cDNA se llevó a cabo usando un partidador oligo (dT) y M-MuLV Reverse Transcriptase (New England BioLabs, MA, USA) como fue descrito previamente (Cárdenas et al., 2012).

2.3. Clonación de genes *PSY* de *B. napus*

Con el objetivo de completar las secuencias de ADN genómico de los genes *BnaA.PSY.d* y *BnaC.PSY.f* publicadas previamente (Cárdenas et al., 2012), fueron diseñados oligonucleótidos específicos (BnaA.PSY.d-F1, BnaA.PSY.d-R1; BnaC.PSY.f-F1, BnaA.PSY.d-R1 respectivamente, Tabla S1). La amplificación de nuevos fragmentos de estos genes se realizó con Go Taq DNA polymerase (Promega, WI, USA) a partir de ADN genómico extraído de cotiledones de *B. napus*. Los fragmentos de PCR específicos fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO usando el kit TOPO TA cloning (Invitrogen, CA, USA).

2.4. Rápida amplificación de los extremos de cDNA (RACE) de los genes *PSY* de *B. napus*

Oligonucleótidos específicos *BnaX.PSY* (Tabla 1) fueron diseñados con el fin de clonar los extremos de cDNA 5' y 3' de los seis genes *PSY* de *B. napus* usando el kit GeneRacer™ (Invitrogen, CA, USA). RNA total extraído de tejido de hoja, pétalo y plántulas fue usado para sintetizar el cDNA RACE-ready como fue descrito en Federico et al. (2005) con modificaciones menores. Los productos de PCR obtenidos fueron purificados por gel (E.Z.N.A. Gel Extraction Kit, Omega Bio-Tek, GA, USA) y clonados en el vector StrataClone Blunt (Agilent Technologies, CA, USA).

2.5. Clonación de la secuencia codificante de las proteínas *PSY* de *B. napus*

Basados en un reporte previo (Cárdenas et al., 2012), se usaron oligonucleótidos (Bna.PSY.15F y Bna.PSY.8R, Tabla S1) para amplificar la secuencia codificante completa (CDS) de los genes *BnaC.PSY.a* (GenBank JF920037) y *BnaA.PSY.b* (GenBank JF920038) usando KOD Hot Start DNA Polymerase (Novagen, WI, USA) a partir de cDNAs de hoja, pétalo y semilla de *B. napus*. Los productos de PCR específicos (1290 bp) fueron clonados en el vector pGEM-T (Promega, WI, USA). Para aislar los cuatro CDS remanentes (*BnaX.PSY.c-f* (GenBank JF920039-42)) se diseñaron partidores oligonucleótidos específicos, BnaA.PSY.c-F1, BnaC.PSY.e-R1; BnaA.PSY.d-F1, BnaA.PSY.d-R1, BnaC.PSY.e-F1, BnaC.PSY.e-R1; BnaC.PSY.f-F1, BnaA.PSY.d-R1, respectivamente (Tabla S1) que fueron utilizados para amplificar los fragmentos usando Go Taq DNA polymerase (Promega, WI, USA) desde cDNAs de pétalo y cotiledón de *B. napus*. Los fragmentos de PCR específicos fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO usando el kit TOPO TA cloning (Invitrogen, CA, USA). Para cada caso, varias colonias por clon fueron secuenciadas para confirmar su secuencia e identidad.

2.6. Análisis de la secuencia codificante de las proteínas PSY de *B. napus*

Las secuencias obtenidas de cada clon *BnaX.PSY*, incluyendo las amplificaciones de cDNA, RACE y ADN genómico fueron ensambladas usando la herramienta contig de ADN Baser Sequence Assembler v3.x (Heracle BioSoft SRL Romania, <http://www.DnaBaser.com>) y comparadas a las accesiones de GenBank (*BnaX.PSY.a-f*: JF920037-JF920042) provenientes de una investigación previa (Cárdenas et al., 2012). El alineamiento de las secuencias nucleotídicas y aminoacídica deducida del CDS completo fue realizado usando ClustalW2 (Chenna et al., 2003). El gen *PSY* de *Arabidopsis* (At5g17230) fue incluido como referencia. La presencia de un péptido de tránsito al cloroplasto fue predicho usando el servidor ChloroP 1.1 (Emanuelsson et al., 1999). El porcentaje de identidad entre las secuencias aminoacídicas incluyendo o no el péptido de tránsito fue realizado usando ClustalW2 (Chenna et al., 2003). Los dominios conservados de la proteína fueron identificados usando la herramienta NCBI CDD (Marchler-Bauer et al., 2013). El remplazo de nucleótidos (Ka) y sustituciones sinónimas (Ks) fue estimado usando DNASP5 (Librado y Rozas, 2009). La relación filogenética fue inferida usando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei 1987) con un soporte de replicación de arranque-500 (Felsenstein, 1985) usando el programa MEGA4 (Tamura et al., 2007). Las ramas correspondientes a las particiones reproducidas fueron colapsadas en menos que el 50% de las réplicas del bootstrap. Las unidades fueron expresadas como el número de sustituciones de aminoácidos por sitio. Todas las posiciones que contienen gaps y datos perdidos fueron eliminadas (opción delección completa), dejando un set de datos final de 328 posiciones. Las accesiones de las enzimas PSY usadas en el análisis fueron las siguientes: *Arabidopsis* (AtPSY, AAA32836), cassava (MePSY1, ACY42666; MePSY2; ACY42670), maíz (ZmPSY1, P49085; ZmPSY2, AAQ91837; ZmPSY3, ABC75827), arroz (OsPSY1, AAS18307; OsPSY2, AAK07735; OsPSY3, ABC75828) y sorgo (SbPSY1, AAW28996; SbPSY2, XP002442578; SbPSY3, AAW28997). La secuencia de la proteína MePSY3 de cassava fue obtenida desde Phytozome (<http://www.phytozome.net/cassava.php>) como se describe en Arango et al., (2010).

2.7. Modelamiento molecular de las proteínas PSY de *B. napus*

La predicción de la estructura de la proteína fue realizada usando una combinación de *ab initio* plegado y enhebrado de la secuencia aminoacídica de cada gen *BnaX.PSY* sin su péptido de tránsito al cloroplasto en múltiples templados, escualeno sintasa y carotenoide dehidroescualeno sintasa, usando el servidor en línea I-TASSER (Roy et al., 2010). Las estructuras plegadas fueron evaluadas en el servidor ProSA (Wiederstein y Sippl, 2007; Sippl 1993). Para reducir estiramientos estéricos presentes en las estructuras, se realizó una minimización de energía y simulación de dinámica molecular de 2 ns por cada estructura modelada usando el software NAMD (Phillips et al., 2005). Durante la simulación de dinámica molecular, cada sistema fue solvatado en una caja de agua TIP3P y neutralizado con NaCl para simular las condiciones biológicas. La predicción de interacciones proteína-proteína se realizó analizando los archivos PDB generados en las etapas previas, usando el servidor meta-PPISP (Qin y Zhou, 2001).

2.8. Test de complementación funcional de las proteínas PSY de *B. napus* en *E. coli*

Para evaluar si cada una de las seis proteínas PSY de *B. napus* tienen actividad fitoeno sintasa, se realizó un ensayo de complementación heteróloga. Dos cepas de *Escherichia coli* BL21-Gold donadas por el Dr. Victor Cifuentes (Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile) y estandarizadas en colaboración con la Dra. Claudia Stange (Laboratorio de Biología Molecular Vegetal del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile) fueron usadas en el ensayo de complementación. Una cepa productora de β -caroteno (DS1B) transformada con el plásmido pDS1B, un vector pBAD33 que contiene los genes de la ruta de síntesis de carotenoides de *Erwinia uredovora*, *crtE*, *crtB* (fitoeno sintasa), *crtI*, *crtY* y *crtX* y una cepa no productora (DS1B- Δ *crtB*) transformada con el plásmido pDS1B- Δ *crtB* que tiene una delección Eu-*crtB* (Figura 1A) (Niklitschek et al., 2008). La cepa DS1B productora de β -caroteno, se utilizó como un control positivo. La cepa DS1B- Δ *crtB* transformada con el vector de expresión pETBlue1 vacío (Novagen, USA) se utilizó como un control negativo. Cada secuencia codificante *BnaX.PSY*, sin su péptido señal y que codifica un codón de inicio ATG fue amplificada usando la enzima KOD Hot Start DNA

Polymerase (Novagen, WI, USA) usando partidores específicos (Tabla S1). Cada producto de PCR amplificado fue purificado desde gel (E.Z.N.A. Gel Extraction Kit, Omega Bio-Tek, GA, USA) e insertado en el sitio *EcoRV* del vector de expresión pETBlue-1 (Figura 1B). Luego de la transformación en *E. coli*, la inserción en dirección sentido fue verificada por medio de una doble digestión enzimática de cada miniprep, en el caso de pETBlue1-*BnaX.PSY.a-c* las miniprep fueron digeridas con *HindIII* y *ScaI*, mientras que pETBlue1-*BnaX.PSY.d-f* con *HindIII* y *XbaI* (New England BioLabs, MA, USA). Las miniprep seleccionadas fueron secuenciadas con el fin de verificar la integridad de las secuencias. Para evaluar la actividad de la enzima, cada vector de expresión resultante pETBlue1-*BnaX.PSY* fue transformado en la cepa pDS1B-*ΔcrtB* usando un sistema de electroporación ECM600 (BTX, MA, USA). Las transformantes fueron crecidas en 15 ml de medio Luria-Bertani (LB) conteniendo los antibióticos apropiados (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicilina, 34 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cloramfenicol) por 16 h. a 37°C. Los cultivos (1 ml) se utilizaron para inocular 100 ml medio LB (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicilina, 34 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cloramfenicol) y crecidos a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5-0,8 a 600 nm. Luego estos cultivos fueron crecidos a 30°C por 64 h. en oscuridad para maximizar la producción de carotenoides. Cada clon, control positivo y negativo fueron crecidos en triplicado. De cada cultivo, 15ml fueron usados para calcular su peso seco. Brevemente, 15 ml de cultivo se distribuyeron en tres tubos (5 ml), se centrifugaron a 3200 g por 20 min, luego el pellet obtenido fue secado a 80°C por 16 h. El peso seco se determinó por la diferencia entre el peso del tubo vacío y el tubo con el pellet seco. La extracción de carotenoides fue realizada a partir de los 80 ml restantes de cada cultivo como se detalla a continuación: (1) La extracción procedió con la centrifugación del cultivo a 3200 g por 20 min (2) el pellet obtenido es lavado con 10 ml de agua y centrifugado a 3200 g por 20 min (3) los carotenoides fueron extraídos tres veces con sucesivos procesos que incluyen la pulverización del pellet con perlas de vidrio de 0,5 mm y acetona (1ml) (vortex 8 min cada vez), centrifugación a 3200 g por 10 min y colecta de la fase acuosa (4) la fase acuosa colectada es lavada tres veces por medio de la adición por vez de 2 ml de acetona, agitación por vortex (8 min), centrifugación a 3200 g por 10 min y colecta de la fase acuosa (5) a la fase acuosa colectada se le adiciona éter de petróleo (1ml por cada 4 ml de fase acuosa), se agita en vortex (8 min), se centrifuga a 3200 g por 10 min y se colecta la fase orgánica que contiene los carotenoides en tubos de vidrio. Los carotenoides extraídos fueron concentrados y secados con nitrógeno gaseoso. Los pigmentos

secos fueron resuspendidos en 1 ml de acetona grado-HPLC al 100% y filtrados para ser sometidos a análisis por HPLC de acuerdo a la metodología descrita por Sáez et al., (2013). En síntesis, los pigmentos fueron separados y cuantificados por HPLC en fase reversa (García-Plazaola y Becerril 1999) El equipo usado consistió de una bomba cuaternaria con sistema de desgasificación automática y automuestreador. La señal desde el detector con arreglo de diodo fue integrada y analizada usando el software Agilent ChemStation B.04.01 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). La cromatografía se llevó a cabo utiliza una columna fase inversa Spherisorb ODS-1 (5 μ m tamaño de partículas; 4.6 mm \times 250 mm, Atlantil Hilit, Waters, Irlanda), una Nova-pack C-18 (4 μ m; 3.9 mm \times 20 mm) y una precolumna (Waters, Irlanda). La fase móvil consistió en dos componentes: Solvente A, acetonitrilo: metanol: Tris Buffer (0,1M, pH 8,0) (42:1:7) y solvente B, metanol: acetato de etilo (34:16). El β -caroteno fue identificado comparando en el espectro los tiempos de retención y patrón de absorción con la de un estándar natural (DHI, Hoerssholm, Dinamarca). La concentración de β -caroteno, fue calculada en base al peso seco del pellet bacteriano.

2.9. Análisis estadístico

El promedio de la concentración de β -caroteno de los pellet bacterianos obtenida mediante la complementación heteróloga con cada gen *BnaX.PSY*, fueron sujetos a análisis de varianza de una vía (ANOVA) usando el software IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0 (Armonk, NY: IBM Corp). Las diferencias entre valores fueron consideradas significativas con un valor $P \leq 0,05$.

2.10. Análisis de la abundancia relativa de transcritos para los 6 genes *PSY* endógenos por RT-PCR durante el desarrollo de semillas de *B. napus*

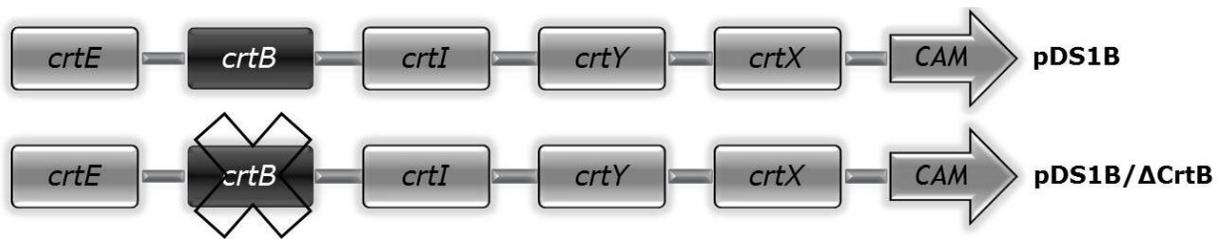
Para evaluar la abundancia relativa de transcritos para los 6 genes *PSY* endógenos durante el desarrollo de semillas mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR). RNA total de semillas colectadas a los 20, 30, 45 y 60 días post antesis

(dpa) y hojas, fueron extraídos usando el kit Absolutely RNA RT-PCR Miniprep Kit (Agilent Technologies, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La síntesis de cDNA fue realizada usando el kit SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Ca, USA) desde 2 µg de RNA total en un volumen de reacción de 30 µl. La síntesis de cDNA fue evaluada mediante la amplificación por PCR del gen *18S* (*EX119428*) de *B. napus* usando la pareja de partidores Bna18S (Tabla S1). La ausencia de contaminación por gDNA fue evaluada por amplificación por PCR del gen Actina de *B. napus* usando partidores específicos (Bna.Actina-F y Bna.Actina-R). Esta pareja de partidores genera un fragmento predicho de 725-pb a partir de cDNA y un fragmento de 900-pb desde gDNA debido a la presencia de un intron (dato no mostrado). Los RT-PCRs fueron llevados a cabo usando GoTaq Flexi DNA Polimerasa (Promega, WI, USA). LA amplificación inicia con un paso de denaturación a 95°C (5 min), seguido por 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 ciclos de 30 seg a 55-57°C y 1 min a 72°C, con una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de RT-PCR fueron corridos y visualizados en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La especificidad de los partidores BnaX.PSY fue comprobada testeando los pares de partidores usando plásmidos que contienen cada uno de los seis genes *PSY* de *B. napus* como templado y corriendo los productos resultantes de la PCR junto con los productos de las RT-PCR en geles individuales de polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP) (Figura suplementaria S2). Para el gel SSCP, 20 µL de producto de PCR fue purificado de gel (E.Z.N.A. Gel Extraction Kit, Omega Bio-Tek, GA, USA) y eluido en 20 µL. El producto purificado (6 µL) fue luego mezclado con 12 µL de SSCP buffer de carga (95% formamida, 10 mM NaOH, 0,25% (p/v) xileno cianol, 0,25% (p/v) azul de bromofenol). Para el control de plásmidos, 3µL fueron mezclados con 15 µL de buffer de corrida. El análisis SSCP se realizó esencialmente como se describe en Cardenas et al., 2012.

2.11. Números de accesoión

Las secuencias que codifican las proteínas PSY de *B. napus* descritas en esta tesis han sido depositadas en GenBank bajo los siguientes números de accesoión: *BnaX.PSY.a-f*. KF297329-KF297334.

A



B

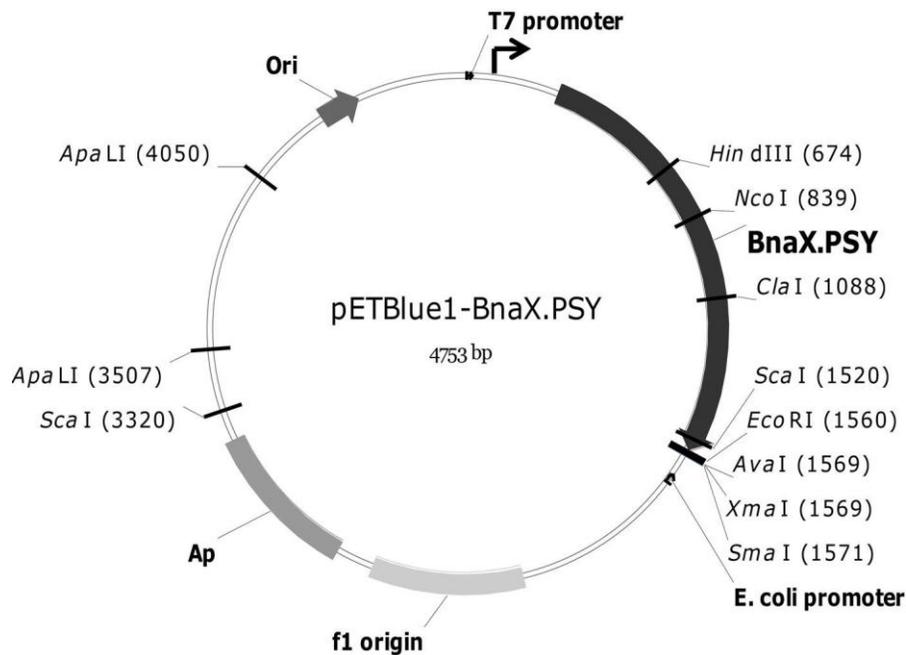


Figura 1. Sistema de complementación heteróloga. (A) Dos cepas de *E. coli* BL-21 Gold fueron usadas, una cepa productora de β -caroteno (DS1B) transformada con el plásmido pDS1B, un vector pBAD33 que contiene los genes de la ruta de síntesis de carotenoides de *Erwinia uredovora*, *crtE*, *crtB* (fitoeno sintasa), *crtI*, *crtY* y *CrtX* y una cepa no-productora (DS1B- Δ *crtB*) transformada con el plásmido pDS1B- Δ *crtB* que tiene una delección en el gen *CrtB*. (B) Seis vectores pETBlue1-BnaX.PSY fueron generados, cada uno conteniendo un homólogo *PSY* de *B. napus*, sin su correspondiente péptido de tránsito, clonado en el sitio EcoRV.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislación y análisis de secuencias de los genes *PSY* de *B. napus*

En estudios previos mediante la clonación de genes, análisis ADN-SSCP y Southern Blot, se reveló la existencia de al menos 6 genes homólogos *PSY* en *B. napus* (Cárdenas et al., 2012). A la vez, se demostró que los seis genes *PSY* son expresados, presentando redundancia y signos de subfuncionalización entre tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos (Cárdenas et al., 2012). Sin embargo, se desconocía si esta gran familia de genes *PSY* realmente codifica seis enzimas funcionales. Mediante la investigación realizada en esta tesis, se extendió el trabajo previo de clonación de las secuencias genómicas faltantes, a la vez se realizó la clonación, caracterización y comparación de las secuencias que codifican la proteína completa (CDS) de estos seis genes *PSY* de *B. napus*. Con este fin, en primer lugar se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla S1) que permitieron aislar las secuencias faltantes de ADN genómico de los genes *BnaA.PSY.d* (BnaA.PSY.d-F1, BnaA.PSY.d-R1) y *BnaC.PSY.f* (BnaA.PSY.d-F1, BnaC.PSY.f-R1) de *B. napus*. De esta manera se estableció que los genes, *BnaA.PSY.d* y *BnaC.PSY.f* al igual que sus genes homólogos, presenta una estructura predicha similar a la de *AtPSY*, con seis exones y cinco intrones (Figura 2) de largo variable. En la Tabla 1, se describen ambos genes *BnaA.PSY.d* y *BnaC.PSY.f*, asociando la información obtenida en esta investigación y la reportada anteriormente (Cárdenas et al., 2012). Se indica en detalle, la longitud de cada exón (E1-E6), intrón (I1-I5), secuencia genómica desde el codón de inicio al de término (gDNA), determinándose respecto a este último un largo total de 2073 pb del gen *BnaA.PSY.d* y de 1991 pb del gen *BnaC.PSY.f* (Tabla1). La mayor variabilidad de secuencia se encontró en los intrones, mientras que a nivel de exones, se observó una alta similitud entre las copias, encontrándose las principales diferencias en el exón 1.

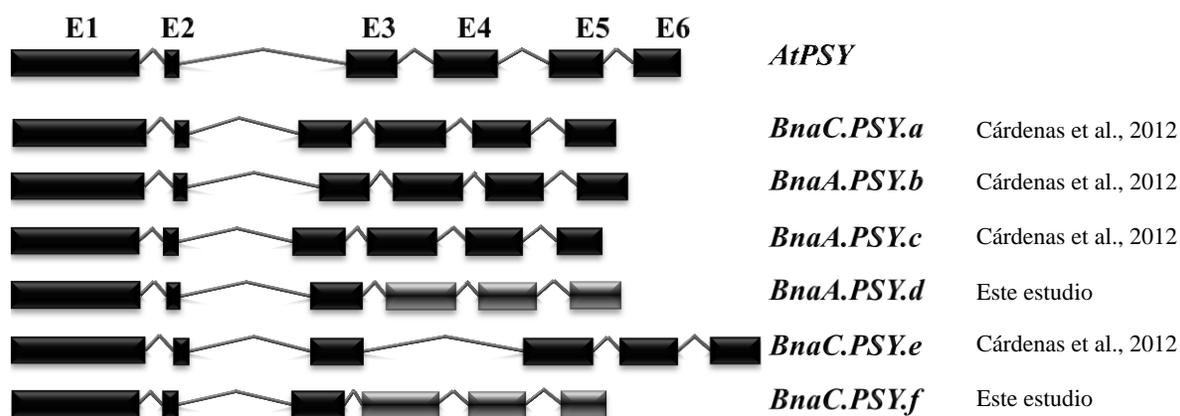


Figura 2. Estructura de genes *PSY* de *B. napus*. Se muestra la estructura de los genes *PSY* de *B. napus* (*BnaX.PSY.a-f*), siendo los exones e intrones representados por cajas (E1-E6) y líneas respectivamente, dibujados a escala. En negro se muestran las secuencias reportadas en un estudio previo (Cárdenas et al., 2012) y en gris se muestran las secuencias que fueron completadas durante esta investigación. Como referencia se muestra la posición relativa de los seis genes *PSY* de *B. napus* en relación al gen *PSY* de *Arabidopsis* (*AtPSY*, At5g17230).

Tabla 1. Estructura de los genes *BnaA.PSY.d* y *BnaC.PSY.f*. Se muestra la longitud de exones (E), intrones (I), gDNA desde el codón de inicio al de término (gDNA).

	E1	I1	E2	I2	E3	I3	E4	I4	E5	I5	E6	gADN pb
<i>BnaA.PSY.d</i>	443	85	52	449	174	80	239	90	196	102	188	2073
<i>BnaC.PSY.f</i>	437	79	52	393	174	61	239	95	196	102	163	1991

Lo siguiente fue aislar los CDS de los genes *PSY* de *B. napus*. Mediante el uso de oligonucleótidos parcialmente conservados (*Bna.PSY.15F*, *Bna.PSY.8R*, Tabla S1) previamente descritos (Cárdenas et al., 2012), se aislaron los CDS de los genes *BnaC.PSY.a* (1275 pb) y *BnaA.PSY.b* (1272 pb) (Figura 3). Luego, mediante el uso de partidores específicos (Tabla S1) y la rápida amplificación de los extremos de cDNA (RACE) se aislaron

las regiones 5' UTR (288 pb – 142 pb) y 3' UTR (206 pb – 104 pb) de los genes *BnaX.PSY.a-e* (Figura 3). Considerando que las secuencias genómicas de los genes *PSY* de *B. napus* exhiben una alta conservación a nivel de exones, con un porcentaje de identidad entre un 88% a un 97%, esta nueva información nos permitió diseñar partidores específicos (Tabla S1) en estas regiones menos conservadas con el fin de aislar las secuencias CDS de los genes *BnaX.PSY.c-f*. El uso de estos partidores específicos permitió aislar los cuatro CDS restantes, lográndose el aislamiento de *BnaA.PSY.c* (1245 pb), *BnaA.PSY.d* (1257 pb), *BnaC.PSY.e* (1266 pb) y *BnaC.PSY.f* (1251) (Figura 3). Las secuencias codificantes (CDS) obtenidas fueron analizadas por BLAST (Altschul et al., 1997) contra las secuencias genómicas de los genes *PSY* de *B. napus* (GenBank BnaX.PSY.a-f: JF920037-JF920042) determinándose el aislamiento exitoso de las secuencias codificantes de los genes *BnaC.PSY.a-f*. Al comparar los CDS de los seis *PSY* con los CDS predichos de las secuencias genómicas de los genes *PSY* de *B. napus* obtenidas en estudio previo, los tamaños fueron consistentes (Cárdenas et al., 2012).

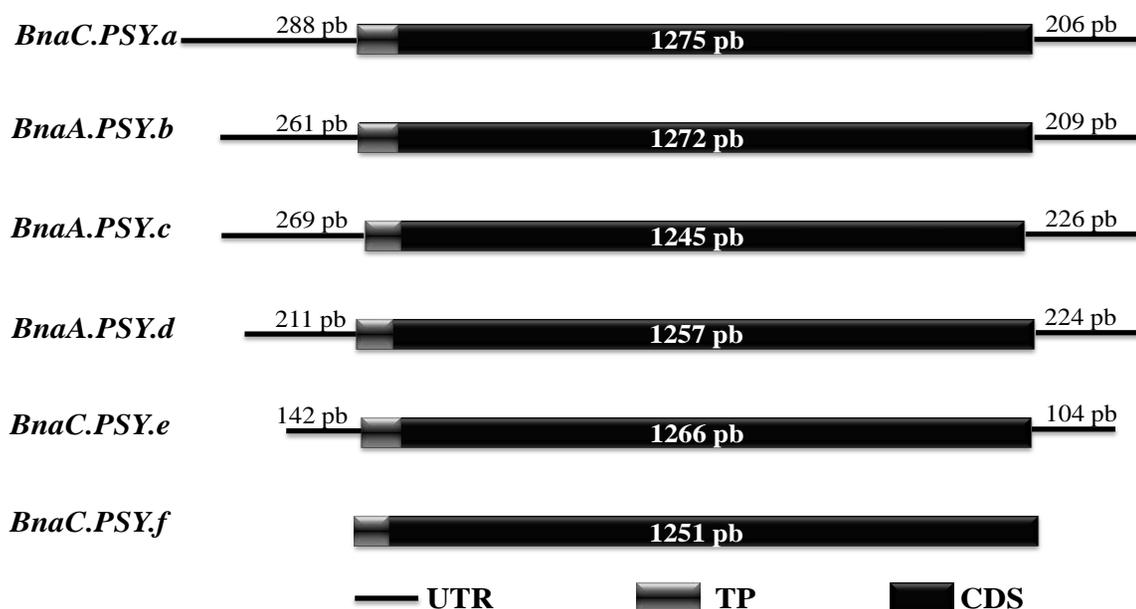


Figura 3. cDNA de los genes *PSY* de *B. napus* Se muestra el largo (pb) de las secuencias codificantes (CDS) en barras negras, en barras grises el péptido de transito (TP) y en líneas negras, las regiones no traducidas (UTR) de los homólogos *PSY*, obtenidas mediante la rápida amplificación de los extremos de cDNA (RACE), todos dibujados a escala.

Utilizando la secuencia completa de los CDS, se analizaron las secuencias nucleotídicas y se dedujeron las secuencias aminoacídicas (Figura suplementaria S1; Figura 2). Como se ilustra en la Figura 4, los genes *PSY* de *B. napus* codifican proteínas de largo similar (414-424 aa). Así el tamaño predicho de las proteínas BnaX.PSY.a-f conteniendo el péptido de tránsito es de 47,70 kD, 47,53 kD, 46,80 kD, 46,54 kD, 47,48 kD y 46,44 kD respectivamente (Tabla 2), siendo posiblemente procesadas a 6 proteínas maduras plastidiales de 39,48 kD, 39,43 kD, 39,38 kD, 39,49 kD, 39,42 kD y 39,55 kD, respectivamente (Tabla 2). Estos tamaños son similares a los observados en *PSY* de otras especies. Por ejemplo, *PSY3* de maíz, arroz y sorgo, tienen tamaños de 47.3 kD, 49.3 kD y 48.9 kD, mientras que el tamaño de sus proteínas maduras es de 41.9 kD, 43.5 kD, 42.7 kD respectivamente (Li et al., 2008; Welsch et al., 2008). Un tamaño menor es observado en las proteínas maduras *PSY1* (39.8 kD) y *PSY2* (39.4 kD) de maíz, respecto a la *PSY3*, debido a la secuencia conservada de 2-kD en la región N-terminal de esta última (Welsch et al., 2008).

El análisis de las secuencias aminoacídica deducida muestra que las seis *PSY* de *B. napus* contienen motivos característicos: un péptido de tránsito plastidial (65-75 aa), un dominio conservado trans-isoprenil difosfato (trans-IPP) y un sitio activo putativo fitoeno sintasa (DXXD) con 4 residuos conservados aspartato (Marchler-Bauer et al., 2011; Pandit et al., 2000) (Figura 4). Estos dominios conservados trans-IPP están presentes en la enzima fitoeno sintasa, que cataliza la condensación cabeza a cabeza (1'-1) de dos moléculas de GGPP para producir fitoeno (Shumskaya et al., 2012). La identidad entre las secuencias de las seis proteínas de los homólogos *PSY* varió desde un 86,47 a 99,05% (Tabla 2A), con la mayor variabilidad encontrada en la región N-terminal que codifica al péptido de tránsito a plastidio. Esto coincide con reportes previos (Busch et al., 2002; Gallagher et al., 2004; Welsch et al., 2008; Arango et al., 2010; Cárdenas et al., 2012). Cuando las proteínas *PSY* fueron evaluadas sin sus péptidos de tránsito, el porcentaje de identidad incrementó entre homólogos, variando desde 90,80 a 99,43% (Tabla 2B), en ambos casos la identidad más alta fue observada entre homeólogos. Debido al origen común de las seis *PSY* que se remontan al evento de triplicación del genoma de *Brassica* y la posterior especiación de los genomas parentales de *B. napus*, A (*B. rapa*) y C (*B. oleracea*), no sorprende la alta identidad observada entre las seis proteínas deducidas *PSY*. A la vez que las pequeñas diferencias observadas se pueden deber a

re-arreglos por sustituciones o deleciones ocurridos en los subgenomas de *B. napus* (O'Neill y Bancroft 2000; Town et al., 2006; Yang et al., 2006; Cárdenas et al., 2012).

Tabla 2. Porcentaje de identidad de las proteínas PSY de *B. napus*. Se muestra el largo de las secuencias aminoacídicas de las proteínas PSY de *B. napus* y el porcentaje de identidad entre ellas (A) Incluyendo el péptido de tránsito (c/TP) (B) Excluyendo el péptido de tránsito (s/TP). Se incluye la proteína PSY de *A. thaliana* como referencia. Identidad entre genes de la familia *PSY* (*).

A. Porcentaje de identidad secuencias aa c/PT

	Largo	BnaC.PSY.a	BnaA.PSY.b	BnaA.PSY.c	BnaA.PSY.d	BnaC.PSY.e	BnaC.PSY.f	At.PSY
BnaC.PSY.a	424	100	98,8*	89,4	87,4	90,4	87,3	89,2
BnaA.PSY.b	423		100	90,3	88,3	91,3	88,4	89,9
BnaA.PSY.c	414			100	86,7	93,6*	85,6	87,2
BnaA.PSY.d	418				100	86,9	95,9*	88,5
BnaC.PSY.e	421					100	86,4	87,1
BnaC.PSY.f	416						100	87,6
At.PSY	422							100

B. Porcentaje de identidad secuencias aa s/PT

	Largo	BnaC.PSY.a	BnaA.PSY.b	BnaA.PSY.c	BnaA.PSY.d	BnaC.PSY.e	BnaC.PSY.f	At.PSY
BnaC.PSY.a	349	100	99,4*	91,8	92,2	91,5	91,6	90,2
BnaA.PSY.b	349		100	92,4	92,7	92,1	92,2	90,7
BnaA.PSY.c	348			100	91,5	96*	91	88,8
BnaA.PSY.d	351				100	91	98,9*	89,5
BnaC.PSY.e	348					100	90,4	88,3
BnaC.PSY.f	351						100	88,9
At.PSY	366							100

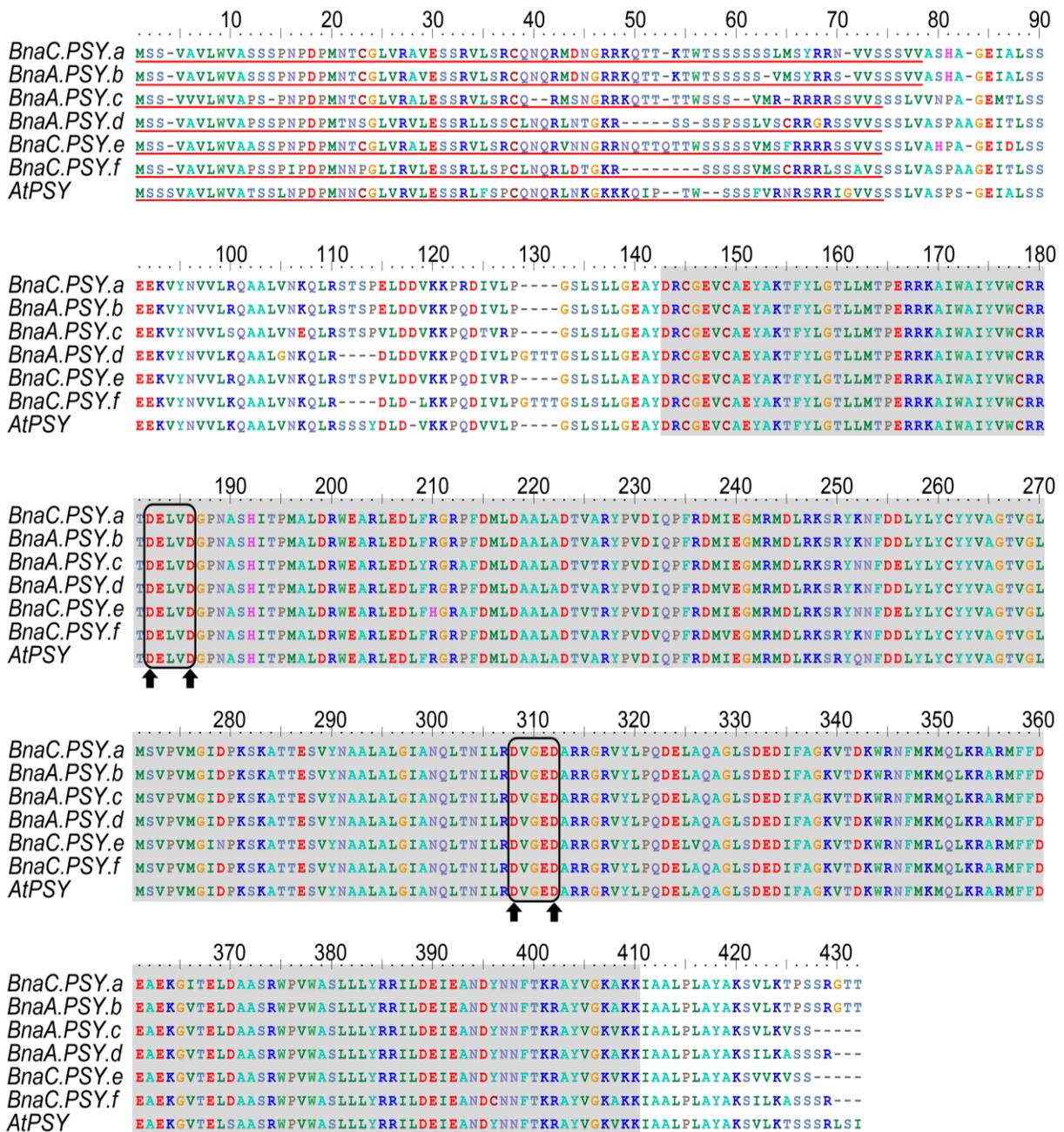


Figura 4. Alineamiento múltiple de las enzimas PSY de *B. napus*. Todas las enzimas PSY contienen un péptido de tránsito predicho de dirección a cloroplasto en la región N-terminal (subrayado en rojo), un dominio conservado trans-isoprenil difosfato (destacado en gris), un sitio activo putativo (DXXXD) (rectángulos negros) y cuatro residuos aspartato conservados (flechas negras).

La aislación de las secuencias codificantes de las seis PSY, nos permite además hacer un análisis preliminar respecto de su ubicación suborganelar. Esto debido a que se ha demostrado que los distintos miembros de familias de genes *PSY* pueden tener distinta ubicación suborganelar. Esta localización está directamente relacionada con su secuencia aminoacídica a la vez que es determinante para su actividad (Schledz et al., 1996; Shumskaya et al., 2013). Un ejemplo de esto es el caso de maíz, donde el cambio de un solo residuo en el gen *Zm-PSY1* (T₂₅₇ en lugar de P₂₅₇ en las otras PSY de maíz) permite la localización de la proteína en el estroma de protoplastos etiolados, y es la responsable de la acumulación de carotenoides en los amiloplastos del endosperma de maíz, mientras que *Zm-PSY2* y *Zm-PSY3* se ubican en los plastoglobulos (Shumskaya et al, 2012). Esto da cuenta que no sólo importa el tejido dónde se exprese el gen, sino también el lugar en que se encuentra la enzima en el plastidio, lo que estará relacionado con la función fisiológica que cumpla al interior de la planta (Shumskaya et al, 2012; Shumskaya et al, 2013). Las PSY de *B. napus* se expresan diferencialmente en tejidos ricos en cloroplastos, en tejidos ricos en cromoplastos o bien ambos, esto hace más interesante determinar su ubicación intraplastidial (Cárdenas et al, 2012). La comparación de las secuencias aminoacídicas de estos genes reportada en este trabajo, muestra que sus seis homólogos presentan una prolina (Pro) en vez de una treonina (Thr) en este residuo (Figura 5), al igual que las demás proteínas PSY de maíz, arroz y Arabidopsis (Figura 5). Sin embargo, futuras investigaciones pueden estar orientadas a considerar el uso de mutación sitio dirigida que permita cambiar este residuo con el fin de aumentar el conocimiento respecto a la localización plastidial (plastoglobulinas, estroma ó en las membranas tilacoidales) de la familia de genes *PSY* de *B. napus*, lo que también permitirá dirigir la selección de un gen *PSY* para su uso en ingeniería metabólica.

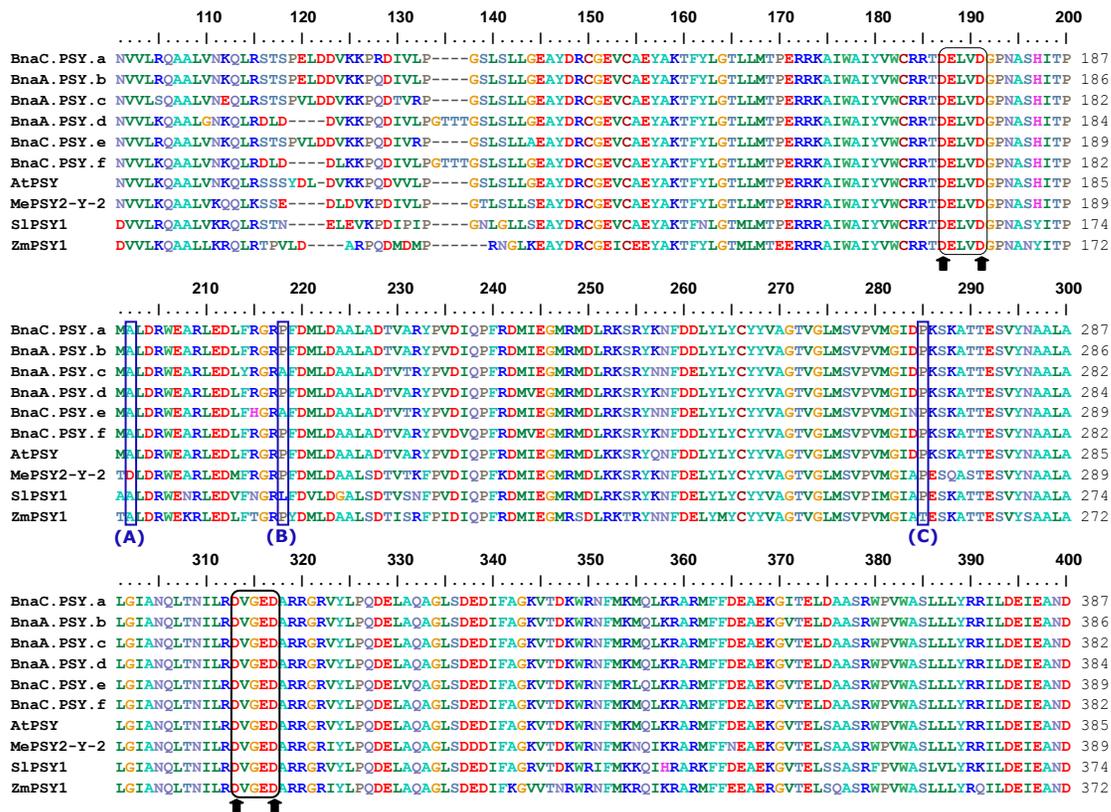


Figura 5. Análisis secuencias aminoacídicas. Se muestra un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las seis proteínas PSY de *B. napus*, AtPSY y tres proteínas de especies mono y dicotiledóneas en donde el cambio en un residuo (destacado en cajas azules numeradas) resulta en variación de actividad enzimática y/o cambio en la localización suborganelar: (A) El cambio en un nucleótido del alelo *PSY2-Y-2* (GU111723) de *Manihot esculenta* genera el cambio en un residuo (A₂₀₂ a D₂₀₂) que incrementa la acumulación de carotenoides en la raíz de cultivares amarillos (Welsch et al., 2010); (B) El cambio de un residuo (P₂₁₈ a L₂₁₈) en PSY1 de *Solanum lycopersicum* (ABU40772.1), afecta levemente la estructura secundaria resultando en una actividad enzimática diferencial y disminución de la acumulación de carotenoides en el fruto maduro (Gady et al., 2011); (C) El cambio en un residuo (P₂₈₅ a T₂₈₅) en Zm-PSY1 (P49085) de *Zea mays*, permite una localización intraplástidial diferencial en el estroma lo que se asocia a la acumulación de carotenoides en el endosperma en esta especie (Shumskaya et al., 2012). En el alineamiento, el rectángulo negro muestra el sitio activo putativo (DXXXD), mientras que las flechas negras muestran los cuatro residuos aspartato conservados característicos de las enzimas PSY.

Con el objetivo de evaluar la relación filogenética entre estas proteínas PSY de *B. napus* y PSYs de otras especies cuya funcionalidad ha sido establecida previamente (Gallagher et al., 2004; Li et al. 2008a; Li et al., 2008b; Welsch et al., 2008; Arango et al., 2010), un análisis filogenético fue conducido usando 13 PSYs de especies mono y dicotiledóneas. El árbol filogenético muestra que todas las proteínas PSY de *B. napus* se agrupan junto con la PSY de *Arabidopsis* (At5g17230) y que están más estrechamente relacionadas a las PSYs dicotiledóneas de *M. esculenta* (MePSY1 y MePSY2) que a las ampliamente caracterizadas PSYs monocotiledóneas (Figura 6). Como era de esperar, las PSYs monocotiledóneas forman distintos subgrupos que exhiben papeles diferentes *in planta*, como las PSYs relacionadas con estrés abiótico, que se agrupan juntas (OsPSY3, ZmPSY3, SbPSY3) (Li et al., 2008b; Welsch et al., 2008), mientras que ninguna de las PSYs de *B. napus* muestra una estrecha relación con estas PSYs relacionadas a estrés (Figura 6). Lo interesante es que las PSYs dicotiledóneas están relacionadas más bien a PSY1s de cereal que son preferentemente expresadas en semillas (Gallagher et al., 2004; Li et al., 2008a).

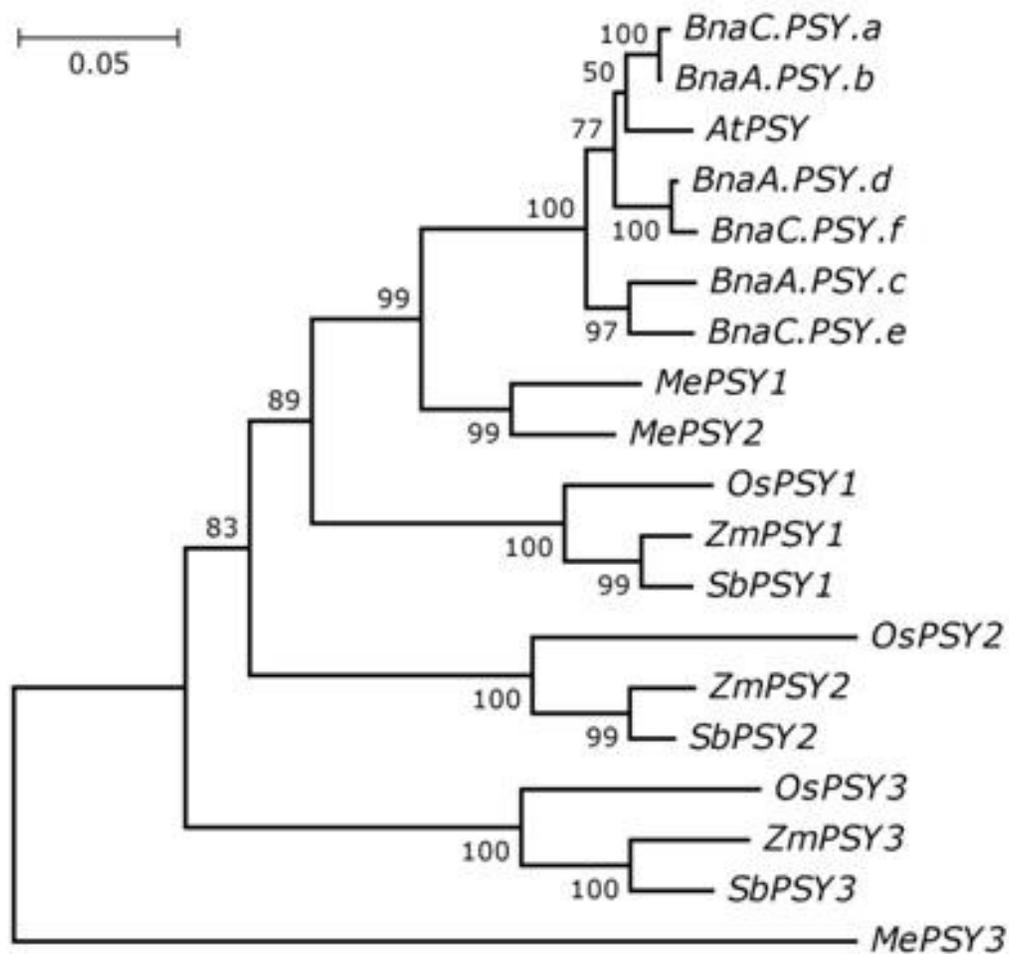
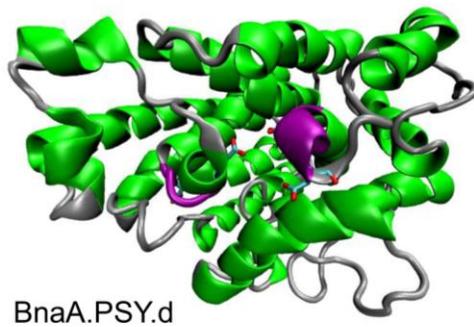
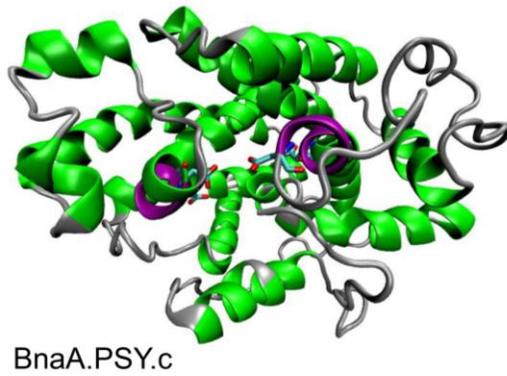
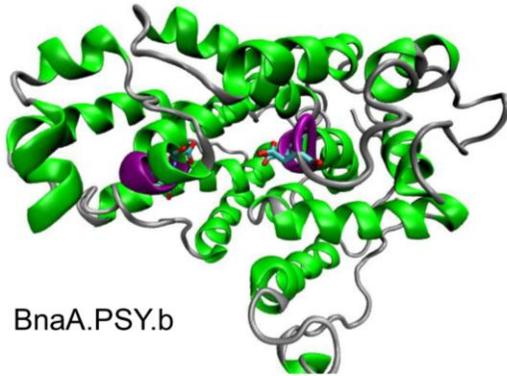


Figura 6. Relación filogenética de las enzimas PSY de *B. napus* y seleccionadas monocotiledóneas y dicotiledóneas. La relación filogenética fue inferida usando el método Neighbor-Joining usando el programa MEGA4 (Tamura et al, 2007). El porcentaje de replica del árbol en que los taxa asociados se agrupan en el test de replicación de arranque-500 es mostrado al lado de las ramas. El árbol es dibujado a escala, con el largo de las ramas en las mismas unidades (número de sustituciones de aminoácidos por sitio) estas distancias fueron usadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias fueron calculadas usando el método de corrección Poisson (Zuckerkanndl y Pauling, 1965).

3.2. Predicción de la estructura tridimensional de las enzimas de los genes *PSY* de *B. napus*

El modelamiento de proteínas predichas muestra que las seis proteínas PSY de *B. napus* son estructuras ricas en alfa- hélices (Figura 7). En efecto, estas alfa-hélices anti-paralelas forman una gran cavidad central donde se cataliza la condensación cabeza a cabeza (1'-1) de dos moléculas de GGPP para llevar a cabo la síntesis de fitoeno. Como un ejemplo, la estructura tridimensional de la enzima BnaC.PSY.a es mostrada en la Figura 8 A. Los dos dominios conservados ricos en aspartato, DELVD y DVGED se localizan en las dos alfa-hélices en paredes opuestas de la cavidad central (Figura 8B) (Pandit et al., 2000; Marchler-Bauer et al., 2011). Las diferencias en las secuencias aminoacídicas de las seis proteínas PSY de *B. napus* no altera o afecta la estructura de la región del sitio activo putativo (Figura 7). Debido a esto, como resultado preliminar, se puede predecir *a priori* que estas proteínas PSY son enzimas funcionales. Sin embargo las sutiles diferencias en sus secuencias aminoacídicas encontradas en esta región, pueden tener profundos efectos en la actividad de las enzimas como se ha visto en otras PSYs de plantas (Welsch et al., 2010; Shumskaya et al., 2012; Gady et al., 2011). Por lo que sólo la evaluación funcional de estas proteínas PSY pueden confirmar su capacidad para actuar como fitoeno sintasa.

Subgenoma-A



Subgenoma-C

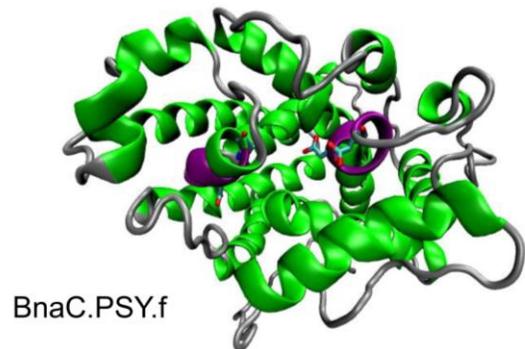
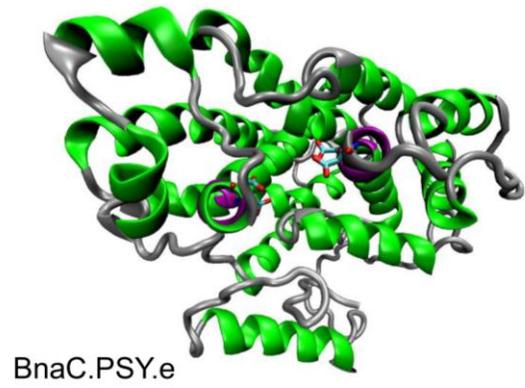
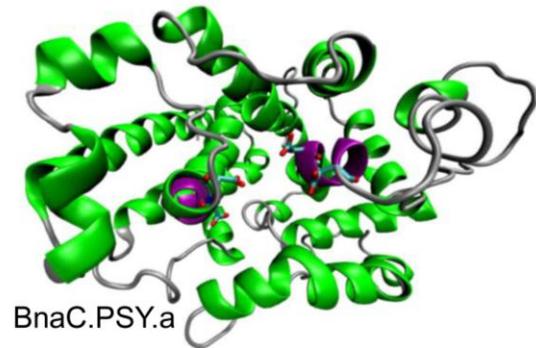
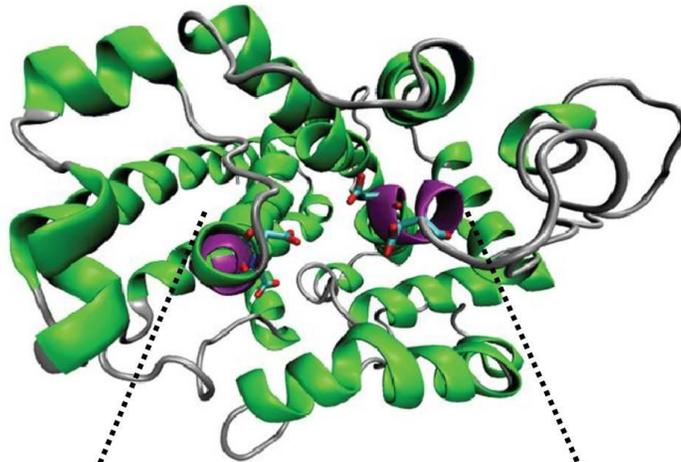


Figura 7. Predicción de la estructura tridimensional de los pares homeólogos *PSY* de *B. napus*. Alfa-hélices son mostradas en verde, el putativo sitio activo (DXXXD) en púrpura con los cuatro residuos aspartato conservados en representación licorice.

A



B

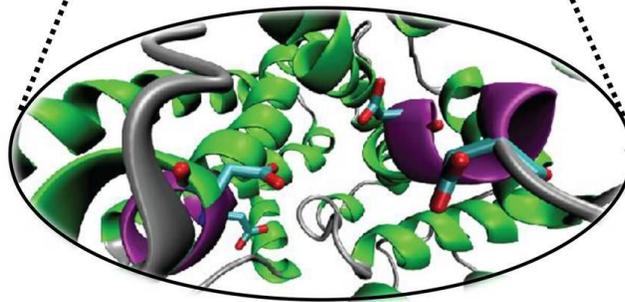


Figura 8. Predicción de la estructura tridimensional de PSY de *B. napus*. (A) La estructura modelada de la proteína BnaC.PSY.a, presenta una estructura rica en alfa-hélice. (B) Sitio activo putativo. Alfa-hélices son mostradas en verde, el putativo sitio activo putativo (DXXXD) en púrpura con los cuatro residuos conservados aspartato mostrados en representación licorice.

3.3. Caracterización funcional de los genes *PSY* de *B. napus*

La existencia de cepas de *E. coli* conteniendo diferentes combinaciones de genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides proporcionan un sistema extremadamente útil y práctico para evaluar la funcionalidad de las enzimas carotenogénicas *in vivo* (Misawa et al., 1990; Sandmann y Misawa 1992 Gallagher et al, 2003; Cunningham y Gantt, 2007; Niklitschek et al 2008). Como estos genes nucleares (*PSY*) no pueden ser procesados en *E. coli*, la transformación de los CDS, sin sus respectivos TP permitirá una mayor actividad enzimática en este sistema (Misawa et al., 1994; Schledz et al., 1996). Con este motivo, seis CDS *PSY* de

B. napus, sin sus correspondientes péptidos de tránsito de dirección a plastidio, fueron subclonados en el vector de expresión pETBlue1 (Novagen, USA), y transformados en *E. coli* conteniendo el vector pDS1B- Δ *crtB* (Figura 1A) para evaluar la actividad fitoeno sintasa *in vivo* (Niklitschek et al 2008). Las células de *E. coli* transformadas con el vector pDS1B sintetizan el producto final de la ruta, β -caroteno, en la presencia del gen *PSY* bacteriano *CrtB* (Figura 9A) pero no cuando la cepa que contiene el vector pDS1B- Δ *crtB* es cotransformada con el vector vacío pETBlue1 (Figura 9B). Estas células *E. coli*, DS1B y DS1B- Δ *crtB*, sirven como un control positivo y negativo respectivamente. Significativamente, las células de *E. coli* conteniendo el vector pDS1B- Δ *crtB* y cotransformada con cada uno de los seis genes *PSY* de *B. napus* son capaces de producir β -caroteno (Figura 9C-H). En todos los casos, el análisis de HPLC de los carotenoides extraídos desde los cultivos de células *E. coli* muestran un peak de β -caroteno, que coincide en el tiempo de retención y espectro que es observado para el control positivo (Figura 9A). Esto permitió confirmar que la extensa familia de genes *PSY* codifica enzimas funcionales (Figura 9). Lo que no resulta sorprendente, dado que nuestros datos indican la existencia de una alta similitud entre las secuencias de las proteínas de esta familia de genes *PSY*. Además, el nivel de relación de divergencia de remplazo de nucleótidos y sustituciones sinónimas (Ka/Ks) indica que todos los miembros son probablemente sometidos a selección purificadora con valores Ka/Ks inferiores a 0,28 para todas las parejas de genes evaluadas, que indica fuertemente que estas proteínas *PSY* se han desarrollado bajo restricciones funcionales (Tabla S2). El contenido de β -caroteno producido por los clones de *E. coli* transformados con cada gen *BnaX.PSY* fue variable ($p \leq 0,05$) (Figura 9I). Las células de *E. coli* conteniendo el vector pDS1B- Δ *crtB* y cotransformada con pETBlue1-*BnaA.PSY.d* presentaron una acumulación de β -caroteno significativamente mayor a las cotransformadas con los otros cinco vectores pETBlue1-*BnaX.PSY.x* como también mayor a la acumulación de β -caroteno producido por el control positivo (Figura 9I). Dada la actividad fitoeno sintasa *in vivo* mostrada en la complementación con el gen *BnaA.PSY.d*, resulta de interés considerar este gen para su evaluación y usos en ingeniería metabólica del contenido de carotenoides en *B. napus* u otros cultivos.

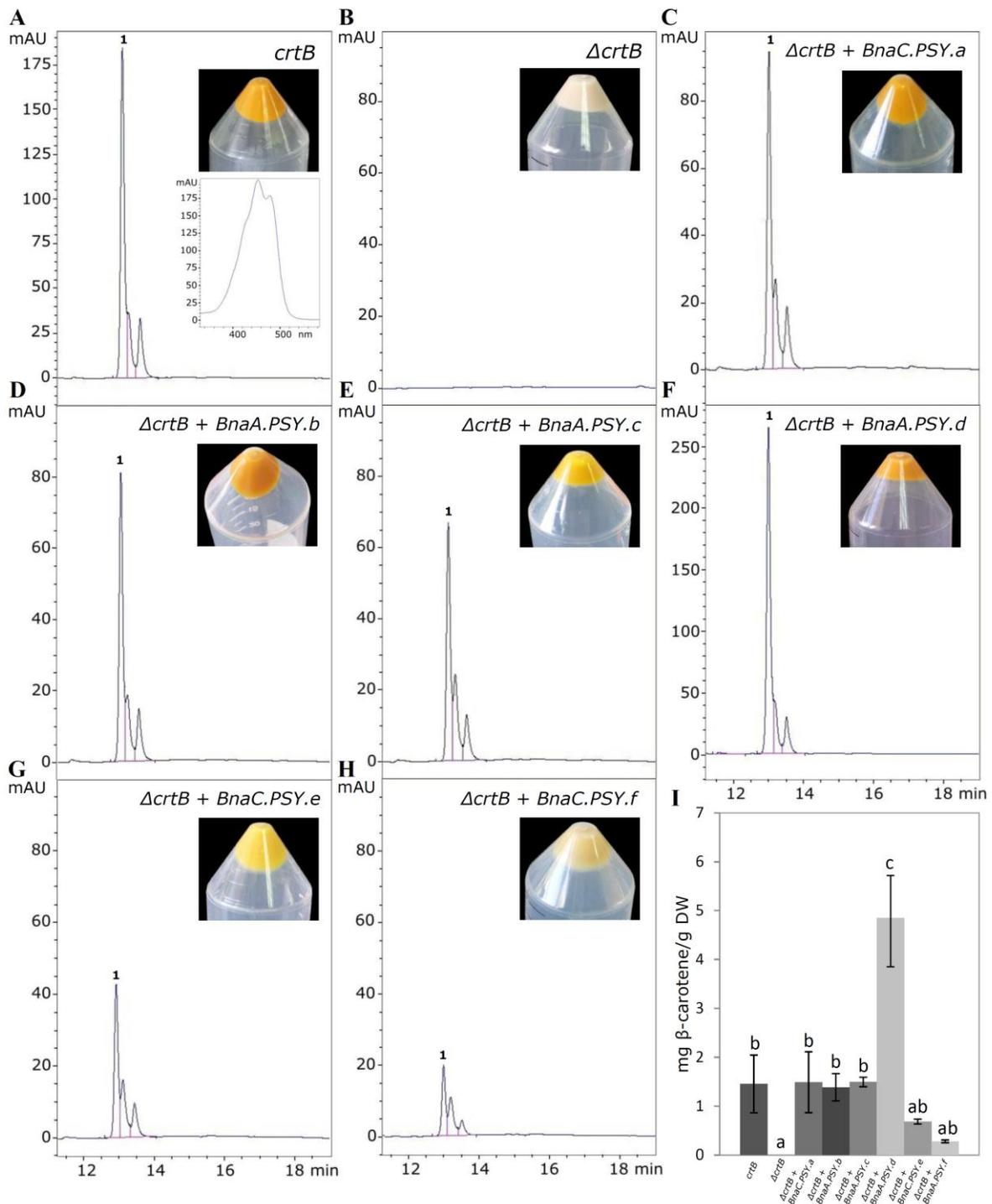


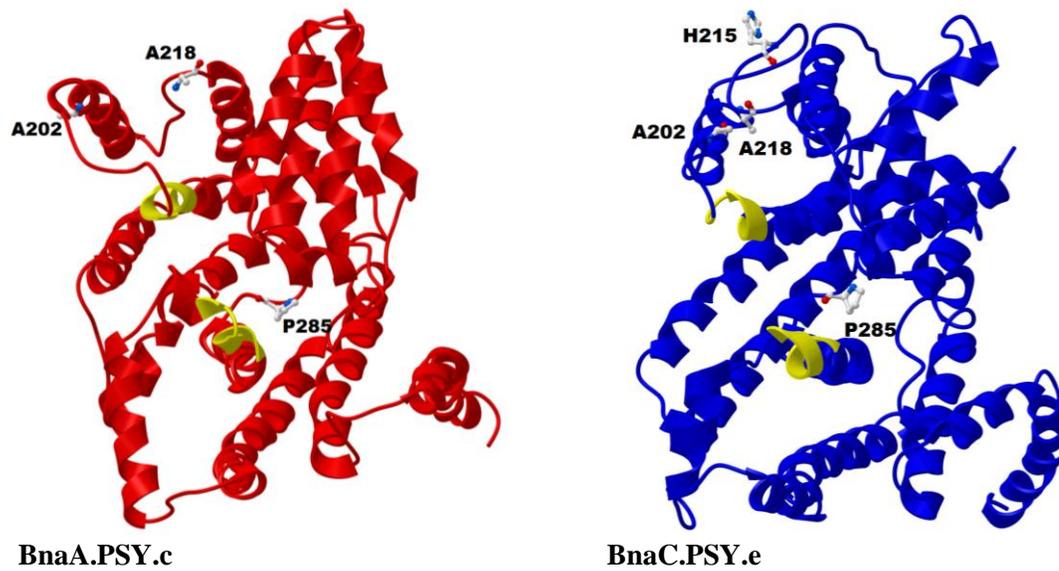
Figura 9. Complementación heteróloga de BnaX.PSY en *E. coli* (A) pDS1B (C+) (B) pDS1B- $\Delta crtB$ + pETBlue1 (vector vacío) (C-); (C-F) pDS1B- $\Delta crtB$ + de izquierda a derecha pETBlue1-BnaC.PSY, pETBlue1-BnaA.PSY.b, pETBlue1-BnaA.PSY.c, pETBlue1-BnaA.PSY.d, pETBlue1-BnaC.PSY.e, pETBlue1-BnaC.PSY.f. Cromatogramas (HPLC)

obtenidos a 450 nm para cada transformación. El fino espectro para β -caroteno (peak 1) es mostrado como un ejemplo en el panel A (I) El contenido de β -caroteno (mg) producido por cada ensayo de complementación es expresado por gramo de peso seco. Las barras representan la desviación estándar calculada desde tres réplicas (n=3).

Se ha demostrado que el cambio en un único residuo en una PSY puede afectar su actividad enzimática por medio de afectar su estructura secundaria. Sobre esto, Gady et al. (2011) observaron que la mutación de un nucleótido en el gen *PSY1* de *Solanum lycopersicum* (Figura 5.2), responsable de la acumulación de carotenoides durante la maduración del fruto de tomate, resulta en el cambio de P₂₁₈ a L₂₁₈ en la proteína codificada por este gen. Este único cambio conduce a una disminución de la acumulación de carotenoides en el fruto maduro un 50% respecto al control (Gady et al., 2011). Esto es indicativo de que este aminoácido es clave en la actividad de esta enzima PSY. Es así como en otras especies, entre ellas: *Manihot esculenta*, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Daucus carota*, y *Ricinus communis*, todos los homólogos *PSY* descritos para estas especies (dato no mostrado), presentan en las proteínas que codifican, este residuo (P₂₁₈). Tal como se observa en estos cultivos, en *B. napus* la mayoría de sus proteínas PSY presentan una P₂₁₈, sin embargo el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los genes *BnaX.PSY* da cuenta de otro residuo, A₂₁₈, en las proteínas de los genes homeólogos *BnaA.PSY.c* y *BnaC.PSY.e* (Figura 5.2). Esto hace hipotetizar que la diferencia en este residuo puede estar afectando la actividad de estas enzimas. En primera instancia, el análisis de la funcionalidad de los 6 genes *BnaX.PSY* por medio de un sistema de complementación heteróloga mostró diferencias en la acumulación de carotenoides en el pellet bacteriano en las complementación independiente de cada gen *BnaX.PSY* (DS1B- $\Delta crtB$, pETBlue1-*BnaX.PSYa-f*). Al respecto se observaron diferencias significativas entre la pareja de homeólogos *BnaA.PSY.c* y *BnaC.PSY.e*, siendo menor la producción de β -caroteno en este último (Figura 9I). Al mirar la cercanías del residuo A₂₁₈, se puede observar que otro residuo altamente conservado R₂₁₅, es distinto en *PSY1* de *S. lycopersicum* (N₂₁₅) y *BnaC.PSY.e* (H₂₁₅), pero no en *BnaA.PSY.c* (Figura 5.2) (Gady et al., 2011). La figura 10A, muestra la estructura tridimensional de ambas proteínas destacando los

residuos 215 y 218. Este análisis *in silico* muestra que en BnaA.PSY.c el residuo A₂₁₈, se encuentra más lejano al sitio activo, a la vez que en BnaC.PSY.e A₂₁₈ se encuentra más cercano al sitio activo (Figura 10A). Sin embargo en BnaC.PSY.e la diferencia en estos dos residuos, resulta además en un cambio a nivel de estructura secundaria y la formación de un loop externo (Figura 10A), observándose claramente esta diferencia en el modelo con ambas proteínas superpuestas (Figura 10B). Unido a esto, la predicción de la interacción proteína-proteína mostró que mientras en BnaA.PSY.c esta se da en el extremo carboxilo (últimos 18 residuos), en BnaC.PSY.e es en las cercanías a los residuos en cuestión (residuos 161-167, 180-184, 302-314, 381-384) (Qin y Zhou, 2007). A partir de esto podemos pensar que las diferencias encontradas a nivel de estructura secundaria podría estar explicando la diferencia observada en la producción de β -caroteno de estas dos enzimas, por medio de afectar la interacción con otros miembros del complejo enzimático (Cunningham y Gantt, 1998; Cunningham, 2002). Cualquiera de estas ideas, sin embargo, debe ser sometida a una nueva investigación. El uso de mutagénesis sitio dirigida y la evaluación de los CDS mutados en el mismo sistema de complementación heterólogo en *E. coli*, podría permitir dilucidar esta cuestión. Por otra parte, el análisis de las secuencias aminoacídicas de las PSY de *B. napus*, deja en evidencia otros residuos altamente conservados (G₁₃₄, I₂₄₄, A₃₃₁, C₄₀₁), pero que en algún homólogo es diferente y que hasta ahora no han sido descritos por otros grupos de investigación. Estas pequeñas diferencias a nivel de residuos aminoacídicos, podrían explicar los distintos niveles de acumulación de β -caroteno observadas en la complementación independiente de las seis PSY (Figura 9I). Esto también sería interesante de abordar en una futura investigación.

A



B

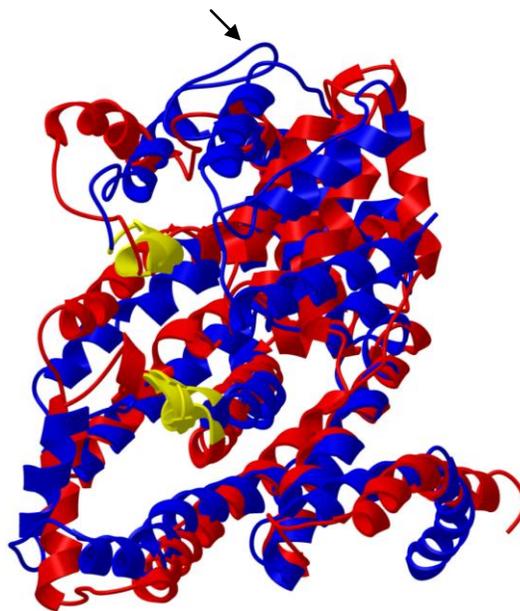


Figura 10. Predicción de la estructura tridimensional de PSY de *B. napus*. (A) Estructura modelada de la proteína BnaA.PSY.c y BnaC.PSY.e, mostrando los residuos 202, 215, 218 y 285, descritos en detalle en la figura 5 (B) Modelo de las proteínas BnaA.PSY.c y BnaC.PSY.e superpuestas. Destacado con una flecha el *loop* externo en BnaC.PSY.e, putativo sitio activo (DXXXD) en amarillo.

3.4. La familia de genes *PSY* provee un pool de genes funcionales para su uso en ingeniería metabólica del contenido de carotenoides

Los resultados de la complementación heteróloga demuestran que todos los miembros de la familia de genes *PSY* de *B. napus* codifican enzimas funcionales, haciendo de éstos blanco para su uso en ingeniería metabólica. Al respecto podríamos asociar este conocimiento a previos reportes que han demostrado que el cambio en un residuo puede modificar la eficiencia catalítica de una *PSY* (Welsch et al., 2010). Sobre esto, Welsch et al. (2010) demostró que en *Manihot esculenta*, la variación natural en un nucleótido en el gen *Me-PSY2* provoca un cambio en un residuo (D₂₀₂ en lugar de A₂₀₂) produciendo la acumulación de carotenoides 20 veces mayor en los cultivares con raíz amarilla. Lo interesante es que el cambio de este único residuo (D₂₀₂ en lugar de A₂₀₂) en las secuencias *PSY* de *N. pseudonarcissus* (Np-*PSY*), *A. thaliana* (At-*PSY*) y *Z. mays* (Zm-*PSY1*), incrementó los niveles de licopeno *in vitro* 2 veces, ~ 60% y ~ 20% respectivamente (Welsch et al., 2010). Considerando la alta identidad entre las secuencias aminoacídicas de la enzima At-*PSY* madura respecto a las BnaX.*PSY*.x de al menos un 92% sin el péptido de tránsito y que en la región de interés es de un 100% (Figura 5.1), se puede pensar que una mutación que produzca un cambio en este residuo puede ser significativa en estas proteínas. Como ya se ha descrito, los seis homólogos *PSY* de *B. napus*, se expresan en tejidos ricos en distintos tipos de plastidios (Cárdenas et al., 2012). En esta misma línea, para aumentar la síntesis y acumulación de carotenoides en semillas, se podría mutar las secuencias de los *PSY* que presentan una alta expresión en ese tejido (Cárdenas et al., 2012). Esto considerando que se ha demostrado que el uso de genes que codifican una proteína que presenta una localización intraplastidial preferente en un tipo específico de plastidio puede tener mejores resultados (Shumskaya et al., 2012). Es así como expresar uno de estos genes cuya mutación genere un cambio en el residuo A₂₀₂ a D₂₀₂ con dirección a semilla, podría producir una alta acumulación de carotenoides en elaioplastos, organelos que tienen una alta capacidad almacenamiento de carotenoides incluso a un mayor grado que los amiloplastos (Shewmaker et al., 1999; Howitt y Pogson, 2006; Cazzonelli y Pogson, 2010).

3.5. Análisis de la abundancia relativa de los transcritos *PSY* durante el desarrollo de la semilla

Usando partidores homólogo-específicos, se evaluó por RT-PCR la abundancia relativa de transcritos para cada gen *PSY* de *B. napus* en cuatro etapas diferentes del desarrollo de semillas (Figura 11). Como resultado se pudo determinar que los homólogos *PSY* de *B. napus* son expresados durante el desarrollo de semilla. Los seis miembros de la familia se expresan principalmente en semillas a los 20 y 30 dpa, aunque a diferentes niveles (Figura 11). Es interesante que estudios previos determinaran que la etapa crítica en el desarrollo de semilla de *B. napus* en lo que respecta a proliferación celular, deposición de semillas y acumulación de carotenoides, comienza alrededor de los 20 dpa (O'Hara et al., 2002; Dong et al., 2004; Niu et al., 2009). Por otra parte los pares de homeólogos, *BnaC.PSY.a/BnaA.PSY.b* y *BnaA.PSY.d/BnaA.PSY.f* se expresan a los 20, 30, 45 y 60 dpa (Figura 11). *BnaC.PSY.e* que es un gen *PSY* de *B. napus* expresado preferentemente en pétalos (Cárdenas et al., 2012), es el menos expresado durante el desarrollo de semillas mientras que *BnaA.PSY.d* que es un gen expresado en tejidos ricos en cloroplastos como hojas, es el más expresado durante el desarrollo de semillas (Figura 11). Este estudio abre la puerta a nuevas interrogantes, por ejemplo, analizar el papel de *BnaA.PSY.d* en la síntesis de carotenoides en semilla, dado que presenta un perfil similar al descrito para el gen *ZmPSY1* de maíz (Li et al., 2008b; Gallagher et al., 2004; Li et al., 2008b). De esta manera, *BnaA.PSY.d* podría tener funciones diferenciales en la síntesis de carotenoides como se ha descrito para otras especies (Li et al., 2008; Welsch et al., 2008; Chaudhary y Khurana, 2010; Howitt et al., 2009; Li et al., 2008). Dada la alta actividad fitoenosintasa del gen *BnaA.PSY.d* mostrada *in vivo* sumado al hecho que es el que muestra mayor abundancia en saturación en la RT-PCR convencional durante el desarrollo de semillas, hace en de este un gen interesante a considerar para su uso futuro en ingeniería metabólica en el contenido de carotenoides en dirección a semillas. La especificidad de los partidores fue controlada mediante pruebas de pares de partidores contra los plásmidos que contienen cada uno de los seis genes *PSY* de *B. napus* y corriendo los productos de RT-PCR en geles de SSCP (Figura S2).

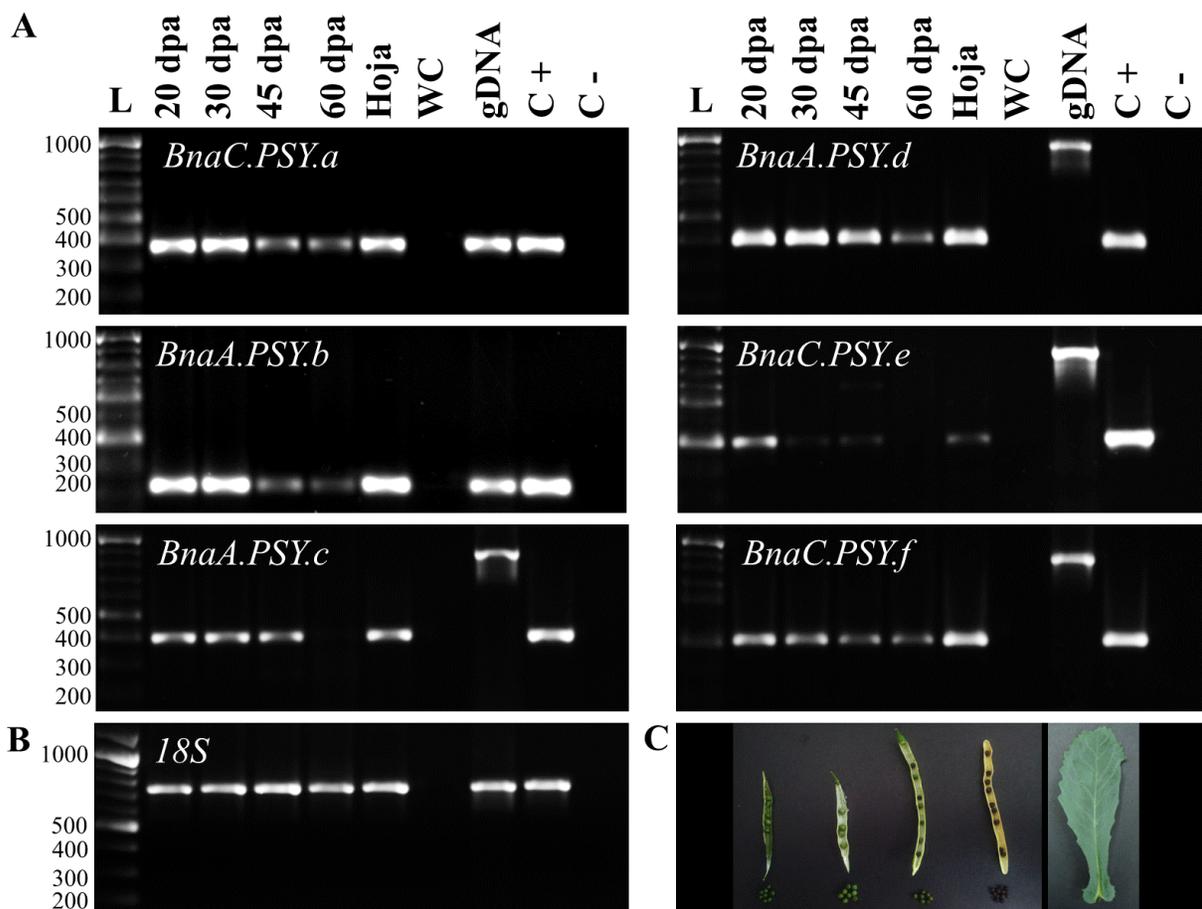


Figura 11. Abundancia relativa de transcritos *PSY* de *B. napus* durante el desarrollo de semillas. (A) La abundancia relativa de transcritos para los genes *BnaX.PSY.x* fue determinada usando partidores-específicos a cada homólogo (B) Abundancia relativa del gen *18S* de *B. napus* (control de carga) (C) Estados de desarrollo de semillas de *B. napus* (desde izquierda a derecha: 20, 30, 45 y 60 días post antesis y tejido de hoja. L: ladder; WC: control de agua; gDNA: control gDNA de *B. napus*; C+: control plásmido control (positivo) homólogo-específico *PSY*; C-: control plásmido (negativo) homeólogo *PSY*. RT-PCR (40 ciclos) fue realizado en dos réplicas biológicas, sólo se muestra una para simplificar.

4. CONCLUSIONES

Actualmente es bien conocido que los miembros de familias de genes *PSY* pueden tener distinta localización suborganelar y eficiencia catalítica, estas características les permiten cumplir funciones específicas en las distintas etapas de desarrollo de la planta. Un punto clave al respecto es primero determinar que los miembros de una familia de genes son funcionales. En este estudio se aislaron las secuencias CDS de los seis miembros de la familia de genes *PSY* de *B. napus*. El análisis de estas secuencias determinó que las seis *PSY* poseen motivos característicos presentes en las enzimas fitoeno sintasa (TP, dominio trans-IPP, sitio activo DXXD). Además el modelo deducido de las proteínas mostró que todas son estructuras ricas en alfa-hélices y que poseen el característico sitio activo rico en aspartato (DELVD y DVGED) localizado en las paredes opuestas de dos alfa-hélices. Esto nos permitió hipotetizar en primera instancia que los seis miembros de esta familia son funcionales. Una segunda etapa orientada a evaluar su funcionalidad *en vivo* por medio de un test de complementación heteróloga en *E. coli*, mostró que los seis genes *BnaX.PSY* son capaces de complementar un gen defectuoso $\Delta crtB$ (*PSY* bacteriana) al producir β -caroteno. Estos resultados demuestran que los seis miembros de la familia de genes *PSY* de *B. napus* son funcionales. Además, las diferencias observadas en la producción de β -caroteno pueden estar asociadas a cambios aminoacídicos presentes entre los seis genes *BnaX.PSY.x*, cambios que podrían modificar su actividad fitoeno sintasa o bien la interacción con otros miembros del complejo enzimático. Este trabajo es un paso inicial en el análisis de pequeños cambios a nivel de secuencia y su relación con la inducción de la carotenogénesis. Finalmente mediante el análisis de la expresión de genes *PSY* durante el desarrollo de semilla podemos tener un patrón más claro de los genes *PSY* de *B. napus* que se expresan más fuertemente en semilla en los distintas etapas de desarrollo, así como *BnaX.PSY.c-d*. Esto y lo anterior será clave en el uso de los genes *PSY* de *B. napus* en ingeniería metabólica del contenido de carotenoides en cultivos oleaginosos.

CAPITULO II

Ingeniería metabólica del contenido de carotenoides en *Brassica napus* L. a través de la sobreexpresión semilla-específica de un gen *PSY* endógeno

1. INTRODUCCIÓN

Junto con soya y palma, raps CanOLA es uno de los cultivos más importantes de la producción de aceite en el mundo. Esto en gran parte debido a la composición nutricional de alta calidad de su aceite (Stringam et al., 2003; Hu et al., 2013). La estabilidad que proporcionan los carotenoides como antioxidantes ante el deterioro y el envejecimiento de la semilla oleaginosa de CanOLA (Pinzino *et al.*, 1999; Howitt y Pogson, 2006), sumado a la posibilidad de suplir las necesidades diarias de vitamina A en humanos mediante el consumo de aceites ricos en carotenoides (aceite dorado) (Shewmaker et al., 1999), resulta en la necesidad de incrementar los esfuerzos por aumentar los niveles de estos pigmentos en semilla de CanOLA. El paso inicial de la síntesis de carotenoides es realizado por la enzima fitoeno sintasa (PSY), sin embargo, se ha demostrado que la actividad de PSY es un factor limitante para la biosíntesis de carotenoides en tejido no fotosintético (Maass et al., 2009). En *B. napus*, esta limitación fue demostrada a través de un trabajo donde la sobreexpresión de un gen fitoeno sintasa de origen bacterial (CrtB) en semilla resultó en embriones visiblemente naranjos y en un incremento de 50 veces en los niveles de β -caroteno en semilla (Shewmaker et al., 1999). Se estima que la expresión de genes *PSY* de mayor cercanía filogenética puede resultar en una mejor interacción con los demás miembros del complejo enzimático que participan en las primeras reacciones de la ruta de síntesis de carotenoides, favoreciendo así una mayor síntesis de carotenoides, como lo observado en granos de arroz transgénicos (Cunningham y Gantt, 1998; Cunningham et al., 2002; Paine et al., 2005). Es por esto que la aislación y evaluación funcional de la familia de genes *PSY* de *B. napus* proporcionó un pool de genes *PSY* funcionales idóneos para su uso en ingeniería metabólica del contenido de carotenoides en *B. napus* y otros cultivos oleaginosos. Así, la selección de uno de los genes *BnaX.PSY* con el fin de sobreexpresarlo en *B. napus* podría generar altos niveles de producción de carotenoides. Además de la selección del transgen otro punto a considerar es la del promotor. La expresión de genes de la ruta de síntesis de carotenoides utilizando promotores tejido específico a sido exitoso en diversas especies como es el caso de *Oryza sativa*, *Lycopersicon esculentum*, *Solanum tuberosum*, *Zea mays*, *B. napus* (Ye et al., 2000; Paine et al., 2005; Fraser et al., 2002; Diretto et al., 2007; Naqvi et al., 2009; Shewmaker et al., 1999). Estos resultados hacen evidente que la expresión de genes de la biosíntesis de

carotenoides utilizando promotores con dirección a semilla puede resultar en mayores niveles de acumulación de carotenoides en este tejido.

Considerando que se ha demostrado que la actividad fitoenol sintasa es limitante en la síntesis de carotenoides en *B. napus* y que hasta ahora no se han conducido estudios donde se sobreexpresen alguno de los genes *PSY* endógenos, los objetivos de este estudio fueron: Obtener plantas transgénicas de *B. napus* L. que sobreexpresen en semillas un gen *PSY* endógeno funcional seleccionado por su expresión tanto en tejidos ricos en cloroplastos como cromoplastos, y determinar el contenido de carotenoides en semillas de las líneas transgénicas obtenidas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Construcción del vector binario pCambia2300-Lec::*BnaC.PSYa-6XHis*

La secuencia codificante del gen *BnaC.PSY.a* (GenBank: KF297333) conteniendo el péptido de tránsito fue amplificada con el uso de partidores específicos (*BnaC.PSY.a*.NotIF y *BnaC.PSY.a*-NotI-6xHisTagR) (Tabla S1) a partir de ADN plasmídico conteniendo el CDS del gen *BnaC.PSY.a* aislado de semilla (sección 2.5 Materiales y Métodos, Capítulo I). Ambos partidores contienen la secuencia de corte de la enzima de restricción *NotI*. El partidor *BnaC.PSY.a*-NotI-6xHisTagR contiene además un 6XHis-tag (Tabla S1). Este TAG fue incorporado a fin de discriminar entre los cDNA y proteínas codificadas por el transgen y sus contrapartes endógenas. El fragmento amplificado fue subclonado en el vector Topo TA (Invitrogen, CA, USA), digerido con la enzima antes descrita e insertado en el vector pUCAPS4, que contiene el promotor y terminador del gen *lectina (Le1)* de *Glycine max* (GenBank: EU070414) (Vodkin et al., 1983) (Figura 1A). El vector generado fue cortado con las enzimas *SalI* y *BamHI* (New England BioLabs, MA, USA) e insertado en el vector pCambia2300 previamente digerido con estas enzimas (Figura 1B). De esta manera, la secuencia codificante del gen *BnaC.PSY.a* quedó bajo el control del promotor y terminador del gen *lectina* de soya (Figura 1B). El vector generado fue transferido a *A. tumefaciens* cepas LBA4404 y GV3101 por electroporación usando el equipo ECM600 (BTX, MA, USA) para la posterior transformación de *B. napus* cv. Westar.

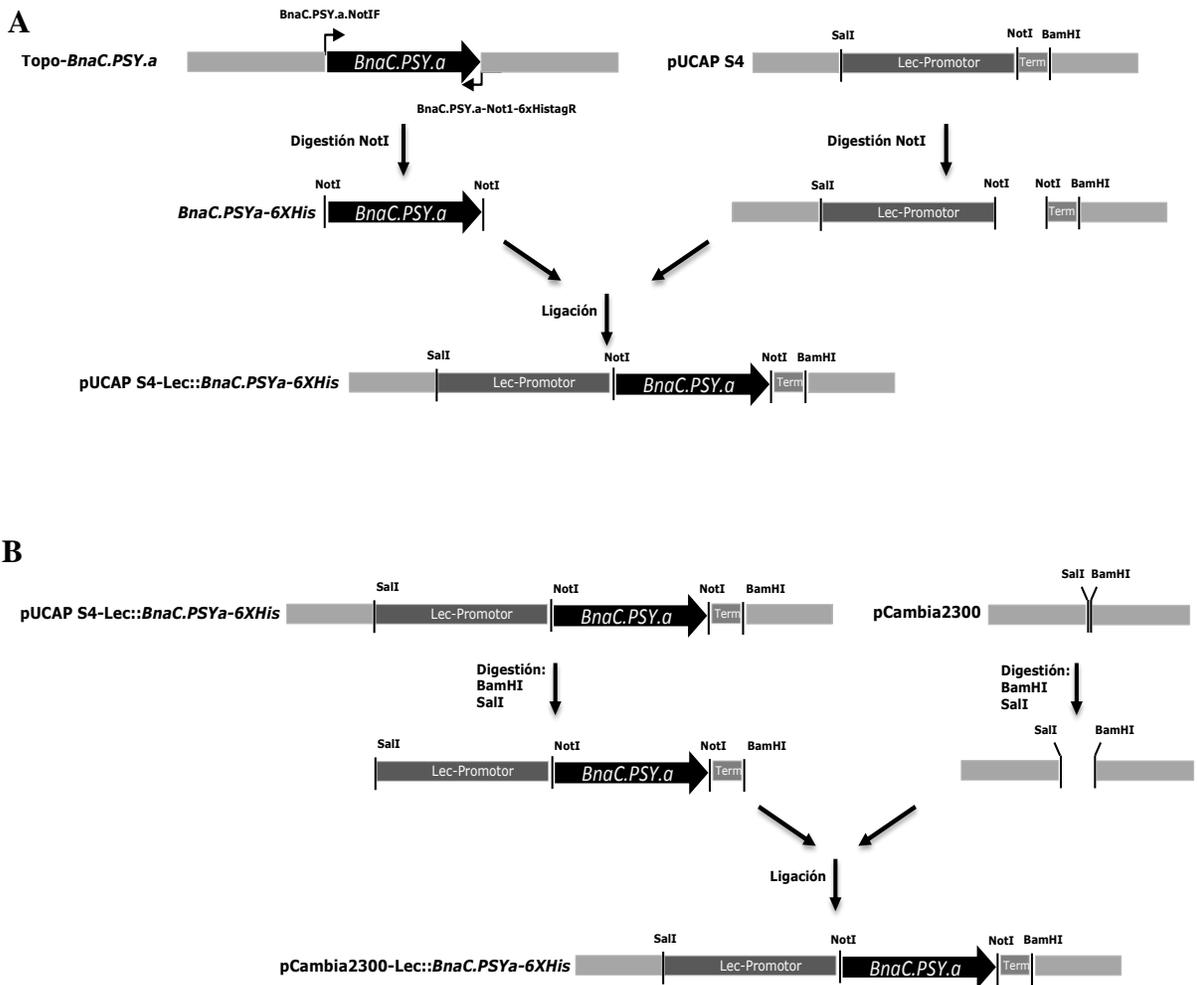


Figura 1. Estrategia generación vector pCambia2300-Lec::*BnaC.PSY.a*-6XHis. (A) Descripción de las etapas de la generación del vector intermediario pUCAPS4-Lec::*BnaC.PSY.a*-6xHis. (B) Etapas generación del vector pCambia2300-Lec::*BnaC.PSY.a*-6XHis a partir del vector pUCAPS4-Lec::*BnaC.PSY.a*-6xHis y el vector pCambia 2300.

2.2. Transformación de *B. napus*

La transformación se realizó de acuerdo al protocolo descrito para especies *Brassica* spp. (Lee, 1996) con pequeñas modificaciones. Brevemente, *A. tumefaciens* cepa LBA4404 o GV3101 conteniendo el vector pCambia2300-Lec::*BnaC.PSY.a*-6XHis fue crecido en 10 ml de medio Luria-Bertani (LB) suplementado con antibióticos apropiados para cada cepa (LBA4404:

kanamicina 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$, rifampicina 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$, estreptomocina 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$; GV3101: rifampicina 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$, kanamicina 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Hellens et al., 2010) hasta alcanzar una OD_{600} entre 1 a 1,8. Para la co-cultivación, *A. tumefaciens* fue reconstituido en medio base bacteriano (BBM: MSMS 4.4 g, sucrosa 20 g, 2,4-D (1 mg/L) 2 ml, MES 0,5 g/L, pH 5.6 acetosiringona 0,04 g/L, DMSO 10 ml/L). La transformación de *B. napus* cv Westar se inició con la germinación de semillas por cinco días (16-h-día/8-noche) a 22°C a fin de obtener cotiledones con un hipocotilo de 3 mm. Los cotiledones fueron cortados e incubados con *Agrobacterium* por 5 días a 15°C. Los cotiledones inoculados fueron pasados a placas conteniendo medio de regeneración (RM: MSMO 4,4 g/L, sucrosa 30 g/L, BAP 4,5mg/L, fitagel 4 g/L, carbenicilina 50 mg/L y kanamicina 25 mg/L, pH 5.8) apropiado para la selección e inducción de callos. Las placas conteniendo los cotiledones fueron mantenidos en una sala de crecimiento bajo condiciones controladas a 22°C, en ciclos de 16-h-día/8-h-noche, con una intensidad lumínica de 20 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ por los primeros 14 días. Luego de este período los cotiledones fueron traspasados cada 14 días a placas con medio RM (dos veces) y mantenidos bajo una intensidad de luz de 60-100 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Los cotiledones fueron traspasados luego a medio inductor de tallos (SEM: MSMO 4,4 g, sucrosa 30 g, BAP 0,5 mg/L, pH 5.8, fitagel 4 g, carbenicilina 50 mg/L y kanamicina 25 mg/L) por 14 días. Las plantas regeneradas fueron traspasadas a un medio inductor de raíz (RM: MSMS 4,4 g, sucrosa 30 g, NAA 100 $\mu\text{g/L}$, fitagel 4 g, carbenicilina 50 mg/L y kanamicina 25 mg/L, pH 5.8) cada 14 días hasta que enraizaran. Las plantas seleccionadas y regeneradas fueron finalmente traspasadas a invernadero bajo condiciones controladas en ciclos de 16-h-día/8-h-noche. Mediante el uso de partidores específicos (Tabla S1), las plantas regeneradas fueron evaluadas por PCR para determinar la presencia del transgen que confiere resistencia a kanamicina (*NPTII*) (KanF1, KanR2) y del gen *BnaC.PSYa-6XHis* (Bna.PSY.aF, BnaC.PSY.a6xHistaqR). Los eventos (T_0) que presentaron el transgen que confiere resistencia a kanamicina (*NPTII*) y *BnaC.PSYa-6XHis* fueron autopolinizados para la obtención de la progenie T_1 (Figura 2). Al menos diez plantas T_1 provenientes de cada planta T_0 , fueron crecidas y autopolinizadas para la obtención de semilla T_2 (Figura 2). De cada evento T_2 se seleccionaron tres plantas (tres réplicas biológicas (n=3)) a partir de las cuales se tomaron muestras de tejidos que fueron utilizados para el análisis de los eventos transgénicos por RT-

PCR cuantitativo en tiempo real, SDS-PAGE y en cuanto al contenido y composición de carotenoides en semillas (Figura 2).

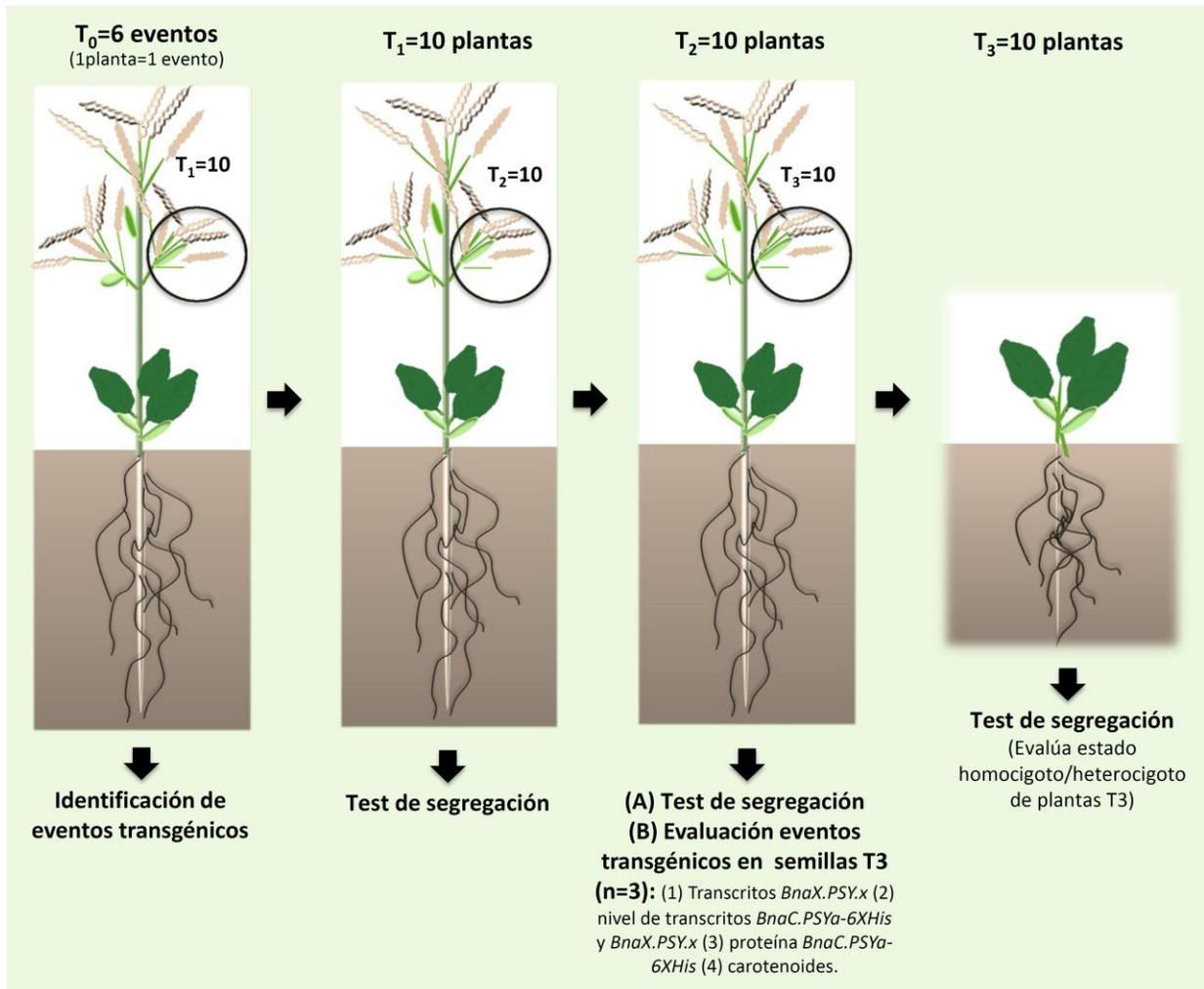


Figura 2. Estrategia identificación y evaluación de líneas transgénicas. Se muestra la estrategia de identificación de eventos transgénicos y evaluación en semilla de la expresión del transgen, nivel de proteínas y carotenoides y tests de segregación realizados para determinar el estado homocigoto/heterocigoto de las plantas evaluadas.

2.3. Test de segregación

Para realizar el test de segregación final que permitió determinar el estado homocigoto/heterocigoto de las plantas T₂ para el transgen *BnaC.PSY.a-6XHis-tag*, diez semillas T₃ fueron germinadas y crecidas al estadio de dos hojas para la posterior cosecha independiente de tejido foliar y extracción de ADN de cada una de las plántulas (Figura 2). La aislación de ADN fue conducida siguiendo el procedimiento CTAB descrito por Kidwell y Osborn (1992). El ADN extraído fue usado para evaluar la presencia del transgen *BnaC.PSY.a-6XHis-tag* mediante PCR en las líneas transgénicas usando partidores específicos al transgen (SSCP3F y HisTag2R, Tabla S1). Las reacciones de PCR se realizaron usando GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, WI, USA). La presencia de ADN en las distintas muestras fue evaluada mediante amplificación del gen actina de *B. napus* usando partidores específicos (Tabla S1). El proceso de amplificación para ambas reacciones (transgen y control positivo) se inició con un paso de desnaturalización a 95°C por 2 min, seguido por 40 ciclos de 45 seg a 95°C, 30 seg a 51°C y 1 min a 72°C, con una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de RT-PCR fueron corridos y visualizados en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Las imágenes de los geles se digitalizaron a través de LAS 3000 (Fujifilm Co. Ltd, Tokyo, Japan). La detección del transgen por PCR en las diez plántulas T₃ (10 de 10) permitió determinar la homocigosis de cada planta T₂ autopolinizada (Figura 2). Por el contrario, si en al menos una de las diez plántulas T₃ no se detectaba el transgen, se determinó que la planta T₂ era heterocigota (Figura 2).

2.4. Análisis de la abundancia relativa de transcritos para el transgen *BnaC.PSY.a-6XHis-tag* y de los 6 genes *PSY* endógenos durante el desarrollo de semillas mediante RT-PCR

Las plantas transgénicas fueron evaluadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) en cuanto a la abundancia relativa del transgen *BnaC.PSY.a-6XHis*, de su contraparte endógena *BnaC.PSY.a* y de los otros cinco homólogos *PSY* en semillas T₃ de 6 eventos independientes (tres réplicas biológicas por evento (n=3)), en dos

estadios de desarrollo, 30 y 60 días post antesis (dpa). Con este fin, se diseñaron partidores específicos en las zonas menos conservadas de la secuencia de cDNA de los genes homólogos *BnaX.PSY* (PSYaSpecF PSYaRev; PSYbSpecF, BnaPSY.NRb; PSYcSpecF3, PSYcRev; PSYdSpecF, PSYdRev; PSYeSpecF2, PSYeRev2; PSYfSpecF, PSYfRev, Tabla S1). El RNA total de 100 mg de semillas (T₃) colectadas a 30 dpa y 60 dpa, fueron extraídos usando el kit Absolutely RNA RT-PCR Miniprep Kit (Agilent Technologies, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La extracción de RNA se realizó a partir de tres réplicas biológicas (T₂) por evento transgénico. La síntesis de cDNA fue realizada usando el kit AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, CA, USA) desde 2 µg de RNA total en un volumen de reacción de 20 µl. La síntesis de cDNA fue evaluada por amplificación por PCR del gen β-tubulina de *B. napus* usando partidores específicos (β-tubulina-F y β-tubulina-R, Tabla S1). La ausencia de contaminación por gDNA fue evaluada por amplificación por PCR del gen actina usando partidores específicos (Bna.Actina-F y Bna.Actina-R, Tabla S1). Este set de partidores genera un fragmento de 725-pb para cDNA y un fragmento de 900-pb para gDNA debido a la presencia de un intrón (dato no mostrado). El cDNA sintetizado y evaluado fue utilizado en los estudios de RT-PCR convencional y en tiempo real. Los RT-PCR fueron realizados usando GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, WI, USA). Las amplificaciones comenzaron con un paso de desnaturalización a 95°C (2 min), seguido por 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 40 ciclos de 30 seg a 51°C (β-tubulina) ó 47°C (*BnaX.PSY*, *BnaC.PSY.a-6XHis-tag*) y 30 seg a 72°C, con una extensión final a 72°C por 5 min. La amplificación de los genes *BnaX.PSY.a-f* fue realizada usando partidores oligos específicos (Tabla S1) comenzando con un paso de desnaturalización a 95°C (2 min), seguido por 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 40 ciclos de 30 seg a 50°C (*BnaX.PSY.b,e*) ó 55°C (*BnaX.PSY.a,c,d,f*) y 1 min a 72°C, con una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de RT-PCR fueron corridos y visualizados en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

2.5. RT-PCR cuantitativo en tiempo real

El nivel de transcritos del transgen *BnaC.PSYa-6XHis*, y los genes endógenos *BnaX.PSY* fue evaluado utilizando partidores específicos (BnaC.PSY.aRT-F2, HisTag2R; Bn.PSY.all-F, Bn.PSY.all-R, Tabla S1) en semillas T₃ de 6 eventos independientes, en dos estadios de desarrollo, 30 y 60 dpa mediante RT-PCR en tiempo real. La amplificación del gen β -tubulina (β -TUBULIN-F, β -TUBULIN-R) de *B. napus* fue usado como control interno para la normalización de los niveles de expresión. Para las RT-PCR en tiempo real se usaron los mismos cDNA utilizados en las RT-PCR (sección 2.4). Dos μ l de una dilución 1 en 10 v/v de cada cDNA fue utilizado como templado en cada reacción. La amplificación fue llevada a cabo usando el kit Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene) (volumen total de reacción 20 μ l) y corrido en el equipo Mx3000 qPCR System (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA) con el programa MxPro QPCR, de siguiente manera: 95°C x 10 min; 40 ciclos: 95°C x 30 seg, 50/56°C x 40 seg, 72°C x 30 seg; 95°C x 20 seg, 55°C x 5 seg, 95°C x 1 seg, 25°C x 30 seg. La abundancia relativa de los transcritos de los genes blanco fue calculada como $2^{-\Delta Ct}$, donde *Ct* es el número de ciclos de PCR para la amplificación de los genes blancos menos la misma medida para *β -tubulina* (Welsch et al., 2010). Los valores estarán representados por el promedio de tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas de RT-PCR. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA (sección 2.8). La eficiencia de los partidores fue evaluada mediante RT-PCR en tiempo real en diluciones seriadas de cDNA. La eficacia de los partidores se calculó mediante la siguiente ecuación $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$ (Rasmussen R., 2001). Esto permitió determinar una eficiencia específica de 2,02 (β -TUBULIN-F, β -TUBULIN-R), 2,05 (Bn.PSY.all-F, Bn.PSY.all-R) y 1,98 (BnaC.PSY.aRT-F2, HisTag2R) para cada pareja de partidores.

2.6. Extracción, purificación y detección de la proteína BnaC.PSY.a-6XHis-tag

Las plantas homocigotas de la progenie T₂ seleccionadas fueron evaluadas en cuanto al nivel de proteína BnaC.PSY.a-6XHis en semilla T₃. El extracto de proteínas fue preparado a partir de 50mg de semillas pulverizadas en presencia de nitrógeno líquido de plantas control y

transgénicas (T₂). Al tejido pulverizado fue adicionado 700 µl de fenol saturado con Tris-HCl (pH 8.0), 45 µl de SDS 10% (p/v), 45 µl de β-mercaptoetanol y agitado por vortex. Luego se adicionó 225 µl de sacarosa al 40%, e incubó a 58°C por 20 min invirtiendo el tubo cada 5 min durante los primeros 15 minutos para luego centrifugar por 10 min a 10.000 x g a T° ambiente. La centrifugación permitió separar dos fases. La fase superior (fenol, aprox. 400 µl) se recuperó, se mezcló con 1,6 ml de metanol, y el tubo se dejó 1h a -80°C y luego se centrifugó por 1 min a 10.000 x g. El precipitado fue lavado dos veces con metanol, secado al aire y resuspendido en 150 µl de buffer (fosfato sódico 50 mM (pH 7.4), guanidina, 6 M y cloruro de sodio 300 mM) La concentración de proteína en la muestra se determinó por el método de Bradford con BSA como estándar. La extracción de proteína se repitió hasta obtener una cantidad de proteína total de 3 mg para las muestras de semillas 30 dpa y 5,7 mg para las muestras de 60 dpa. Para purificar parcialmente la proteína BnaC.PSY.a-6XHis-tag a partir de la proteína extraída, 3 mg de proteína proveniente de semilla 30 dpa y 5 mg de proteína proveniente de semilla 60 dpa fue purificada utilizando His SpinTrap TALON (GE Healthcare Life Science, NJ, USA). Brevemente, la columna es lavada dos veces con 550 µl de buffer (fosfato sódico 50 mM (pH 7.4), guanidina 6 M, cloruro de sodio 300 mM, y Triton X-100 1% (v/v)). Después, se agregó 500 µl del extracto de proteína a la columna y se mezcló suavemente por 30 min, las proteínas no adheridas a la resina fueron eliminadas por centrifugación a 100 g por 30 seg, ambos pasos son repetidos hasta que toda la proteína fue pasada a través de la columna. Para descartar la proteína no adherida a la resina, las columnas fueron lavadas 10 veces con 600 µl de buffer urea (fosfato sódico 50 mM (pH 7.4), urea 8 M, cloruro de sodio 300 mM, y Triton X-100 1% (v/v)). Finalmente la proteína purificada BnaC.PSY.a-6XHis-tag fue obtenida eluyendo cada columna con 200 µl de imidazol 50 mM en buffer urea. Las proteínas purificadas BnaC.PSY.a-6XHis-tag fueron separadas por electroforesis a través de SDS-PAGE en dos réplicas técnicas. En resumen, 15 µl de cada muestra fue mezclada con 5 µl de buffer (Tris-HCl 0,375 M (pH6.8), DTT 150 mM,) SDS 12% (w/v), sacarosa 30% (w/v), y azul de bromofenol 0,012% (w/v)). La muestra se corrió en gel poliacrilamida T/2,6% SDS-PAGE 10% (w/v). Se usó 1 µl de estándar de proteínas como marcador para la medición del peso molecular de la muestra (GE Healthcare Life Science). Después de la electroforesis, las proteínas en el gel fueron teñidas con el método de tinción

plata. Las imágenes de los geles se digitalizaron a través de LAS 3000 (Fujifilm Co. Ltd, Tokyo, Japan).

2.7. Extracción de carotenoides y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Plantas transgénicas fueron evaluadas en cuanto a composición y nivel de carotenoides en semillas T₃ de 6 eventos independientes, en dos estadios de desarrollo, 30 y 60 dpa mediante HPLC con 1 y 3 réplicas biológicas respectivamente. A la vez, como control se evaluaron semillas de *B. napus* sin transformar (30 y 60 dpa) en 3 réplicas biológicas. La extracción de carotenoides a partir 100 mg de semilla se realizó moliendo con mortero la semilla con 1 ml de acetona (Welsch et al., 2008). Se llevaron a cabo tres sucesivas extracciones para remover los carotenoides hasta que no se observe color en el tejido. El extracto fue centrifugado (14000 rpm x 1min), para luego el sobrenadante ser concentrado y secado con nitrógeno gaseoso. Los carotenoides secos fueron resuspendidos en 1 ml de acetona grado-HPLC al 100% y utilizados en una primera etapa para la determinación de carotenoides totales mediante la utilización de un espectrofotómetro y analizados en cuanto a su 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) y 520/750 nm (Datos necesarios para determinar la turbidez de la muestra y por ende validar los datos obtenidos). Las mediciones fueron utilizadas para la determinación de carotenoides totales siguiendo las ecuaciones descritas por Lichtenthaler y Buschmann (2001). Los carotenoides de semillas fueron medidos por espectrofotometría a 474 nm en el equipo Shimadzu HPLC (LC-10AT) con arreglo de diodo. Los pigmentos fueron separados y cuantificados por HPLC usando una columna MultoHigh 100 RP 18-5 μ (150 x 4,6 mm) en fase reversa, utilizando una fase móvil que consistió en tres componentes: acetonitrilo, metanol, 2 propanol (85:10:5 v/v), una tasa de flujo de 1,5 ml/min a temperatura ambiente y una duración de 60 min. La concentración de los principales compuestos carotenoides y clorofilas presentes en las muestras fueron identificados analizando 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 comparando con el manual de carotenoides (Britton G, 1995; Britton G et al., 2008). Todas las actividades fueron realizadas en hielo y en condiciones de oscuridad para evadir la fotodegradación, cambio estructural e isomerización de los carotenoides.

2.8. Análisis estadístico

El promedio de la concentración de carotenoides en semillas 60 dpa obtenido mediante HPLC y los niveles de expresión de los genes *PSY* y *BnaC.PSY.a-6XHis-tag* de semillas 30 y 60 dpa de plantas control y transgénicas, fueron sujetos a análisis de varianza de una vía (ANOVA) usando el software IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0 (Armonk, NY: IBM Corp). Las diferencias entre valores fueron consideradas significativas con un valor $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Construcción del vector binario pCambia2300-Lec::*BnaC.PSYa-6XHis*

El estudio descriptivo en el capítulo I evaluó la funcionalidad *in vivo* de los seis genes *BnaX.PSY.x* por medio de un test de complementación heteróloga en *E. coli* demostrando que son capaces de complementar un gen defectuoso $\Delta crtB$ (PSY bacteriana) al producir β -caroteno (López et al., 2014). Estos resultados demostraron que los seis miembros de la familia *PSY* son funcionales. Sin embargo, la selección de uno de estos genes con el fin de sobreexpresarlo en semillas de *B. napus*, fue previa a la evaluación de la funcionalidad de los 6 *PSY*. De esta manera, la selección se basó en la información con la que contábamos, es decir, datos preliminares de expresión en semillas y la existencia de información génica descrita por Cárdenas et al (2014). Esto debido principalmente al tiempo requerido tanto para la obtención de las líneas transgénicas de *B. napus* como de las generaciones necesarias para llevarlas a un estado homocigoto. Así, se seleccionó el gen *BnaC.PSY.a*, basados en la información preliminar que indicaba un alto nivel de transcritos tanto en tejidos ricos en cloroplastos como cromoplastos (Cárdenas et al., 2014). Sin embargo, estudios posteriores descritos en el Capítulo I, demostraron que el gen elegido, *BnaC.PSY.a*, produjo en el sistema de complementación heteróloga altos niveles de β -caroteno (López et al., 2014). A la vez el estudio de expresión en semilla, demostró que *BnaC.PSY.a* es expresado en los cuatro estados de desarrollo que se estudiaron hasta madurez (20, 30, 45 y 60 dpa) (López et al., 2014). Estos antecedentes indican que es uno de los genes que puede estar contribuyendo en la carotenogénesis en semilla de *B. napus* y avalaron su selección inicial para sobreexpresarlo en dirección a semilla en plantas de esta especie. Dado que *BnaC.PSY.a*, presenta en su secuencia un péptido de tránsito (TP) de dirección a plastidios, el TP se mantuvo en la secuencia para la generación del vector. Además, por RT-PCR, se adicionó una secuencia correspondiente a un Tag de 6 histidinas (6XHis) en el extremo 3' a fin de diferenciar el transgen de su contraparte endógena. Otro punto a considerar fue la selección de promotor. Seleccionándose al promotor semilla-específico del gen *lectina (Le1)* de *Glicine max* (GenBank: EU070414) dado que presenta potencial para conducir altos niveles de expresión de genes en semillas en desarrollo de soja, tabaco entre otras plantas dicotiledóneas (Saeed et al., 2008). Esta expresión semilla-

específica quedó ilustrada en la investigación conducida por Lindstrom et al. (1990) donde la expresión del gen lectina bajo el del promotor *Le1* (1700pb) en plantas de tabaco, resultó en un incremento de los niveles de proteínas a medida que maduraba la semilla (9 dpa- madurez). Además, tanto los estudios de Lindstrom et al. (1990) como los bioinformáticos de Fauteux y Strömviik (2009) muestran que hay motivos altamente conservados y funcionales en promotores semilla-específicos de diversas especies (*A. thaliana*, *G. max*, *O. sativa*, *B. napus*) y familias de plantas (Brassicaceae, Fabaceae y Poaceae). Varios de estos motivos son encontrados en el promotor de *lectina* de soya, *Le1* (Lindstrom et al., 1990). De esta manera, se seleccionó el promotor del gen *Le1* para controlar la expresión del gen *BnaC.PSY.a* en semilla de *B. napus* (Figura 3). Las distintas etapas de construcción del vector fueron detalladas en la sección Metodología 2.1 (Figura 1). El vector pCambia2300-Lec::*BnaC.PSY.a-6XHis* generado fue transferido por electroporación a las cepas de *A. tumefaciens* LBA4404 o GV3101. Estas cepas han mostrado distintos grados de eficiencia en la transformación de *B. napus* dependiendo del explante utilizado (Rani et al., 2013). Para la cepa LBA4404 se han reportado eficiencias desde 0.01% para cotiledones hasta 31% en hipocótilos y para la cepa GV3101 eficiencia en pecíolos de hojas de 4,5% (Longdou et al., 2005; Wang et al., 2005; Moghaieb et al., 2006; Kong et al., 2009; Li et al., 2010; Liu et al., 2011).

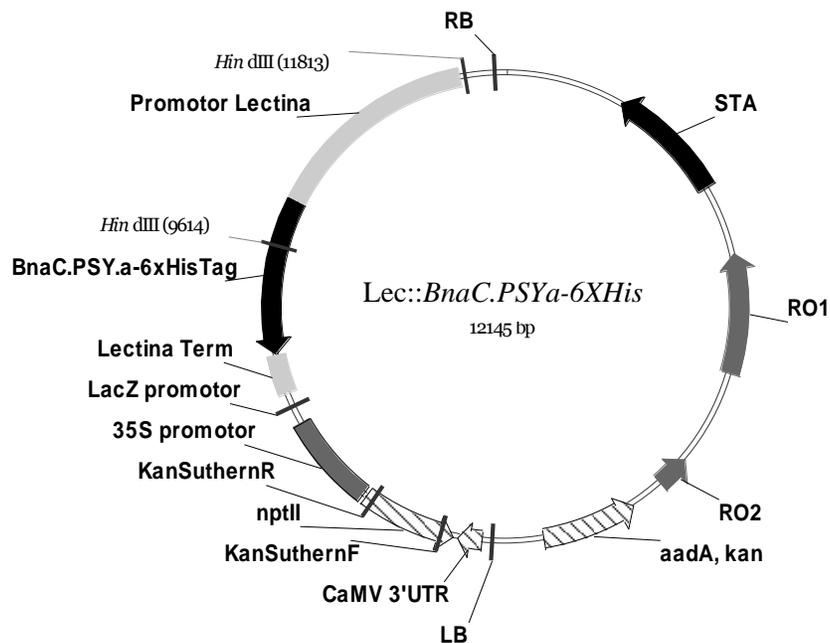


Figura 3. Vector binario generado. Se muestra el Vector pCambia2300-Lec::*BnaC.PSYa-6XHis* generado conteniendo el CDS del gen *BnaC.PSY.a* con su correspondiente péptido de tránsito bajo el control del promotor y terminador del gen *Lectina* de soja y un Tag de seis histidinas (6xHisTag) localizado en el 3'. RB: borde derecho; LB: borde izquierdo.

3.2 Transformación de *B. napus* e identificación de eventos transgénicos

La transformación de *B. napus* fue realizada a partir de cotiledones tejido con una alta capacidad de regeneración, razón por la cual es uno de los tejidos más usados en la transformación de especies *Brassica* (Rani et al., 2013). Es esta capacidad la que ha resultado en niveles de eficiencia de transformación en *B. napus* que van desde un 1,14%–33% (Longdou et al., 2005; Moghaieb et al., 2006; Rani et al., 2013). En esta investigación se realizaron 10 procesos de transformación totalizando 4280 hipocótilos infectados (Figura 4A), a partir de los cuales se regeneraron un total de 162 plantas con una cantidad variable de brotes por plantas (367 brotes totales) (Figura 4B-C). De cada brote se colectó tejido foliar y se extrajo ADN para ser evaluados por PCR en cuanto a la presencia del transgen.



Figura 4. Transformación of *B. napus* mediada por *Agrobacterium*. (A) Selección (B) regeneración (C) transferencia a condiciones de invernadero.

Las plantas regeneradas (T_0) fueron evaluadas por PCR. Para determinar la extracción exitosa de ADN en las distintas muestras el gen actina de *B. napus* fue amplificado usando partidores específicos (control positivo, dato no mostrado). Posteriormente, los distintos ADN genómicos fueron analizados mediante el uso de partidores específicos en cuanto a la presencia del transgen que confiere resistencia a kanamicina (*NPTII*) y del transgen *BnaC.PSYa-6XHis* (dato no mostrado). Los resultados evidencian la obtención de 7 eventos transgénicos (T_0) obtenidos por la transformación con el vector pCambia2300-Lec::*BnaC.PSYa-6XHisTag* (Figura 5). La eficiencia de transformación total fue de 0,16%.

De estos 7 eventos transgénicos (T_0), el evento BnPSY-107 mostró esterilidad, por lo tanto los estudios funcionales se realizaron en los 6 eventos fértiles. Estas 6 plantas T_0 fueron autopolinizadas para la obtención de las correspondientes progenies T_1 . Al menos diez plantas T_1 fueron crecidas y autopolinizadas para la obtención de semilla T_2 de cada evento. Las generaciones T_3 (10 semillas de cada evento) fueron crecidas al estado de dos hojas verdaderas para el test de segregación por PCR. Esto permitió establecer que de las generaciones T_2 , cinco eventos corresponden a individuos homocigotos (PSY-24, PSY-25, PSY-26, PSY-33, PSY-133) y que el evento PSY-131 aún se encuentra en estado hemicigoto para el transgen (PSY-131a.3.10) (Figura S3). De cada evento T_2 se seleccionaron tres plantas a partir de las cuales se tomaron muestras de tejidos que fueron utilizados para el análisis de los eventos

transgénicos. Sólo una de las réplicas biológicas incluidas en este estudio corresponde a un individuo hemicigoto para el transgen (PSY-131a3-10) (Figura S3).

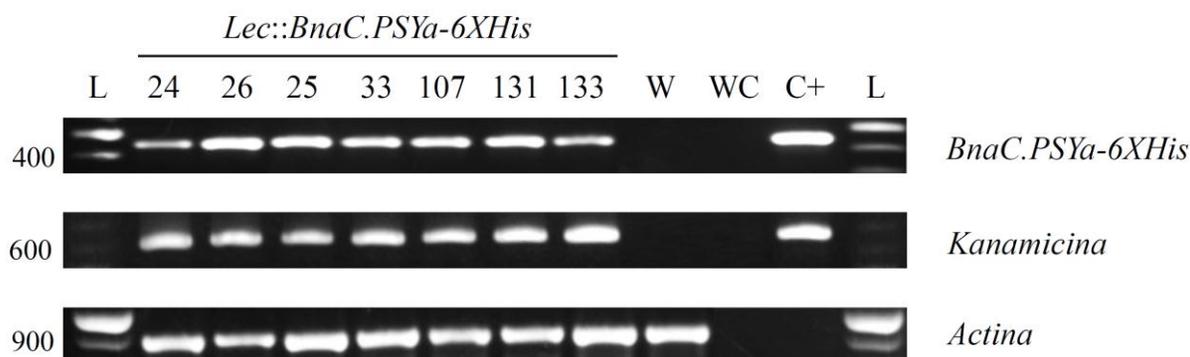


Figura 5. Análisis de PCR de eventos transgénicos de *B. napus* Eventos transgénicos T₀ fueron confirmados mediante la amplificación por PCR del transgen *BnaC.PSYa-6XHis* y del transgen que confiere resistencia a kanamicina (*NPTII*). La presencia de ADN en las distintas muestras fue confirmada mediante la amplificación por PCR del gen actina de *B. napus* usando partidores específicos. L: ladder; W: *B. napus* no transformada, WC: control de agua; C+: control plásmido.

3.3. Análisis de la abundancia relativa de transcritos del transgen *BnaC.PSYa-6XHis* y los 6 genes *PSY* de *B. napus* en semilla

Usando partidores homólogo-específicos, se evaluó por RT-PCR la abundancia relativa de transcritos de la familia de genes *PSY* de *B. napus*, del transgen *BnaC.PSYa-6XHis* y conjunta de los homólogos (*BnaX.PSY*) y el transgen usando un set de partidores conservado (Bn.PSY.all-F, Bn.PSY.all-R) (Tabla S1) en semillas T₃ en dos etapas diferentes del desarrollo (30 y 60 dpa) de los eventos transgénicos (Figuras 6-7). Este análisis se realizó con el propósito de poder comparar el patrón de expresión de los genes endógenos *BnaX.PSY* en las líneas transgénicas respecto a *B. napus* sin transformar (Figura 6-7). Como resultado se pudo confirmar que los eventos transgénicos presentan abundancia relativa de transcritos para el

transgen en las tres réplicas biológicas en semillas 30 y 60 dpa (Figura 6-7). Además, la familia *PSY* presenta una abundancia relativa de transcritos similar en los eventos transgénicos (Bna.PSY.24.1.7, Bna.PSY.25.1.8, Bna.PSY.26.a.12, Bna.PSY.33.3.1 y Bna.PSY.133.f.7) y *B. napus* sin transformar en semillas 30 dpa (Figura 6). Acorde a lo esperado, la pareja de partidores Bn.PSY.all, amplificó en semillas 30 y 60 dpa tanto en los eventos transgénicos, como en el control.

El gen endógeno *BnaC.PSY.a*, presentó transcritos en semilla 60 dpa de todos los eventos transgénicos y *B. napus* sin transformar, sin embargo su homeólogo, *BnaA.PSY.b*, no presentó transcritos en los cDNAs de semilla 60 dpa (Figura 7). Esto ratifica la selección del gen *BnaC.PSY.a* para sobreexpresarlo en semilla, porque presenta un patrón de expresión temprano y se mantiene hasta la madurez, lo que sería indicativo de su importancia en la carotenogénesis en semilla. El gen *BnaC.PSY.e* expresado preferencialmente en pétalos (Cárdenas et al., 2012), se detectó presencia de transcritos en semillas de cuatro eventos solamente en semillas 30 días post anthesis (Bna.PSY.24.1.7, Bna.PSY.25.1.8, Bna.PSY.26.a.12 y Bna.PSY.33.3.1) (Figura 6-7). Es interesante que uno de los eventos transgénicos, BnPSY.131.a.3.6, presenta reducida o nula expresión de los genes *PSY* homólogos en semilla 30 dpa mientras que presenta expresión del transgen en las tres réplicas biológicas y amplificación de la pareja de partidores Bn.PSY.all (Figura 6). Solamente se observaron transcritos del gen *BnaA.PSY.d* en dos de las réplicas biológicas de este evento (BnPSY.131.a.3.6 (homocigota) y BnPSY.131.a.3.10 (hemicigota), semilla 30-dpa). Las reacciones de RT-PCR se realizaron a 40 ciclos (Figura 11). La especificidad de los partidores homólogos específicos fue previamente evaluada en el capítulo I y en este experimento como control positivo se utilizaron los plásmidos que contienen cada uno de los seis genes *PSY* de *B. napus* y el transgen *BnaC.PSYa-6XHis* (Figura 6-7).

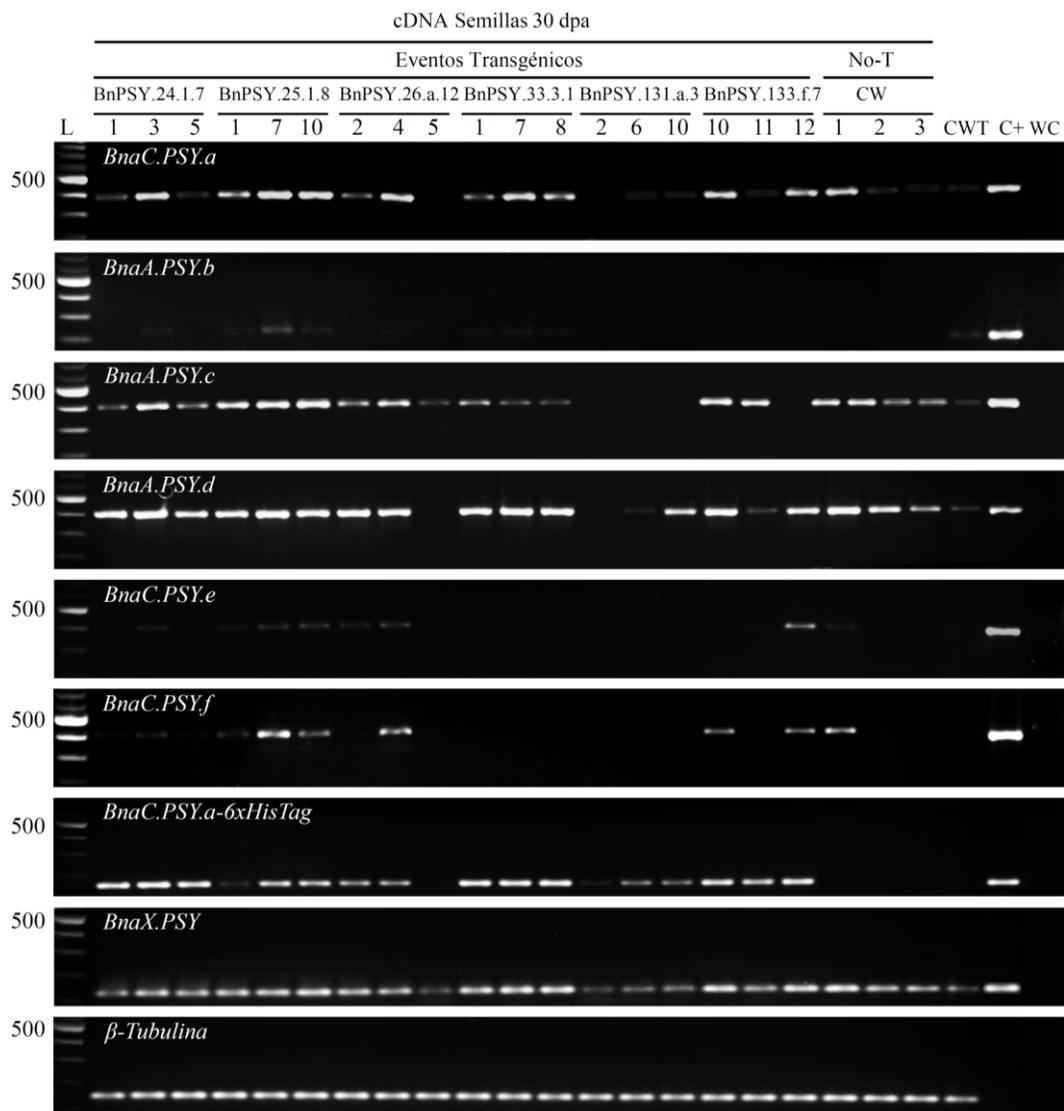


Figura 6. Análisis de la abundancia relativa de transcritos para el transgen *BnaC.PSYa-6XHis* y la familia *PSY* en semilla (T₃-30 dpa) de los eventos transgénicos de *B. napus* mediante RT-PCR. La expresión de genes *BnaX.PSY* fue determinada usando partidores específicos a cada homólogo. La expresión del transgen *BnaC.PSYa-6XHis* fue determinada usando partidores específicos. *BnaX.PSY*, control que muestra la abundancia relativa de transcritos de los 6 genes *BnaX.PSY* y el transgen *BnaC.PSYa-6XHis* mediante el uso de partidores conservados. Expresión del gen β -tubulina de *B. napus* (control de carga). L: ladder; CW: control westar, *B. napus* sin transformar; CWT: control westar transformación; WC: control de agua; C+: control plásmido (positivo) homólogo-específico *PSY*. RT-PCR (40 ciclos), fue realizada en tres réplicas biológicas.

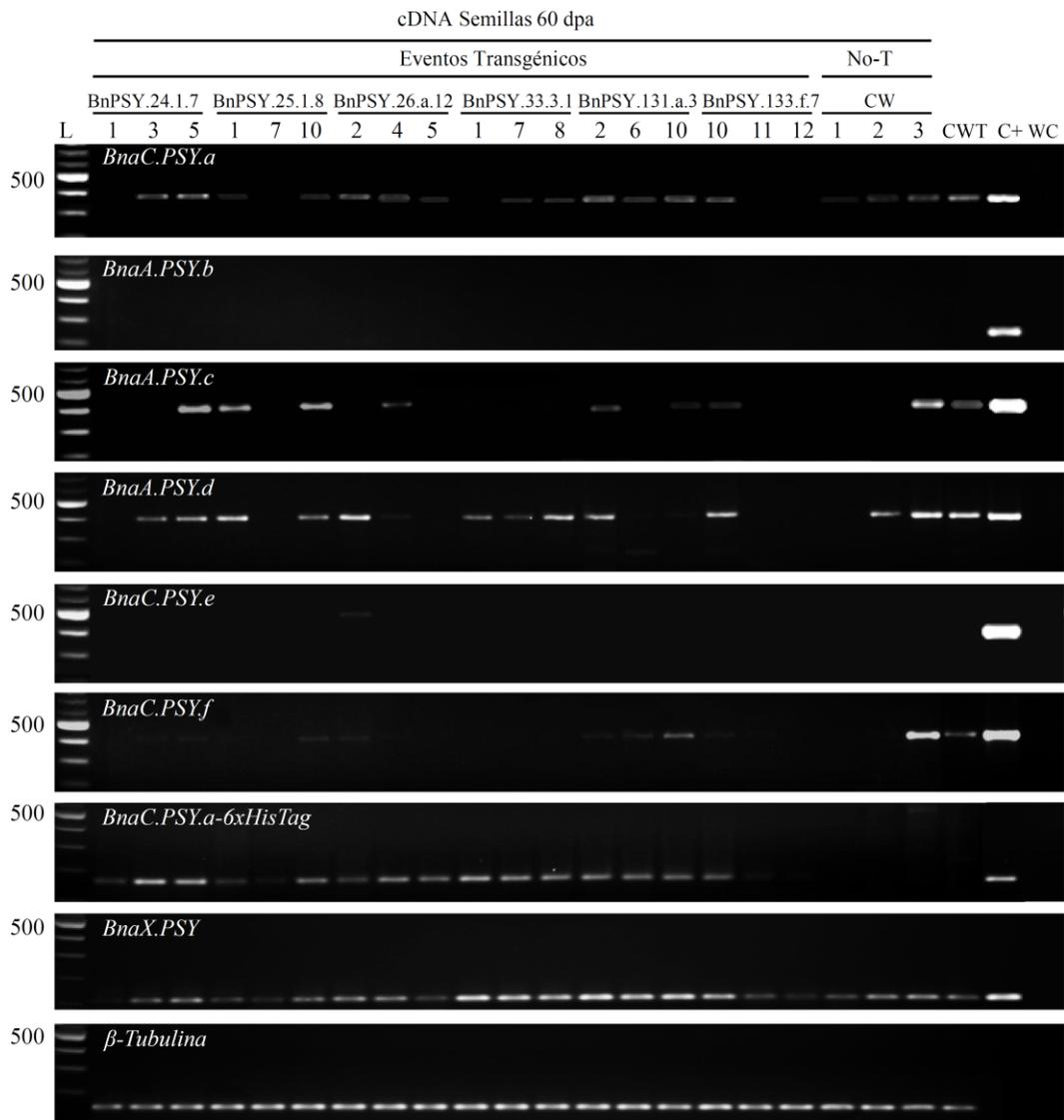


Figura 7. Análisis de la abundancia relativa de transcritos para el transgen *BnaC.PSYa-6XHis* y la familia *PSY* en semilla (T₃-60 dpa) de los eventos transgénicos de *B. napus* mediante RT-PCR. La expresión de genes *BnaX.PSY* fue determinada usando partidores específicos a cada homólogo. La expresión del transgen *BnaC.PSYa-6XHis* fue determinada usando partidores específicos. *BnaX.PSY*, control que muestra la abundancia relativa de transcritos de los 6 genes *BnaX.PSY* y el transgen *BnaC.PSYa-6XHis* mediante el uso de partidores conservados. Expresión del gen β -tubulina de *B. napus* (control de carga). L: ladder; CW: control Westar, *B. napus* sin transformar; CWT: control westar transformación; WC: control de agua; C+: control plásmido (positivo) homólogo-específico *PSY*. RT-PCR (40 ciclos), fue realizada en tres réplicas biológicas.

3.4. Análisis del nivel de transcritos del transgen *BnaC.PSYa-6XHis* y el nivel de transcritos *PSY* totales en semillas de *B .napus*

Usando partidores específicos, se evaluó por RT-PCR en tiempo real el nivel de transcritos para el transgen *BnaC.PSYa-6XHis* y el nivel conjunto de todos los transcritos *PSY* (*BnaX.PSY*) (Genes endógenos y transgen) usando un set de partidores conservados (Bn.PSY.all-F, Bn.PSY.all-R) (Tabla S1) en semillas T3 en dos etapas diferentes del desarrollo 30 y 60 dpa de los eventos transgénicos (Figura 8). Como resultado se pudo determinar que los seis eventos transgénicos presenta niveles diferenciales de transcritos del transgen y que no hay expresión alguna en el control sin transformar (Figura 8). Este resultado concuerda con los obtenidos en el RT-PCR (Figura 6-7). A su vez, se pudo determinar diferencias significativas en los niveles de transcritos del transgen en ambos estados de desarrollo. Por ejemplo en semilla 30 dpa, los eventos BnPSY.24.1.7 y BnPSY.33.3.1 mostraron los mayores niveles de transcritos del transgen (Figura 8A) y en semilla 60 dpa el mayor nivel de transcritos del transgen se observó en los eventos BnPSY.33.3.1 y BnPSY.131.a.3 (Figura 8B).

El nivel de transcritos *PSY* totales, presentó diferencias significativas sólo en el evento BnPSY.33 en cDNA de semilla 30 y 60 dpa (Figura 8). Por otra parte, en la RT-PCR se observó que el evento transgénico BnPSY.131.a.3 presentó muy bajo nivel de transcritos de la familia de genes *PSY* en semilla 30 dpa, pero si del transgen y transcritos provenientes de la amplificación con la pareja de partidores Bn.PSY.all. Estos resultados unido a los observado en la RT-PCR en tiempo real nos lleva a pensar que el nivel de transcritos resultado de la amplificación con el set de partidores Bn.PSY.all consistió principalmente de transcritos del transgen (Figura 8A)

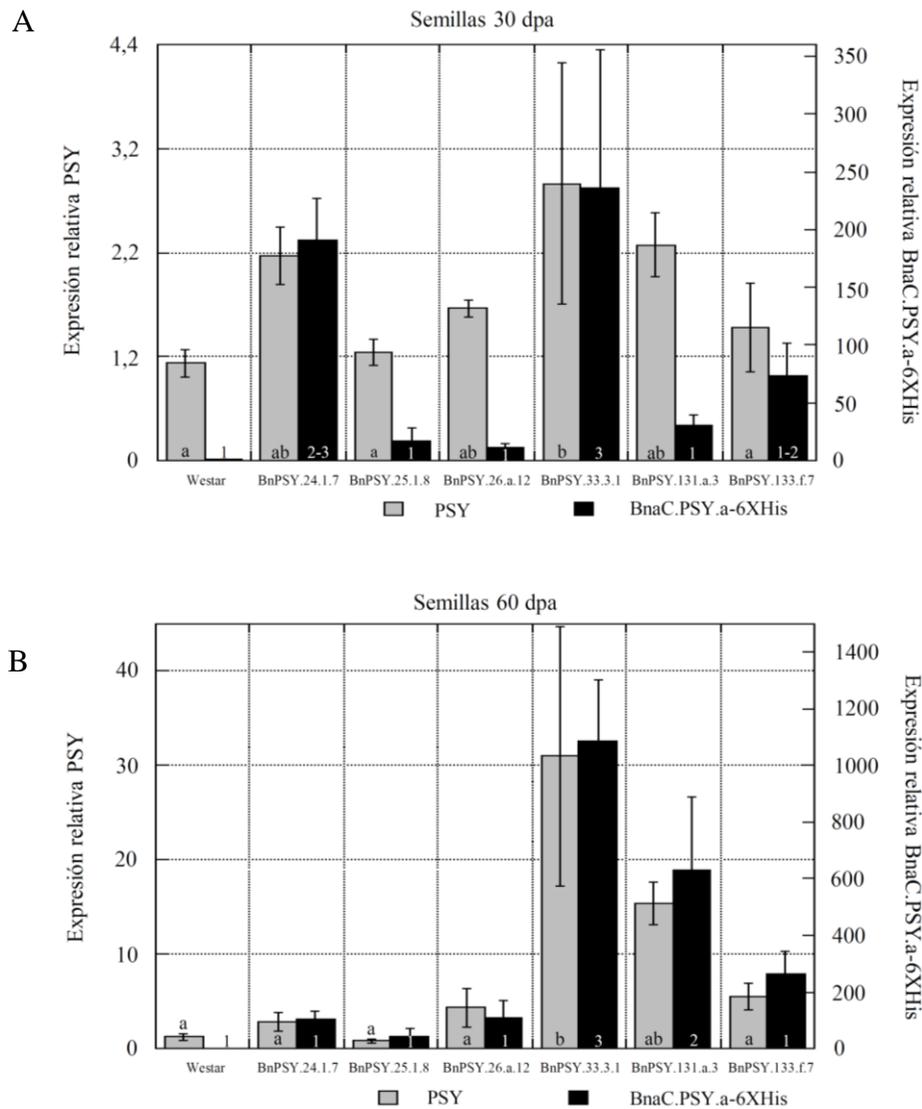


Figura 8. Análisis del nivel de transcritos del transgen *BnaC.PSYa-6XHis* y los genes *PSY* endógenos de *B. napus* en semilla T₃ 30 y 60 dpa de los eventos transgénicos mediante RT-PCR cuantitativo en tiempo real. (A) Semillas 30 dpa (B) Semillas 60 dpa. El nivel de transcritos del transgen *BnaC.PSYa-6XHis* fue determinada usando partidores específicos. PSY, corresponde al nivel de transcritos conjunto de los 6 genes *BnaX.PSY* y el transgen *BnaC.PSYa-6XHis* mediante el uso de partidores conservados Bn.PSY.all. Los transcritos del gen β -tubulina de *B. napus* fueron usados como control interno para la normalización del nivel de transcritos de los genes blanco. Westar: *B. napus* sin transformar. Las barras representan el error estándar calculado desde tres réplicas biológicas (n=3) y dos réplicas técnicas (n=2). Número y letras representan diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre grupos.

3.5. Detección de proteína *BnaC.PSYa-6XHis*

Las proteínas fueron extraídas de semillas T₃ de los eventos transgénicos y de *B. napus* sin transformar en dos estadios de desarrollo, 30 y 60 dpa. La concentración promedio de proteína extraída fue de 17,4 y 30,3 mg/g en semilla a 30 y 60 dpa, respectivamente. Debido a que la concentración de proteína en semillas 60 dpa fue 1,7 veces más alto que en 30 dpa, la cantidad de proteína aplicada a la columna se ajustó según esta proporción (3 mg para 30 dpa y 5 mg para 60 dpa). La proteína-histidina purificada fue separada a través de SDS-PAGE. Las imágenes de los geles teñidos con plata son mostradas en la Figura 9. El gel muestra varias bandas inespecíficas, lo que podría deberse a que el sistema de separación para las proteínas *BnaC.PSYa-6XHis* utilizado se basa en la interacción de histidina con un ion metálico, Co²⁺, que tiene afinidad por proteínas que contienen secuencias de 4 a 10 histidinas, por lo que estas bandas podrían corresponder a proteínas endógenas de las semillas de *B. napus* con esas características (Müller-Esterl et al., 2008). Considerando lo anterior, en el gel corrido con el extracto de proteína purificada de semillas 30 dpa (Figura 9A), se observan 3 bandas principales a alturas aproximadas de 55, 40 y 30 kDa. El gen sobreexpresado *BnaC.PSYa-6XHis* conteniendo un secuencia que codifica un *6XHis* en el dominio C-terminal, codifica una proteína predicha de 40,44 kDa. Una banda de tamaño cercano a 40 kDa, fue detectada en tres de los eventos transgénicos (BnPSY.24.1.7.5, BnPSY.33.3.1.1, BnPSY.131.a.3.6) en semilla 30 dpa (Figura 9A). Estos resultados concuerdan con los obtenidos con el RT-PCR cuantitativo en tiempo real, donde en el primer evento (BnPSY.24.1.7.5), se detectaron altos niveles de expresión del transgen y en el segundo (BnPSY.33.3.1.1), diferencias significativas en la expresión del transgen comparado con los otros cinco eventos. También son interesantes los resultados obtenidos para el evento transgénico BnPSY.131.a.3.6, en el cual se había descrito una baja detección de transcritos de los homólogos *PSY* y alta del transgen. En estos tres eventos se presentó un alto nivel de expresión que pudo haber resultado en la traducción de la proteína *BnaC.PSYa-6XHis* detectada (Figura 9A). Por otra parte, en el gel corrido con el extracto de proteína purificada de semilla 60 dpa (Figura 9B), se detectaron más bandas de diversos pesos moleculares, a los 55, 52, 40, 35, 32 kDa y más, esta última detectada únicamente en el evento BnPSY.131.a.3.6 (Figura 9B). La banda de 40 kDa es menos intensa al compararla con la de 30 dpa. En los eventos BnPSY.24.1.7.5, BnPSY.26.a.12.2, se detectó

una banda clara a los 35 kDa (Figura 9B). Considerando lo anterior, los resultados obtenidos referentes a la detección de la proteína BnaC.PSYa-6XHis, no son concluyentes.

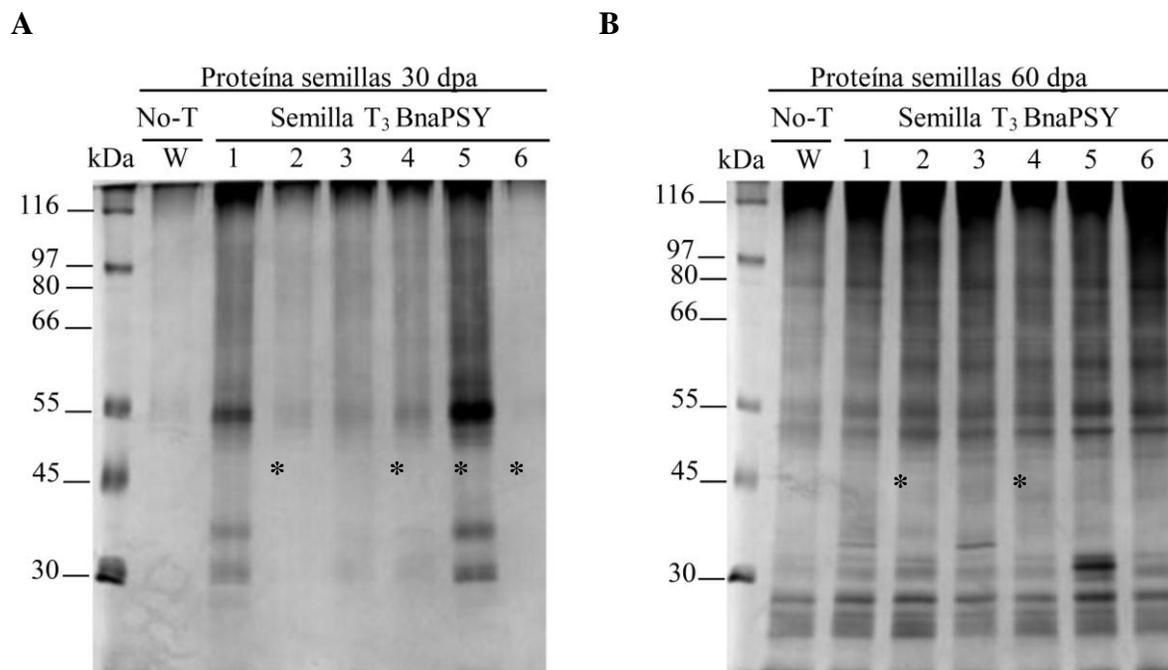


Figura 9. SDS-PAGE proteína-HisTag purificada de semilla. (A) Semillas T₃ 30 dpa eventos transgénicos (B) Semillas T₃ 60 dpa eventos transgénicos. kDa: estándar de proteínas como marcador de peso molecular; W: *B. napus* sin transformar; (1) BnPSY.24.1.7.5; (2) BnPSY.25.1.8.1; (3) BnPSY.26.a.12.2; (4) BnPSY.33.3.1.1; (5) BnPSY.131.a.3.6; (6) BnPSY.133.f.7.11; Asterisco (*): Banda de altura aproximadas de 40 kDa. Cada SDS-PAGE fue realizado en dos réplicas técnicas, sólo se muestra una para simplificar. De la proteína-HisTag purificada, 15 µL fueron cargados por carril.

3.6 La sobreexpresión del gen *BnaC.PSY.a* en dirección a semilla de *B. napus* afecta su contenido de carotenoides

Diversas estrategias han sido utilizadas con el propósito de incrementar los niveles de carotenoides en semilla de *B. napus* y así generar altas concentraciones de estos pigmentos, en

parte, para la posterior producción de aceites ricos en β -caroteno. En este estudio, mediante el uso de un promotor tejido específico con dirección a semilla, fue expresado uno de los genes fitoeno sintasa (*PSY*) endógeno de *B. napus* y se determinó que el transgen está siendo expresado en todas las líneas generadas. Sin embargo, la presencia de la proteína transgénicas no ha sido confirmada de manera concluyente. Aunque esto puede deberse a problemas técnicos y a la selección de tag utilizada, en principio esto podría explicar por qué las semillas de las líneas transgénicas no muestran diferencias visuales en cuanto al color que evidencien una acumulación de β -caroteno respecto a la semilla de las plantas control (Figura 11I). Característica que ha sido evidente en otros estudios, y en nuestro laboratorio, cuando fue expresado el gen fitoeno sintasa de *Erwinia uredovora* (*CrtB*) con dirección a semilla en *B. napus* (Shewmaker et al., 1999 ; Federico y Schmidt, 2016). Los resultados obtenidos durante la identificación y cuantificación de pigmentos mediante HPLC son congruentes con el color observado en semillas, mostrando diferencias en la acumulación de carotenoides en semillas 30 dpa (Figura 10H) y diferencias significativas de tan solo dos veces los niveles de carotenoides en semilla 60 dpa de dos eventos transgénicos respecto al control (BnPSY.131.a.3.6, BnPSY.133.f.7.11) (Figura 11H). Además, el aumento de pigmentos está compuesto principalmente por luteína (Figura 11A-G). En semillas 30 dpa, se observó una proporción similar de los niveles de clorofilas de 29-35% (Figura 10A-G), niveles que han sido observados en semilla entre 20 y 35 dpa de *B. napus* fotosintéticamente activas (Eastmond et al., 1996; Yu et al., 2010). Por otra parte, bajos niveles de clorofila fueron encontrados en semilla madura (60 dpa) tanto en los eventos transgénicos como en el control (Figura 11A-H). En semillas oleaginosas como las de *B. napus*, los carotenoides son almacenados en plastídios especializados, los elaioplastos (Howitt y Pogson, 2006; Kirk y Tilney, 1978). Luteína es el carotenoide mayormente presente en estos plastídios en semillas de plantas oleaginosas (McGraw et al., 2001). Especies como zapallo (53%), *Arabidopsis* (61%) y canola son evidencia clara de esto (Matus et al., 1993; Lindgren et al., 2003; Shewmaker et al., 1999). En *A. thaliana*, la sobreexpresión del gen *AtPSY* bajo el control de un promotor de semilla específico, incrementó los niveles de luteína y a la vez los niveles de β -caroteno, cambiando la proporción de la concentración de luteína de un 61% a un 40% en el extracto de carotenoides totales. A diferencia, en este estudio la composición principal de carotenoides obtenida en las semillas (30 y 60 dpa) fue luteína no mostrando mayor diferencia

en la proporción en el extracto de carotenoides total de semillas transgénicas respecto al control. Además, se encontraron niveles bajos o nulos de β -caroteno (Lindgren et al., 2003). Este trabajo se realizó bajo la hipótesis que la sobreexpresión de un gen *BnaX.PSY* podría presentar un mayor incremento en la acumulación de carotenoides en *B. napus*. Esto considerando que las enzimas involucradas en las primeras reacciones de la ruta de síntesis de carotenoides se agrupan en un complejo enzimático ubicado en los plastídios, la expresión de un gen *PSY* de mayor cercanía filogenética podría resultar en una mejor interacción con las demás enzimas del complejo (Cunningham y Gantt, 1998; Cunningham et al., 2002). Además estudios previos habían demostrado la alta capacidad de acumulación de carotenoides que poseen las semillas de este cultivo (Shewmaker et al., 1999). Los resultados obtenidos pueden ser el resultado de varios factores. Uno de ellos está asociado al hecho de que a la secuencia del gen endógeno *PSY*, se le insertó un 6XHis en el extremo carboxilo. Hay que notar que a la fecha no se ha descrito la transformación de plantas con un gen *PSY* que contenga 6XHis en alguno de los extremos de su secuencia. Lo que se ha descrito es la inserción de un 6XHis en la región 5' del gen *AtPSY*, con el fin de purificar la proteína para producir anticuerpos anti-*AtPSY* (Maass et al., 2009). Otro ejemplo descrito hasta ahora es un estudio in vitro donde se evaluó el cambio en un residuo del gen *AtPSY* de A₁₉₁ a D₁₉₁, en ambos casos el 6XHis se localizó en la región amino terminal que resultó en un incremento de la síntesis de fitoeno 3 veces mayor en 6XHis*AtPSY* D₁₉₁ (Welsch et al., 2010). La secuencia 6XHis en el extremo carboxilo podría estar afectando los sitios de interacción proteína-proteína (Cunningham F, 2002; Cunningham y Gantt, 1998). El modelo predicho de la proteína *BnaC.PSY.a* fue analizado respecto a los sitios de interacción proteína-proteína y este sitio de interacción predicho está localizado en el extremo carboxilo (Capítulo I) (Figura S4A). Posteriormente fue generado un nuevo modelo, esta vez, de la proteína *BnaC.PSY.a-6xHis*, y como resultado se observó la formación de un alfa hélice en la parte final donde están localizadas las 6 Histidinas (Figura S4B), este cambio podría estar afectando la interacción con las otras enzimas del complejo de síntesis de carotenoides (Cunningham F, 2002; Cunningham y Gantt, 1998), resultando en un bajo incremento de los niveles de carotenoides en los eventos transgénicos y una baja ó nula producción de β -caroteno. De esta manera, el incremento en los niveles de carotenoides resulta tan bajo que no modifica la dirección del flujo de síntesis de carotenoides hacia la síntesis de β -caroteno como se observó en el trabajo de Shewmaker et al. (1999), sino

se mantiene el patrón de la planta control. En este caso, la condensación de dos moléculas de GGPP en 15-*cis*-fitoeno por la enzima fitoeno sintasa (PSY), se mantiene como un cuello de botella.

Por otra parte, si bien se esperaba una acumulación principal de β -caroteno, el incremento significativo de los niveles de luteína en semillas transgénicas 60 dpa es interesante debido a que se ha relacionado el consumo a través de la dieta de este miembro del grupo de las xantófilas, con la prevención de enfermedades. Por ejemplo, la prevención de la degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades cardiovasculares, arteriosclerosis, cataratas, retinopatía diabética, cáncer y otras enfermedades (Alves-Rodrigues y Shao, 2004; Jansen et al., 2013; Ma et al., 2012, Madaan et al., 2017; Olmedilla et al., 2003; Santana et al., 2017; Zou et al., 2011). Además, dado que es un potente antioxidante, protege activamente los tejidos de los daños causados por las especies reactivas (Hartmann et al., 2004; Santana et al., 2017). Es debido a esto y su aplicación como fotoprotector y fuente de pigmentos naturales en la industria, que el tamaño de su mercado ha alcanzado casi \$150 en EE.UU y sigue en expansión (Madaan et al., 2017). Por lo anterior un incremento en los niveles de luteína en semilla de *B. napus* y por lo tanto en su aceite, es de interés para la industria alimentaria.

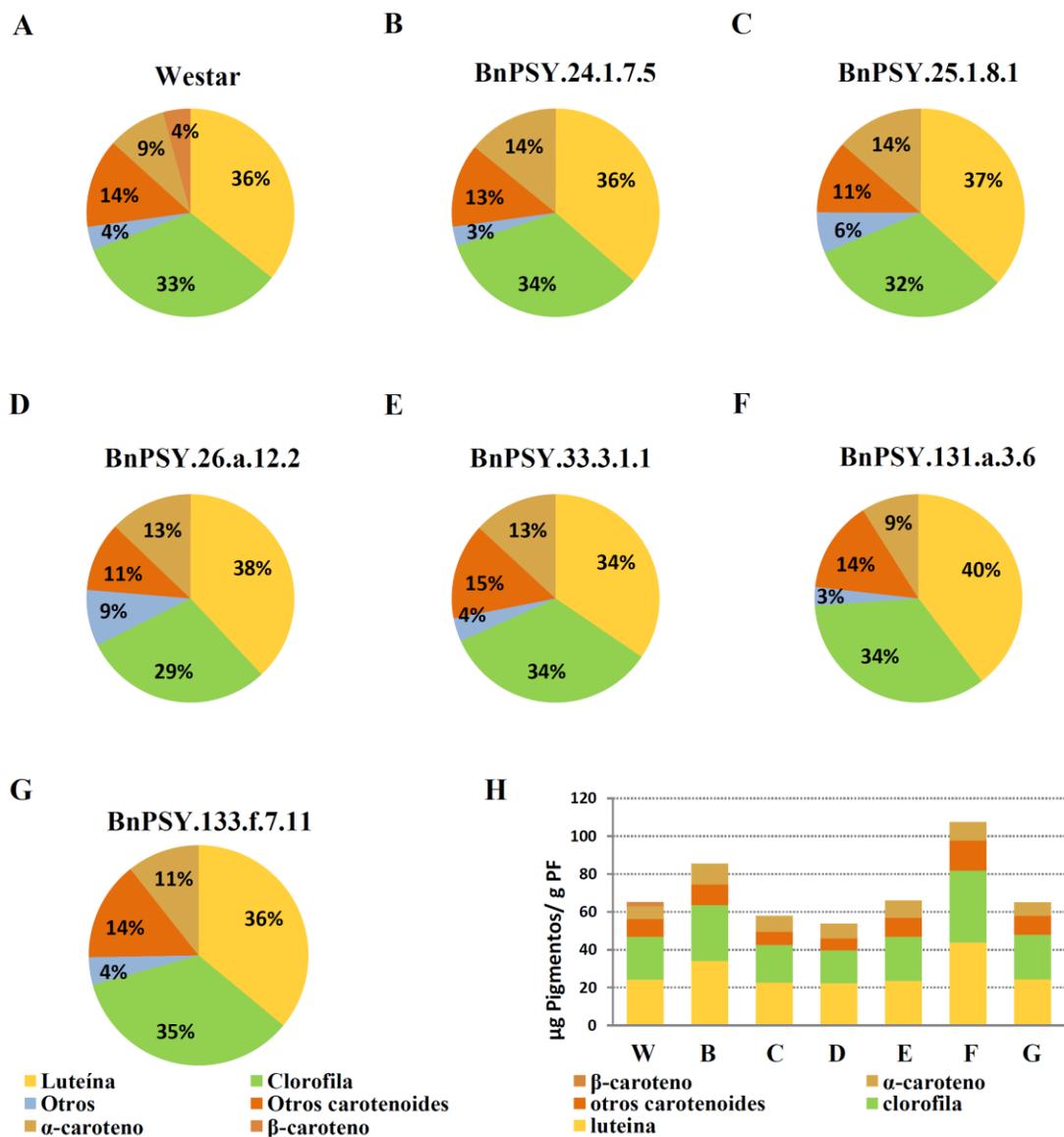


Figura 10. Contenido y composición de carotenoides en semilla 30 dpa de los seis eventos transgénicos. El contenido y composición de carotenoides y otros pigmentos fue analizado por HPLC (A-G) Composición en porcentaje de pigmentos en semillas Westar-30 dpa (control) y eventos transgénicos T3-30 dpa (H) Contenido (µg/gPF) y composición de pigmentos en semillas de los eventos transgénicos. (W) *B. napus* sin transformar; (A) BnPSY.24.1.7.5; (B) BnPSY.25.1.8.1; (C) BnPSY.26.a.12.2; (D) BnPSY.33.3.1.1; (E) BnPSY.131.a.3.6; (F) BnPSY.133.f.7.11. Los valores graficados representan el promedio de tres replicas (n=3) biológicas en el caso de *B. napus* sin transformar (W) y de una réplica biológica (n=1) para todos los eventos transgénicos.

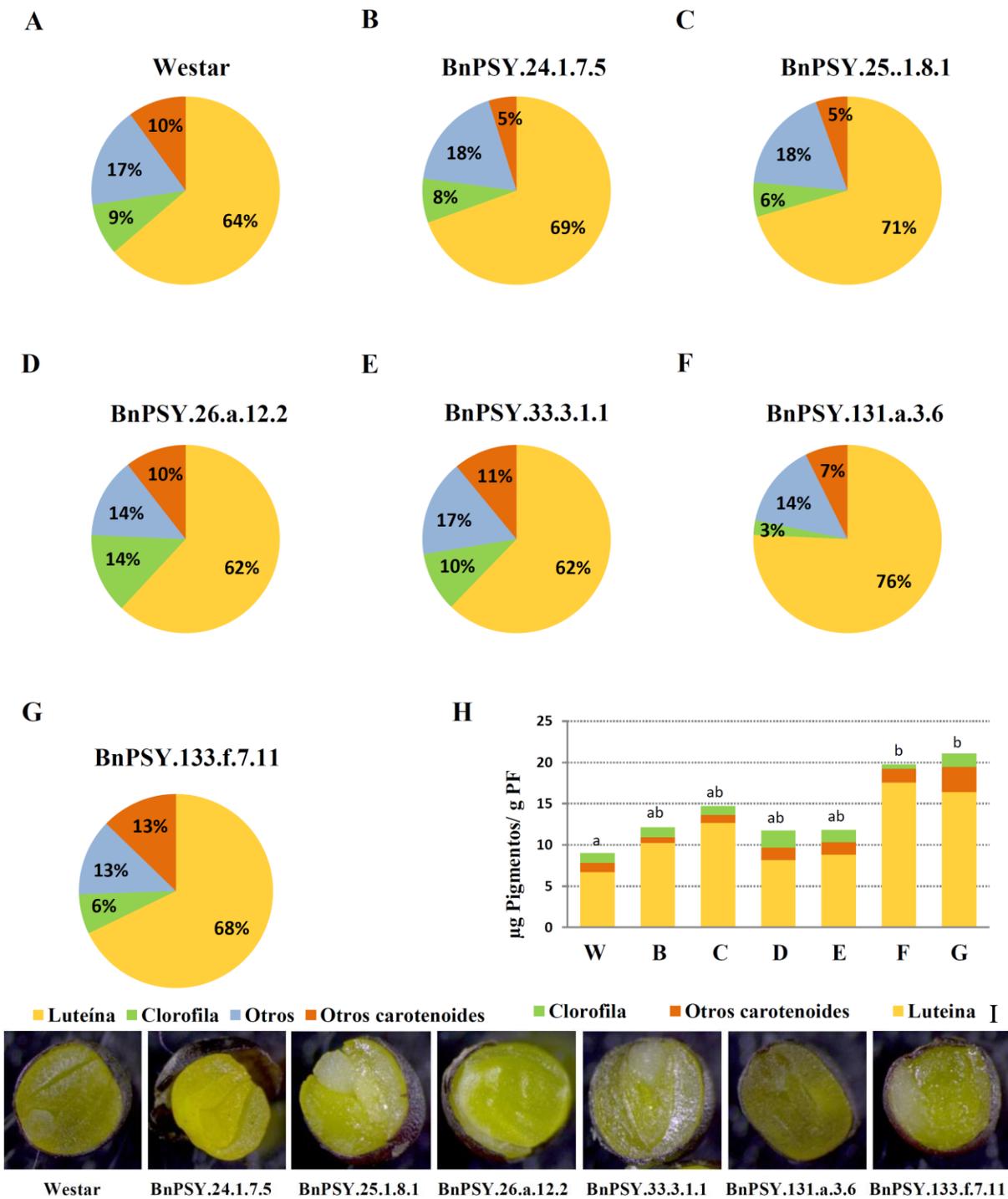


Figura 11. Contenido y composición de carotenoides en semilla 60 dpa de los seis eventos transgénicos. El contenido y composición de carotenoides y otros pigmentos fue analizado por HPLC (A-G) Composición en porcentaje de pigmentos en semillas Westar-60 dpa (control) y eventos transgénicos T₃-60 dpa (H) Contenido (µg/gPF) y composición de

pigmentos en semillas de los eventos transgénicos. (W) *B. napus* sin transformar; (1) BnPSY.24.1.7.5; (2) BnPSY.25.1.8.1; (3) BnPSY.26.a.12.2; (4) BnPSY.33.3.1.1; (5) BnPSY.131.a.3.6; (6) BnPSY.133.f.7.11. Las letras en las barras del gráfico representan diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre grupos con tres réplicas biológicas (n=3) por grupo. (I) Semillas 60 dpa transgénicas y control. Westar: *B. napus* sin transformar.

4. CONCLUSIONES

Actualmente es reconocida la necesidad creciente de generar cultivos mejorados que presenten mayores niveles de compuestos beneficiosos para el ser humano o para la industria como son los carotenoides. Es evidente el interés de mejorar los niveles de este pigmento en semilla de uno de los cultivos oleaginosos más importantes a nivel mundial como es *B. napus*, prueba de ello son los estudios expresando genes de la ruta de síntesis de carotenoides en dirección a semilla con este fin. También los estudios asociados a una mejor comprensión de la ruta síntesis de carotenoides en este cultivo, partiendo por la detección, aislación y evaluación de los principales genes de la ruta de síntesis. Un punto clave y hasta ahora no evaluado era la sobreexpresión de un gen endógeno *BnaX.PSY* funcional de *B. napus*. En este estudio se seleccionó un gen *PSY* de *B. napus* cuya actividad y patrón de expresión en semilla fue previamente evaluada. Una primera etapa estuvo orientada a generar el vector de expresión conteniendo el gen *BnaC.PSY.a-6xHis* y sobreexpresarlo en dirección a semilla de *B. napus*. La evaluación de las plantas regeneradas determinó la obtención exitosa de siete eventos transgénicos. Además, la evaluación de expresión del transgen en semilla mostró que es expresado en semilla en los dos estadíos de desarrollo evaluados (30-60 dpa) de los seis eventos, al mismo tiempo que en algunos eventos cambió el patrón de expresión de los genes *BnaX.PSY* respecto al control. La siguiente etapa orientada a aislar y detectar la proteína *BnaC.PSYa-6xHis* condujo a un resultado inconcluso respecto a si esta fue detectada en algunos eventos transgénicos en ambos estado de desarrollo. Finalmente, el siguiente paso fue determinar si los eventos transgénicos exhibían incrementos en los niveles de carotenoides y o cambios en su composición. Mediante el análisis de los resultados obtenidos por HPLC se determinó un incremento apenas superior a dos veces la concentración de carotenoides en semillas transgénicas respecto al control en ambos estados de desarrollo. Sin embargo, no se observaron incrementos en los niveles de β -caroteno, sino más bien de luteína. A la vez, en términos generales los eventos que mostraron mayor expresión del transgen o cambio en el perfil de transcritos de los genes *BnaX.PSY*, mostraron el mayor incremento en la concentración de carotenoides en semilla respecto al control. Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de un gen endógeno *PSY* produjo un modesto aumento en los niveles de carotenoides en semilla de *B. napus*. Este trabajo es un paso inicial en el uso de un gen *PSY*

endógeno en ingeniería metabólica del contenido de carotenoides en esta especie. Surge de nuestra investigación que el gen *BnaA.PSY.d* que se expresa más fuertemente en semilla en las distintas etapas de desarrollo y que presentó la mayor actividad en un sistema de complementación heteróloga es un buen candidato a ser utilizado. Además, el promotor *le1* de soya ha demostrado ser eficiente en la expresión de un transgen en semilla de *B. napus*.

CONCLUSIONES GENERALES

El análisis de estas secuencias CDS aisladas determinó que las seis PSY codifican proteínas con alta identidad de secuencias y poseen motivos característicos presentes en las enzimas fitoeno sintasa (TP, dominio trans-IPP, sitio activo DXXD). Además el modelo deducido de las proteínas mostró que todas son estructuras ricas en alfa-hélices y que poseen el característico sitio activo rico en aspartato (DELVD y DVGED) localizado en las paredes opuestas de dos alfa-hélices. Indicando en primera instancia que los seis miembros de esta familia son funcionales.

La evaluar funcional *in-vivo* por medio de un test de complementación heteróloga en *E. coli*, mostró que los seis genes *BnaX.PSY* son capaces de complementar un gen defectuoso *ΔcrtB* (PSY bacteriana) al producir β-caroteno. Estos resultados demostraron que los seis miembros de la familia de genes *PSY* de *B. napus* son funcionales. A la vez que las diferencias observadas en las producción de β-caroteno en la complementación con los seis *BnaX.PSY* puede estar asociadas a las pequeñas variaciones observadas en sus secuencias aminoacídicas que pueden estar afectando su actividad fitoeno sintasa o bien la interacción con otros miembros del complejo enzimático.

El análisis de la expresión de genes *PSY* durante el desarrollo de semilla evidenció que los seis genes *PSY* están siendo expresados en semilla y que los mayores niveles de expresión se observan temprano en el desarrollo de este tejido (20 dpa). Además se identificó patrón de expresión de los genes *BnaX.PSY.c-d* *B. napus* como los genes que se expresan más fuertemente en semilla en las distintas etapas de desarrollo estudiadas.

La sobreexpresión gen *BnaC.PSY.a* en dirección a semilla resultó en la obtención de eventos transgénicos que expresan el transgen en semillas en los dos estados de desarrollo evaluados (30-60 dpa). Sin embargo el resultado fue inconcluso respecto a si la proteína BnaC.PSYa-6xHis fue detectada en semilla transgénica en ambos estado de desarrollo (30-60 dpa). Finalmente, la sobreexpresión del gen *BnaC.PSYa-6xHis* incremento dos veces la concentración de carotenoides, compuesto principalmente por luteína en semillas transgénicas

respecto al control. Así, tanto la expresión del transgen, la probable detección de proteína transgénica y el incremento en los niveles de carotenoides se demostró que la sobreexpresión en semilla de un gen endógeno *PSY* incrementó los niveles de carotenoides en *B. napus*.

Este trabajo proporciona un pool de genes *PSY* funcionales idóneos para su uso en ingeniería metabólica del contenido de carotenoides en cultivos oleaginosos y son un paso inicial para aumentar la comprensión de los papeles de cada uno de los miembros de la familia de genes *PSY* de *B. napus* en la carotenogénesis en diversas etapas de desarrollo, tejido específico y en respuesta a diversas señales medio ambientales. A la vez que demuestran que la sobreexpresión de un *PSY* endógeno en *B. napus* conduce a incrementar los niveles de carotenoides, permitiendo el desarrollo de nuevas estrategias en ingeniería metabólica del contenido de carotenoides por ejemplo, a través de la sobreexpresión del gen *BnaA.PSY.d* mutagenizado en orden a la obtención de altos niveles de carotenoides en semilla de *B. napus*.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Auldridge M, Block A, Vogel J, Dabney-Smith C, Mila I, et al. (2006) Characterization of three members of the Arabidopsis carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *The Plant Journal* 45:982-993.
- Al-Babili S, Hugueney P, Schledz M, Welsch R, Frohnmeyer H, et al. (2000) Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum*. *FEBS Lett.* 485:168–172.
- Altschul S, Madden T, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Alves-Rodrigues A, Shao A (2004) The science behind lutein. *Toxicol. Lett.* 150:57–83.
- Arango J, Wüst F, Beyer P, Welsch R (2010) Characterization of phytoene synthase from cassava and their involvement in abiotic stress-mediated responses. *Planta* 232:1251-1262.
- Balmer Y, Koller A, del Val G, Manieri W, Schurmann P, et al. (2003) Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:370-375.
- Banuelos GS, Dhillon K, Banga S (2013) Biofuel crops: production, physiology and genetics. pp. 339-368. In B.B Singh (ed.) *Oil Seed Brassica's*, CABI International, Wallingford, UK.
- Baroli I, Niyogi KK (2000) Molecular genetics of xanthophyll dependent photoprotection in green algae and plants. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355: 1385-1394.
- Baron M, Davies S, Alexander L, Snellgrove D, Sloman KA (2008) The effect of dietary pigments on the coloration and behaviour of flame-red dwarf gourami, *Colisa lalia*. *Animal Behaviour* 75:1041–1051.

- Bartley G, Scolnik P (1993) cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of *PSY2*, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *J. Biol. Chem.* 268: 25718-25721.
- Bouvier F, Keller Y, d'Harlingue A, Camara B (1998) Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum L.*). *Biochim. Biophys. Acta* 1391:320–328.
- Bouvier F, Suire C, d'Harlingue A, Backhaus R, Camara B (2000) Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells. *The Plant Journal* 24:241–252.
- Breitenbach J, Sandmann G (2005) zeta-Carotene cis isomers as products and substrates in the plant poly-cis carotenoid biosynthetic pathway to lycopene. *Planta* 220: 785–793.
- Britton G (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb Journal* 9: 1551–1558.
- Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, editors (2008) *Carotenoids Handbook*: Basel: Birkhäuser Verlag. 671 p.
- Bruce B (2000) Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends in Cell Biology* 10: 440-447.
- Busch M, Seuter A, Hain R (2002) Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* 128: 439–453.
- Buzza GC (1995) Plant Breeding. In: Kimber DS, McGregor DI. (eds) *Brassica oilseeds: production and utilization*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 153-175.
- Cárdenas P, Gajardo H, Huebert T, Parkin I, Iniguez-Luy F, et al (2012) Retention of triplicated phytoene synthase (*PSY*) genes in *Brassica napus L.* and its diploid progenitors during the evolution of the Brassiceae. *Theoretical and Applied Genetics* 124(7):1215-1228.
- Cazzonelli C, Pogson BJ (2010) Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 15(5):266-274.
- Chaudhary N, Khurana J (2010) Carotenoid biosynthesis genes in rice: structural analysis, genome-wide expression profiling and phylogenetic analysis. *Mol. Genet. Genomics* 283:13-33.

- Cheng F, Wu J, Fang L, Sun S, Liu B (2012) Biased Gene Fractionation and Dominant Gene Expression among the Subgenomes of *Brassica rapa*. *PLoS One* 7(5):e36442.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson T, et al. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31:3497-3500.
- Cordoba E, Salmi M, Leon P (2009) Unraveling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *Journal of Experimental Botany* 60:2933-2943.
- Covington M, Maloof J, Straume M, Kay S, Harmer S (2008) Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biology* 9:R130.
- Cunningham F, Gantt E (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual rev. Plant Physiology Plant Molecular Biology* 49:557-583.
- Cunningham F (2002) Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure Appl. Chem.* 74:1409-1417.
- Cunningham FX Jr, Gantt E (2007) A portfolio of plasmids for identification and analysis of carotenoid pathway enzymes: *Adonis aestivalis* as a case study. *Photosynth Res* 92: 245-259.
- Dall'Osto L, Fiore A, Cazzaniga S, Giuliano G, Bassi R (2007) Different roles of α - and β - branch xanthophylls in photosystem assembly and photoprotection. *J. Biol. Chem* 282: 35056–35068.
- De Carvalho, Frendo P, Van Montagu M, Cornelissen M (1995) Post-transcriptional cosuppression of b-1, 3-glucanase genes does not affect accumulation of transgene nuclear mRNA. *Plant Cell* 7:347–358.
- DellaPenna D, Pogson BJ (2006) Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology* 57: 711–738.
- Demmig-Adams B, Gilmore AM, Adams WW (1996) *In vivo* functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J* 10: 403-412.g.
- Diretto G, Tavazza R, Welsch R, Pizzichini D, Mourgues F, et al. (2006) Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene ϵ -cyclase. *BMC Plant Biology* 6:13.

- Diretto G, Al-Babili S, Tavazza R, Papacchioli V, Beyer P, et al., (2007) Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial minipathway. *PLoS ONE* 2, e350
- Ducreux LJM, Morris WL, Hedley PE, Shepherd T, Davies HV, et al. (2005) Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of beta-carotene and lutein. *Journal of Experimental Botany* 56:81–89.
- Eastmond P, Koláčná L, Rawsthorne S (1996) Photosynthesis by developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J. Exp. Bot.* 47 1763–1769.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., von Heijne, G. (1999). ChloroP, a neural network based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science*. 8: 978-984.
- Facella P, Lopez L, Carbone F, Galbraith DW, Giuliano G, et al. (2008) Diurnal and circadian rhythms in the tomato transcriptome and their modulation by cryptochrome photoreceptors. *PLoS One* 3:e2798.
- Federico M, Schmidt M (2016) Modern breeding and biotechnological approaches to enhance carotenoid accumulation in seeds. *Sub-Cellular Biochemistry*, 79, 345-358.
- Farré G, Sanahujaa G, Naqvi Sh, Baia Ch, Capella T, et al. (2010) Travel advice on the road to carotenoids in plants. *Plant Science* 179:28–48.
- Farré G, Bai Ch, Twyman RM, Capell T, Christou P, et al. (2011) Nutritious crops producing multiple carotenoids – a metabolic balancing act. *Trends in Plant Science* 16(10):532-540.
- Fauteux F, Strömvik MV (2009) Seed storage protein gene promoters contain conserved DNA motifs in Brassicaceae, Fabaceae and Poaceae. *Bio Med Central Plant Biology* 9:126.
- Federico ML, Kaeppler, HF, Skadsen RW (2005) The complex developmental expression of a novel stress-responsive barley Ltp gene is determined by a shortened promoter sequence. *Plant Molecular Biology* 57: 35-51.
- Fitzpatrick TB, Basset GJC, Borel P, Carrari F, DellaPenna D, et al. (2012) Vitamin Deficiencies in Humans: Can Plant Science Help? *The Plant Cell* 24: 395–414.
- Fraser P, Kiano J, Truesdale R, Schuch, Bramley P (1999) Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Molecular Biology* 40:687-698.

- Fraser P, Schuch W, Bramley P (2000) Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts-partial purification and biochemical properties. *Planta* 211:361-369.
- Fraser PD, Romer S, Shipton CA, Mills PB, Kiano JW, et al. (2002) Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:1092–1097.
- Fraser P, Bramley P (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research* 43(3):228-65.
- Fujisawa M, Takita E, Harada H, Sakurai N, Suzuki H, et al. (2009) Pathway engineering of *Brassica napus* seeds using multiple key enzyme genes involved in ketocarotenoid formation. *Journal of Experimental Botany* 60(4):1319–1332.
- Fukushima A, Kusano M, Nakamichi N, Kobayashi M, Hayashi N, et al. (2009) Impact of clock-associated *Arabidopsis* pseudo-response regulators in metabolic coordination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:7251-7256.
- Gady ALF, Vriezen WH, Van de Wal MHB, Huang P, Bovy AG, et al. (2011) Induced point mutations in the phytoene synthase 1 gene cause differences in carotenoid content during tomato fruit ripening. *Mol Breed* 29: 801–812.
- Gallagher C, Matthews P, Li F, Wurtzel E (2004) Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. *Plant Physiology* 115:1776-1783.
- Garcia-Plazaola J, Becerril J (1999) A rapid high-performance liquid chromatography method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols, *Phytochemical Analysis* 10:307–313.
- Giuliano G, Bartley G, Scolnik P (1993) Regulation of Carotenoid Biosynthesis during Tomato Development. *The Plant Cell* 5:379-387.
- Giuliano G, Aquilani R, Dharmapuri S (2000) Metabolic engineering of plant carotenoids. *Trends in Plant Science* 5:406–409.
- Giuliano G, Al-Babili S, von Lintig J (2003) Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. *Trends in Plant Science* 8:145-149.

- Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, Beyer P, Taylor M (2008) Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol.* 26(3):139-45.
- Giuliano G (2017) Provitamin A biofortification of crop plants: a gold rush with many miners. *Current Opinion in Biotechnology* 44:169-180.
- Glover NM, Redestig H, Dessimoz C (2016) Homoeologs: What Are They and How Do We Infer Them? *Trends Plant Sci* 21(7):609-21.
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer P, Puech-Pagès V, Dun E, et al. (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455:189–194.
- Hannoufa A, Hossain Z (2012) Regulation of carotenoid in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 1: 198-202.
- Hannoufa A, Pillai B, Chellamma S (2014) Genetic enhancement of Brassica napus seed quality. *Transgenic Research* 23:39–52.
- Hartmann D, Thürmann P, Spitzer V, Schalch W, Manner B, et al. (2004) Plasma kinetics of zeaxanthin and 3'-dehydro-lutein after multiple oral doses of synthetic zeaxanthin. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:410–417.
- Hellens R, Mullineaux Ph, Klee H (2000) Technical Focus:A guide to Agrobacterium binary Ti vectors. *Trends in Plant Science* 5(10):446-451.
- Hirschberg J (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* 4:210–218.
- Howitt C, Cavanagh C, Mimica J, Pogson B (2009) Alternative splicing, activation of cryptic exons and amino acid substitutions in carotenoid biosynthetic genes are associated with lutein accumulation in wheat endosperm. *Funct. Integr. Genomics* 9:363–376.
- Howitt CA, Pogson BJ (2006) Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ* 29:435–445.
- Hsieh M, Goodman H (2005) The Arabidopsis IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant Physiology* 138:641-653.
- Hu Z, Hua W, Zhang L, Deng L, Wang X, et al. (2013) Seed Structure Characteristics to Form Ultrahigh Oil Content in Rapeseed. *PLoS ONE* 8(4):e62099. doi:10.1371/journal.pone.0062099
- IBM Corp. Released (2010) IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp

- Inaba R, Nishio T (2002) Phylogenetic analysis of Brassiceae based on the nucleotide sequences of the S-locus related gene, SLR1. *Theoretical and Applied Genetics* 105:1159-1165.
- Iñiguez-Luy FL, ML Federico (2011) The genetics of *Brassica napus*. *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*, eds Bancroft I, Schmidt R (Springer, Berlin), pp291-322.
- Isaacson T, Ohad I, Beyer P, Hirschberg J (2004) Analysis in vitro of the enzyme CRTISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants. *Plant Physiol* 136:4246-4255.
- Jansen R, Robinson D, Stolzenberg-Solomon R, Bamlet W, Andrade M, et al. (2013) Nutrients from fruit and vegetable consumption reduce the risk of pancreatic cancer. *J. Gastrointest. Cancer* 44:152–161.
- Kasai M, Koseki M, Goto K, Masuta Ch, Ishii Sh, et al. (2012) Coincident sequence-specific RNA degradation of linked transgenes in the plant genome. *Plant Mol Biol* 78:259–273.
- Kidwell KK, Osborn TC (1992) Simple plant DNA isolation procedure. In: Beckman J, Osborn TC, editors. *Plant genomes: methods for genetic and physical mapping*. Kluwer, The Netherlands, pp 1-13.
- Kim J, DellaPenna D (2006). Defining the primary route for lutein synthesis in plants: the role of *Arabidopsis* carotenoid beta-ring hydroxylase CYP97A3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 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.
- Kimber DS. McGregor DI (1995) The species and their origins, cultivation and world production. In: Kimber DS. McGregor DI. (eds) *Brassica oilseeds: production and utilization*. CABI Publishing, Wallingford, pp 1-9.
- Kirk J, Tilney R (1978) Proplastids, etioplasts, amyloplasts, chromoplasts and other plastids. In *The Plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*. S.T.Kirck & R.A. Tilney-Bassett (eds). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, Holand, pp. 217–239.
- Kong F, Li J, Tan X, Zhang L, Zhang Z, et al. (2009) A new time-saving transformation system for *Brassica napus*. *African Journal of Biotechnology* 8(11): 2497–2502.

- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H (2002) Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol* 5:33–36.
- Kunz C, Schöb H, Stam M, Kooter JM, Mens F (1996) Developmentally regulated silencing and reactivation of tobacco chitinase transgene expression. *Plant Journal* 10:437–450.
- Lee S (1996) Speedy Transformation Method: Agrobacterium mediated Cotyledonary Petiole Transformation of Brassica spp. Using Kanamycin Selection. Ph.D thesis, U of S., revised by Delwin Epp.
- Lemaire S, Guillon B, Le Marechal P, Keryer E, Miginiac-Maslow M, et al. (2004) New thioredoxin targets in the unicellular photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:7475-7480.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Li L, Paolillo DJ, Parthasarathy MV, Dimuzio EM, Garvin DF (2001) A novel gene mutation that confers abnormal patterns of beta-carotene accumulation in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *The Plant Journal* 26:59–67.
- Li L, Garvin DF (2003) Molecular mapping of Or, a gene inducing beta-carotene accumulation in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*). *Genome* 46:588–594.
- Li Li, Lu Sh, Cosman K, Earle E, Garvin D, et al. (2006) β -Carotene accumulation induced by the cauliflower Or gene is not due to an increased capacity of biosynthesis. *Phytochemistry* 67:1177–1184.
- Li F, Vallabhaneni R, Wurtzel E (2008a) *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 E (2008b) The maize *phytoene synthase* gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiol*.147:1334–1346.
- Li L, Van Eck J (2007) Metabolic engineering of carotenoid accumulation by creating a metabolic sink. *Transgenic Res.* 16:581–585.

- Li F, Tzfadia O, Wurtzel E (2009a) The phytoene synthase gene family in the grasses. *Plant Signaling & Behavior*. 4:208-211.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Li J, Tan X, Zhu F, Guo J (2010) A rapid and simple method for *Brassica napus* floral-dip transformation and selection of transgenic plantlets. *International Journal of Biology* 2(1):127–31.
- Lichtenthaler H (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Molecular Biology* 50:47-65.
- Lichtenthaler, HK, Buschmann, C (2001) Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In *current protocols in food analytical chemistry*, pp. F4.3.1–F4.3.8. Wiley, New York.
- Lindgren O, Stalberg K, Höglund A (2003) Seed-specific overexpression of an endogenous *Arabidopsis* phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll, and abscisic acid. *Plant Physiology* 132:779-785.
- Lindstrom J, Vodkin L, Harding R, Goeken R (1990) Expression of soybean lectin gene deletions in tobacco. *Developmental Genetics* 11(2):160-167.
- Liu H, Guo X, Naem M S, Liu D, Xu L, et al. (2011) Transgenic *Brassica napus* L. lines carrying a two gene construct demonstrate enhanced resistance against *Plutella xylostella* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 106:143–51.
- Longdou L, Wu J, Wang J, Duan H and Li R (2005) Expression of chitinase gene in transgenic rape plants. *TOM*. 167–72.
- Lopez A, Van Eck J, Conlin B, Paolillo D, O'Neill J, et al. (2008) Effect of the cauliflower Or transgene on carotenoid accumulation and chromoplast formation in transgenic potato tubers. *Journal of Experimental Botany* 59(2):213-23.
- Lysak M, Koch M, Pecinka A, Schubert I (2005). Chromosome triplication found across the tribe Brassiceae. *Genome Res.* 15: 516-525.
- Ma L, Dou H-L, Wu Y-Q, Huang Y-M, Huang Y-B, et al. (2012) Lutein and zeaxanthin intake and the risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr*, 107:350-359.

- Majewski P, Wołoszynska M, Janska H (2009) Developmentally early and late onset of Rps10 silencing in *Arabidopsis thaliana*: genetic and environmental regulation. *J Exp Bot* 60:1163–1178.
- Madaan T, Choudhary AN, Gyenwalee S, Thomas Sh, Mishra H, et al. (2017) Lutein, a versatile phyto-nutraceutical: An insight on pharmacology, therapeutic indications, challenges and recent advances in drug delivery. *PharmaNutrition* 5(2):64-75.
- Marjanac G, Karimi M, Naudts M, Beeckman T, Depicker A, et al. (2009) Gene silencing induced by hairpin or inverted repeated sense transgenes varies among promoters and cell types. *New Phytol* 184:851–864.
- Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, et al. (2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* 39: 225-229.
- Marchler-Bauer A, Zheng C, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer LY, et al. (2013) CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res* 41: 384-352.
- Maass D, Arango J, Wüst F, Beyer P, Welsch R (2009) Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS ONE* 4: e6373.
- Matus Z, Molnar P, Szabo L (1993) Main carotenoids in pressed seeds (*Cucurbitae semen*) of pumpkin (*Cucurbita pepo* convar. *pepo* var. *styriaca*). *ACTA Pharmaceutica Hungarica* 63:247–256.
- McGraw K, Hill G, Stradi R, Parker R (2001) The influence of carotenoid acquisition and utilization on the maintenance of species-typical plumage pigmentation in male American goldfinches (*Carduelis tristis*) and northern cardinals (*Cardinalis cardinalis*). *Physiological and Biochemical Zoology* 74:843–852.
- Meier S, Tzfadia O, Vallabhaneni R, Gehring C, Wurtzel E (2011) A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Systems Biology* 5:77.

- Meza TJ, Kamfjord D, Hakelien AM, Evans I, Godager LH, et al. (2001) The frequency of silencing in *Arabidopsis thaliana* varies highly between progeny of siblings and can be influenced by environmental factors. *Transgenic Res* 10:53–67.
- Misawa N, Nakagawa M, Kobayashi K, Yamano S, Izawa Y, et al. (1990) Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology* 172:6704-6712.
- Misawa N, Truesdale MR, Sandmann G, Fraser PD, Bird C, et al. (1994) Expression of a tomato cDNA coding for phytoene synthase in *Escherichia coli*, phytoene formation *in vivo* and *in vitro*, and functional analysis of the various truncated gene products. *Journal of Biochemistry* 116(5):980-5.
- Moghaieb R, El-Awady M, Mergawy R, Youssef S, El-Sharkawy A (2006) A reproducible protocol for regeneration and transformation in canola (*Brassica napus* L.). *African Journal of Biotechnology* 5(2):143–8.
- Moran NA, Jarvik T (2010) Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science* 328: 624–627.
- Moreno J, Carvajal R, Stange, C (2009) Evaluation of the functionality of *Daucus carota* phytoene synthase and lycopene β -cyclase genes by means of heterologous complementation. IV Reunión de Biología Vegetal, 14 al 16 de Octubre, La Serena, Chile. p.77.
- Müller-Esterl W, Brandt U; Centelles J (2008) *Bioquímica: fundamentos para medicina y ciencias de la vida*. Capítulo 6: Proteínas bajo escrutinio. Editorial Reverté, Barcelona. Pág. 107,108.
- Muskens M, Vissers A, Mol J, Kooter J (2000) Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *Plant Molecular Biology* 43:243–260.
- Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Ann. Rev. Plant Biol.* 56:165–185.
- Naqvi S, Farré G, Sanahuja G, Capell T, Zhu Ch, et al. (2009) When more is better: multigene engineering in plants. *Trends in Plant Science* 48-56.
- Naqvi S, Zhua Ch, Farre G, Ramessar K, Bassie L, et al. (2009) Transgenic multivitamin corn: biofortification of corn endosperm with three vitamins representing three distinct

- metabolic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:7762–7767.
- Niklitschek M, Alcaíno J, Barahona S, Sepúlveda D, Lozano C, et al. (2008) Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol Res* 41: 93-108.
- Niyogi KK, Bjorkman O, Grossman AR (1997) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 14162-14167.
- Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Vaquero M (2003) Lutein, but not α -tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-y double-blind, placebo-controlled pilot study. *Nutrition* 19:21–24.
- O'Neill CM, Bancroft I (2000) Comparative physical mapping of segments of the genome of *Brassica oleracea* var. *albogalabra* that are homeologous to sequenced regions of chromosome 4 and 5 of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 23(2):233–243.
- Osborn T, Pires C, Birchler J, Auger D, Chen J, et al. (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *TRENDS in Genetics* 19(3):141-147.
- Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, Howells RM, Kennedy MJ, et al. (2005) Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nat Biotechnol* 23: 482-487.
- Palmer JD, Shields CR, Cohen DB, Orton TJ (1983) Chloroplast DNA evolution and the origin of amphidiploid *Brassica* species. *Theoretical and Applied Genetics* 65:181–189.
- Pan Y, Michael T, Hudson M, Kay S, Chory J, et al. (2009) Cytochrome P450 monooxygenases as reporters for circadian-regulated pathways. *Plant Physiology* 150:858-878.
- Pandit J, Danley DE, Schulte GK, Mazzalupo S, Pauly TA, et al. (2000) Crystal structure of human squalene synthase. A key enzyme in cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* 275: 30610–30617.
- Park H, Kreunen SS, Cuttriss AJ, DellaPenna D, Pogson BJ (2002) Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. *The Plant Cell Online* 14 (2):321-332.

- Parkin I, Gulden S, Sharpe A, Lukens L, Trick M, et al. (2005). Segmental structure of the *B. napus* genome based on comparative analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 171:765-781.
- Peter G, Thornber J (1991) Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 16745-16754.
- Pichersky E (2008) Raging hormones in plants. *Nat. Chem. Biol.* 4:584–586.
- Pinzino C, Nanni B, Zandomenighi M (1999) Aging, free radicals, and antioxidants in wheat seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1333–1339.
- Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, et al. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* 26:1781-1802.
- Phillips M, Leon P, Boronat A, Rodríguez-Concepción M (2008) The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends in Plant Science* 13:619–623.
- Pogson BJ, Niyogi KK, Bjorkman O, DellaPenna D (1998) Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 13324-13329.
- Pons, Alquézar, Rodríguez, Martorell, Genovés, et al. (2014) Metabolic engineering of β -carotene in orange fruit increases its *in vivo* antioxidant properties. *Plant Biotechnology Journal* 12:17–27.
- Prakash S, Hinata K (1980) Taxonomy, cytogenetics and origin of crop Brassica, a review. *Opera Bot* 55:1-57.
- Qin S, Zhou H (2007) meta-PPISP: a meta web server for protein-protein interaction site prediction. *Bioinformatics* 23:3386-3387.
- Ralley L, Enfissi E, Misawa N, Schuch W, Bramley P, Fraser P (2004) Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. *The Plant journal: for cell and molecular biology.* 39(4):477-486.
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5:725-738.
- Ramsey J, Schemske, D (1998) Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 29, 467–501

- Rani T, Yadav R, Yadav N, Rani A, Singh D (2013) Genetic transformation in oilseed brassicas - A review. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 83 (4):367–73.
- Rao A, Rao L (2007) Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* 55:207–216.
- Rasmussen R (2001) Quantification on the LightCycler instrument. In: Meurer S, Wittwer C, Nakagawara K, editors. *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications*. Heidelberg: Springer-Verlag Press. pp. 21-34.
- Ravanello M, Ke D, Alvarez J, Huang B, Shewmaker C (2003) Coordinate expression of multiple bacterial carotenoid genes in canola leading to altered carotenoid production. *Metabolic Engineering* 5(4):255–263.
- Rensing S (2014) Gene duplication as a driver of plant morphogenetic evolution. *Current Opinion in Plant Biology* 17:43-48.
- Rodríguez-Concepción M, Boronat A (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* 130:1079–1089.
- Rodríguez-Villalón A, Gas E, Rodríguez-Concepción M (2009) Phytoene activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedling. *The Plant Journal* 60:424-435.
- Rodríguez-Concepción M (2010) Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 504:118–122.
- Ruiz-Sola M. A, Rodriguez-Concepcion M (2012) Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. *Arabidopsis Book* 10:e0158.
- Saeed H, Vodkin L, Strömvik M (2008) Promoters of the soybean seed lectin homologues Le2 and Le3 regulate gene expression in vegetative tissues in *Arabidopsis*. *Plant Science* 175:868–876.
- Sáez P, Bravo L, Latsague M, Toneatti M, Sánchez-Olate M, et al. (2013) Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. *Plant Science* 201-202:12-24.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook J, Russell D ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 999 pp.
- Sandmann G, Misawa N (1992)

- New functional assignment of the carotenogenic genes *crtB* and *crtE* with constructs of these genes from *Erwinia* species. *FEMS microbiology letters* 90:253-258.
- Santana A, Pereira P, Marques M, Paese K, Stanisçuaski S, et al. (2017) Lutein-loaded lipid-core nanocapsules: Physicochemical characterization and stability evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 522(5):477-484.
- Schledz M, al-Babili S, von Lintig J, Haubruck H, Rabbani S, et al. (1996) Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering. *The Plant Journal* 10(5): 781-92.
- Schwartz S, Tan B, McCarty D, Welch W, Zeevaart J (2003) Substrate specificity and kinetics for VP14, a carotenoid cleavage dioxygenase in the ABA biosynthetic pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1619:9–14.
- Seo M, Koshiba T (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 7:41–48.
- Shahidi F (1990) Rapessed and canola: global production and distribution. In: Sahidi F (ed). *Canola and rapeseed: production, chemistry and processing technology*. Van Nostrand Reinhold, NY. pp 3-13.
- Shewmaker C, Sheehy J, Daley M, Colburn S, Ke D (1999) Seed overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *The Plant Journal* 20(4):401-412.
- Shumskaya M, Bradbury LMT, Monaco RR, Wurtzel ET (2012) Plastid Localization of the Key Carotenoid Enzyme Phytoene Synthase Is Altered by Isozyme, Allelic Variation, and Activity. *The Plant Cell* 24:3725–3741.
- Shumskaya M, Wurtzel E (2013) The carotenoid biosynthesis pathway. *Thinking in all dimensions. Plant Science* 208:58–63.
- Sippl MJ (1993) Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins. *Proteins* 17:355-362.
- Sun Z, Gantt F, Cunningham J (1996) Cloning and functional analysis of the beta-carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.* 271:24349–24352.
- Sun L, Sun S (2009) Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. *Biotechnology Advances* 27:1015–1022.

- Szittyta G, Silhavy D, Molnár A, Havelda Z, Lovas A, et al. (2003) Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defense by the control of siRNA generation. *EMBO J* 22:633–640.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599.
- Tian L, Magallanes-Lundback M, Musetti V, DellaPenna D (2003) Functional analysis of beta- and epsilon-ring carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 5:1320–1332.
- Thompson A, Jackson A, Parker R, Morpeth D, Burbidge A, et al. (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 Molecular Biology* 42:833-845.
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Rodríguez-Concepción M (2010) Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *PNAS* 107(25):11626-11631.
- Town CD, Cheung F, Maiti R, Crabtree J, Haas BJ, et al. (2006) Comparative genomics of *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana* reveal gene loss, fragmentation, and dispersal after polyploidy. *Plant Cell* 18(6):1348–1359.
- U N (1935) Genome-analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany* 7:389-452.
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, et al. (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455:195–200.
- Vodkin L, Rhodes P, Goldberg R (1983) cA lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. *Cell* 34(3):1023-1031.
- von Lintig J, Welsch R, Bonk M, Giuliano G, Batschauer A, et al. (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* seedlings. *The Plant Journal* 12:625–634.
- Wang J, Chen Z, Du J, Sun Y, Liang A (2005) Novel insect resistance in *Brassica napus* developed by transformation of chitinase and scorpion toxin genes. *Plant Cell Reports* 24: 549–55.

- Wells R, Trick M, Soumpourou E, Clissold L, Morgan C, et al. (2014) The control of seed oil polyunsaturate content in the polyploid crop species *Brassica napus*. *Molecular breeding: new strategies in plant improvement* 33:349–362.
- Welsch R, Beyer P, Hugueney P, Kleinig H, von Lintig J (2000) Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* 211:846-854.
- Welsch R, Medina J, Giuliano G, Beyer P, von Lintig J (2003) Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216:523-534.
- Welsch R, Wüst F, Bär C, Al-Babili 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 Physiology* 147:367–380.
- Welsch R, Arango J, Bar C, Salazar B, Al-Babili S, et al. (2010) Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene. *The Plant Cell* 22:3348-3356.
- WHO (2009) Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005. WHO Global Database on Vitamin A Deficiency. Geneva, World Health Organization.
- Wiederstein M, Sippl MJ (2007) ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 35:407-410.
- Woitsch S, Römer S (2003) Expression of xanthophyll biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation. *Plant Physiology* 132:1508-1517.
- Xiong Z, Gaeta RT, Pires JC (2011) Homoeologous shuffling and chromosome compensation maintain genome balance in resynthesized allopolyploid *Brassica napus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:7908–7913.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2005) Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress responsive promoters. *Trends in Plant Science* 10:88–94.
- Ye XD, Al-Babili S, Kloti A, Zhang J, Lucca P, et al.(2000) Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287:303–5.

- Yu B, Lydiate D, Young L, Schäfer U, Hannoufa A (2008) Enhancing the carotenoid content of *Brassica napus* seeds by down regulating lycopene epsilon cyclase. *Transgenic Res.* 17:573–585.
- Yu B, Gruber M, Khachatourians G, Hegedus D, Hannoufa A (2010) Gene expression profiling of developing *Brassica napus* seed in relation to changes in major storage compounds. *Plant Science* 178:381–389.
- Yang TJ, Kim JS, Kwon SJ, Lim KB, Choi BS, et al. (2006) Sequence-level analysis of the diploidization process in the triplicated FLOWERING LOCUS C region of *Brassica rapa*. *Plant Cell* 18: 1339-1347.
- Zeevaart J, Creelman R (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39:439–473.
- Zhang W, Ruan J, Ho T, You Y, Yu T, et al. (2005) *Cis*-regulatory element based targeted gene finding: genome-wide identification of abscisic acid- and abiotic stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* 21:3074–3081.
- Zou Z, Xu X, Huang Y, Xiao X, Ma L, et al. (2011) High serum level of lutein may be protective against early atherosclerosis: the Beijing atherosclerosis study *Atherosclerosis* 219:789–793.

ANEXO

1. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Oligonucleótidos usados en este estudio.

Nombre	5'-secuencia-3'
Clonación CDS BnaX.PSY	
BnaA.PSY.d-F1	AGAGGAGTTCTTCTCTCCTTCTTC
BnaA.PSY.d-R1	CGGTTGATAGTCTTGCTTCTCTCAT
BnaC.PSY.f-F1	CCCAATGAACAATCCTGGGTAA
BnaA.PSY.c-F1	CTTATGCTATTTCACTTCTTGCC
BnaC.PSY.e-F1	TTAATCCATTTCAGGAAGGCC
BnaC.PSY.e-R1	CAACCCTAAGCTTTGCCTTTAATC
Bna.PSY.15F	GCTCGAGTATGTCTTCTGTAGCAGT
Bna.PSY.8R	TTCGACCCTAAGCTTTTCCT
RACE 5'	
BnaA.PSY.NR.b	CAGAAGAAGAGGAAGAAGTCCATGTTT
BnaA.PSY.GR.b	GCTACTACGCTCGAAGACACCACACTC
BnaA.PSY.NR.c	GTTTATTGGGTCTGGATTTGGAGAAGGA
BnaA.PSY.GR.c	CTGCGGGCTCTCATAACAGAAGAACTC
BnaA.PSY.NR.d	CTAGAACCCTTACCAACCCAGAATTGG
BnaC.PSY.NR.e	TGCAGGATGTGCTACTAAGCTTGAAGAG
BnaC.PSY.GR.e	TCCTGTGGTTTCTTACATCGTCAAGAA
BnaC.PSY.NR.f	GGCTTCTCAGATCATCAAGGTCCCTAA
BnaC.PSY.GR.f	CCCAACAAACTCAAACCTCCAGTAGTAG
BnaC.PSY.GR.G	GGGTTATCTCTCCTGCAGCAGGACTT
RACE 3'	
BnaA.PSY.GF.b	CAAGCTGGTCTCTCAGATGAAGACATC
BnaA.PSY.NF.b	GCTAGCAGATGGCCGGTGTGGGCATCT
BnaA.PSY.GF.c	GCTCAAGCTGGTCTCTCAGATGAAGAT
BnaA.PSY.NF.c	GGCCAGTATGGGCATCGCTCCTATTA
BnaC.PSY.NF.f	CGATGTTCAGCCATTTAGAGACATGGTA
BnaC.PSY.GF.G	CCGTGGCCGTCCTTTCGATATGCTTGA
BnaC.PSY.NF.G	GACGCTGCTCTAGCTGATACAGTTGCT
CDS BnaX.PSY sin péptido señal para clonación en pETblue-1	
BnaC.PSY.ayb-CHF	ATGGCAAGTCATGCAGGAGAGATAGC
BnaC.PSY.ayb-CHR	TTAAGTTGTTCTCTTGAACCTGG
BnaA.PSY.c-CHF	ATGTCAAGCTTAGTCGTAAATCCTG
BnaA.PSY.c-CHR	CTCTTAACCTGAAACCTTTAGTACTG
BnaA.PSY.d-CHF	ATGTCAAGCTTAGTAGCAAGTCCTGCT

BnaA.PSY.d-CHR	TCATCTTGAACCTGAAGCCTTTAG
BnaC.PSY.e-CHF	ATGTCAAGCTTAGTAGCACATCCTGC
BnaC.PSY.e-CHR	CTCTTAACCTGAAACCTTTACTACTG
BnaC.PSY.f-CHF	ATGTCAAGTTTAGTAGCAAGTCCTGCT
BnaC.PSY.f-CHR	TCATCTTGAACCTGAAGCCTTTAG
RT-PCR	
PSYaSpecF	CAAAATTCTCTTCCAAGAGGAGGAGAAAAG
PSYaRev	AGCTGTTTGTAAACCAAAGCCGCTTGT
PSYbSpecF	AACAAAACAAAAGTTGAGATTTTTCCATT
BnaPSY.NRb	CAGAAGAAGAGGAAGAAGTCCATGTT
PSYeSpecF3	TTGGAGTTCTTCTGTTATGAGACGCCG
PSYeRev	CGCCATGGGAGTTATATGTGATGC
PSYdSpecF	TCTCTAGTGAGCTGCAGAAGGGGAAGA
PSYdRev	CTAACGCCATGGGAGTTATGTGTG
PSYeSpecF2	GAGTTCTTCTTCTTCTGTAATGAGCTTT
PSYeRev2	CCATGGGAGTTATATGTGATGCATTC
PSYfSpecF	CTTCTGTAATGAGCTGCAGAAGAAGATTAA
PSYfRev	CTTCCCATCTATCTAACGCCATGG
Bna.18SF	CAGACTGTGAAACTGCGAATGG
Bna.18SR	GCTAATGTATCCAGAGCGTAGGCT
Bna.ActinF	GAAGTGAATGGTGAAGGCTGGGTT
Bna.ActinR	TCTCTCAGCTCCGATGGTGTGACT
KanF	CCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTA
KanR	TCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGC
Generación vector de expresión pCambia2300-Lec::BnaC.PSYa-6XHis	
BnaC.PSY.a.NotIF	GCGGCCGCATGTCTTCTGTAGCAGTGTATGG
BnaC.PSY.a-NotI-6xHisTagR	GCGGCCGCCTAGTGGTGTATGATGAGTTGTTCCCTTGAAC
Test segregación	
HisTag2R	CTAGTGGTGTGGTGTATGATG
SSCP3F	AGTGTTTACAACGCTGCCTT
RT-PCR en tiempo real	
β -TUBULIN-F	GTCTGTGACATTGCACCAAAG
β -TUBULIN-R	GTCCATGCCTTCTCCTGTGT
Bn.PSY.all-F	GGAACTTTGCTTATGACACC
Bn.PSY.all-R	TGCTTCCCATCTATCTAACG
BnaC.PSY.aRT-F2	CAGGAGAATATTGGACGAGA
HisTag2R	CTAGTGGTGTGGTGTATGATG

BnaA.PSY.b TCAGCTTACCAACATACTCAGAGACGTTGGCGAAGATGCGAGAAGAGGAAAGAGTTTATCTACCGCAAGATGAGTTAGCTCAAGCTGGTCTCTCAGATGAA 972
BnaA.PSY.c TCAGCTTACCAACATACTCAGAGACGTTGGTGAAGATGCAAGAAGAGGAAAGAGTTTATCTACCAAGATGAGTTAGCTCAAGCTGGTCTCTCAGATGAA 960
BnaA.PSY.d TCAGCTTACCAACATACTCAGAGACGTTGGCGAAGATGCGAGAAGAGGAAAGGTTTATCTGCCCCAAGATGAAGCTAGCTCAGGCTGGTCTCTCAGATGAA 966
BnaC.PSY.e TCAGCTTACCAACATACTCAGGAGCGTTGGTGAAGATGCAAGAAGAGGAAAGAGTTTATCTACCAAGATGAGTTAGCTCAGGCTGGTCTCTCCGATGAA 981
BnaC.PSY.f TCAGCTTACCAACATACTCAGAGACGTTGGCGAAGATGCGAGAAGAGGAAAGGTTTATCTGCCAAGATGAGCTAGCTCAGGCTGGTCTCTCAGATGAA 960
AtPSY TCAGCTTACCAACATACTCAGAGACGTTAGCGAAGATGCGAGAAGAGGAAAGGTTTATCTGCCTCAGGATGAATTGGCTCAGGCTGGTCTCTCAGATGAA 969

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
BnaC.PSY.a GACATATTCGCGGAAAAGTCACTGATAAATGGAGAACTTCATGAAAATGCAGCTTAAGCGAGCAAGAATGTTCTTTGACGAAGCTGAGAAAAGGCTATTA 1075
BnaA.PSY.b GACATATTCGCGGAAAAGTCACTGATAAATGGAGAACTTCATGAAAATGCAGCTTAAGCGAGCAAGAATGTTCTTTGACGAAGCTGAGAAAAGGCTATTA 1072
BnaA.PSY.c GATATATTTGCTGGAAAAGTCACTGATAAATGGAGAACTTCATGAGAATGCAGCTTAAGAGAGCAAGAATGTTCTTTGACGAAGCTGAGAAAAGGCTATTA 1060
BnaA.PSY.d GACATATTCGCTGGAAAAGTCACTGATAAATGGAGAACTTCATGAAAATGCAGCTTAAGCGAGCAAGAATGTTCTTTGATGAAGCTGAGAAAAGGCTATTA 1066
BnaC.PSY.e GACATATTCGCTGGAAAAGTCACTGATAAATGGAGAACTTCATGAGAATGCAGCTTAAGAGAGCAAGAATGTTCTTTGACGAAGCTGAGAAAAGGCTATTA 1081
BnaC.PSY.f GACATATTCGCTGGAAAAGTCACTGATAAATGGAGAACTTCATGAAAATGCAGCTTAAGCGAGCAAGAATGTTCTTTGATGAAGCTGAGAAAAGGCTATTA 1060
AtPSY GACATATTCGCGGAAAAGTAACTGATAAATGGAGAACTTCATGAAAATGCAGCTTAAGCGAGCAAGAATGTTCTTTGACGAAGCTGAGAAAAGGCTATTA 1069

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
BnaC.PSY.a CTGAGCTGGACGCTGCTAGCAGATGGCCGGTATGGGCGTCGCCTTATTTGACAGGAGAATATGGACGAGATTGAAGCGAATGATTACAACTTTAC 1175
BnaA.PSY.b CAGAGCTCGACGCTGCTAGCAGATGGCCGGTATGGGCGTCTCTCCTATTTGACAGGAGAATATGGACGAGATTGAAGCGAATGATTACAACTTTAC 1172
BnaA.PSY.c CCGAGCTTGCACGCTGCTAGCAGATGGCCGATATGGGCGTCTCTCCTATTTGACAGGAGAATATAGACGAGATTGAAGCGAATGATTACAACTTTAC 1160
BnaA.PSY.d CTGAGCTAGACCGAGCTAGCAGATGGCCGGTATGGGCGTCTCTCCTATTTGACAGGAGAATATGGACGAGATTGAAGCGAATGATTACAACTTTAC 1166
BnaC.PSY.e CCGAGCTTGCACGCTGCTAGCAGATGGCCGATATGGGCGTCTCTCCTATTTGACAGGAGAATATGGACGAGATTGAAGCGAATGATTACAACTTTAC 1181
BnaC.PSY.f CTGAGCTTGCACGCTAGCAGATGGCCGGTATGGGCGTCTCTCCTATTTGACAGGAGAATATGGACGAGATTGAAGCGAATGATTACAACTTTAC 1160
AtPSY CCGAGCTCAGTCCGCTAGCAGATGGCCGCTATGGGCTTCTGCTATTTGACAGGAGAATATGGACGAGATTGAAGCGAATGATTACAACTTTAC 1169

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
BnaC.PSY.a GAAGAGAGCTTATGTTGGGAAAAGCCAAGAAAATTCAGCTCTGCCATTGGCTTATGCTAAATCAGTACTAAAGACTCCAAGTTCAGAGGAAACCACTTAA 1275
BnaA.PSY.b GAAGAGAGCTTATGTTGGGAAAAGCCAAGAAAATTCAGCTCTGCCATTGGCTTATGCTAAATCAGTACTAAAGACTCCAAGTTCAGAGGAAACCACTTAA 1272
BnaA.PSY.c AAAGAGAGCTTATGTTGGGAAAAGTGAAGAAAATTCAGCTCTGCCATTGGCTTATGCTAAATCAGTACTAAAGACTCCAAGTTCAGAGTAA----- 1245
BnaA.PSY.d AAAGAGAGCTTATGTTGGGAAAAGCCAAGAAAATTCAGCTCTGCCATTAGCTTATGCTAAATCAATACTAAAGGCTTCAAGTTCAAGATGA----- 1257
BnaC.PSY.e CAAGAGAGCTTATGTTGGGAAAAGTGAAGAAAATTCAGCTCTGCCATTAGCTTATGCTAAATCAGTACTAAAGGCTTCAAGTTAA----- 1266
BnaC.PSY.f GAAGAGAGCTTATGTTGGGAAAAGCCAAGAAAATTCAGCTCTGCCATTGGCTTATGCTAAATCAATACTAAAGGCTTCAAGTTCAAGATGA----- 1251
AtPSY TAAGAGAGCTTATGTTGGGAAAAGTGAAGAAAATTCAGCTCTGCCATTGGCTTATGCTAAATCAGTACTAAAGACTTCAAGTTCAAGATTCGATATGA 1269

Figura S1. Alineamiento múltiple secuencias nucleotídicas *BnaX.PSY*

Tabla S2. Ka/Ks

Nodo N°	Ka/Ks Rama1	Ka Branch1	Ks Rama1	Ka/Ks Rama2	Ka Rama2	Ks Rama2
1	0,1640	0,0083	0,0506	0,2182	0,0101	0,0461
2	0,1655	0,0123	0,0744	0,1214	0,0099	0,0813
3	0,2863	0,0249	0,0869	0,2230	0,0122	0,0548
4	0,0091	0,0005	0,0538	0,0773	0,0044	0,0574
5	0,1842	0,0131	0,0710	0,1925	0,0125	0,0650

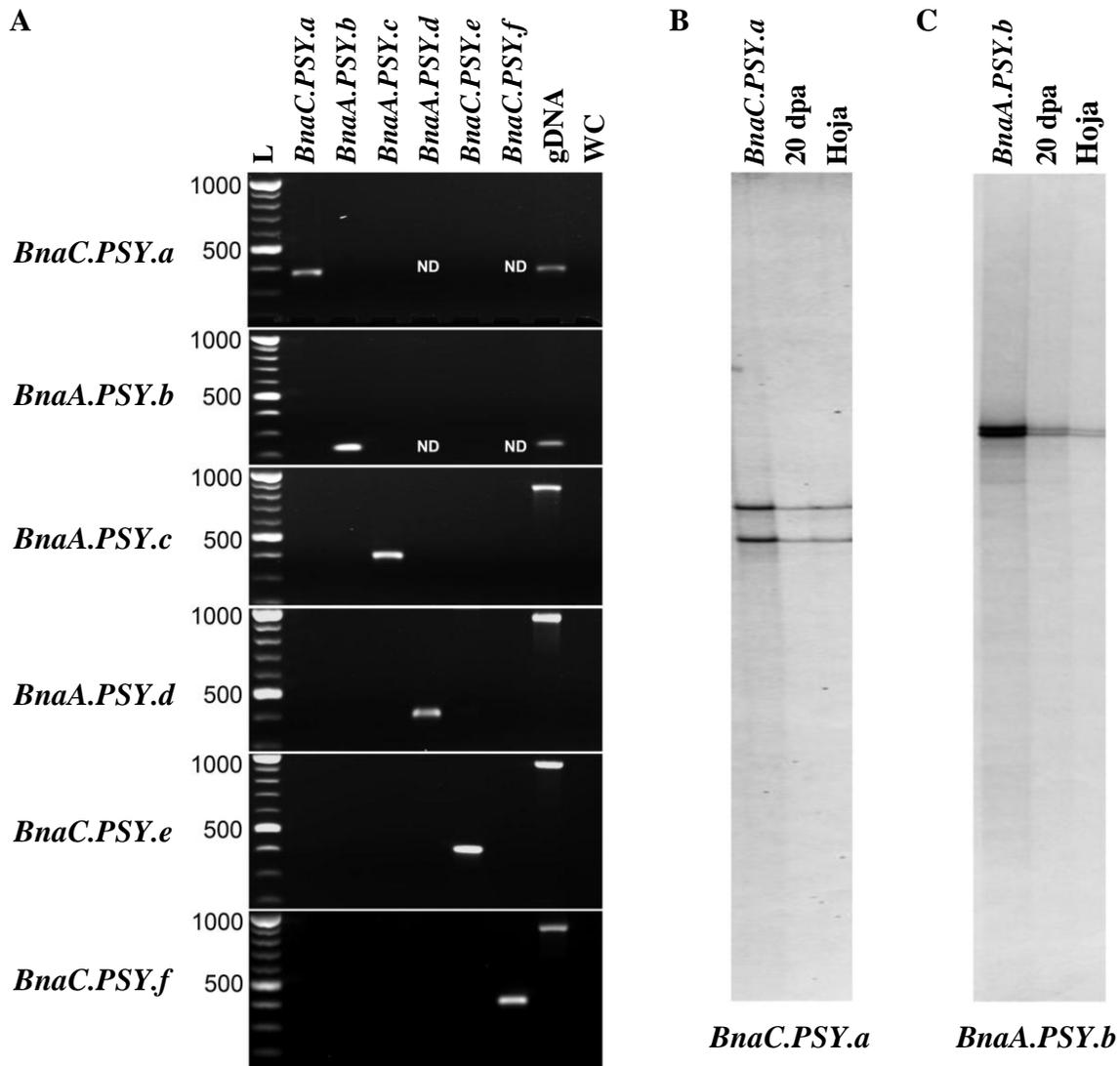
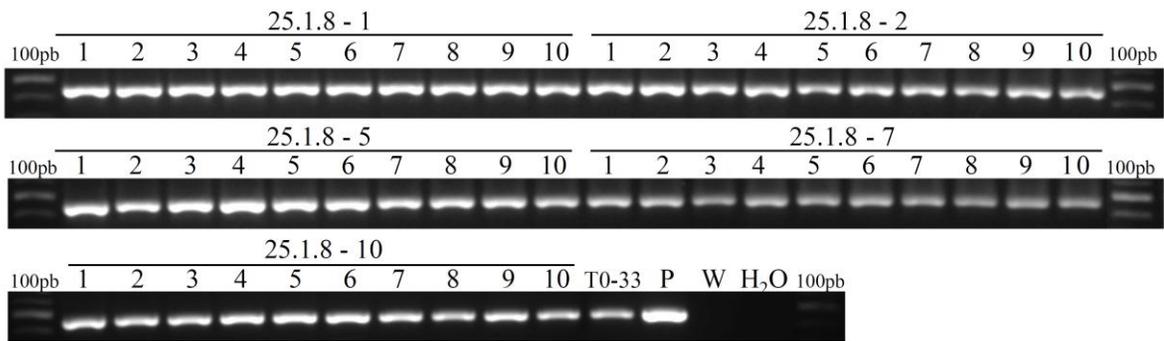


Figura S2. Reacciones de PCR control Homólogo específico. (A) La especificidad de los partidores fue evaluada por PCR usando plásmidos conteniendo cada uno de los seis genes *PSY* de *B. napus*. Los partidores BnaC.PSY.a y BnaA.PSY.b no pudieron ser probados contra BnaA.PSY.d y BnaC.PSY.f (clones no incluyen las regiones 5' UTRs) (B) Análisis de SSCP de la reacción de RT-PCR de *BnaC.PSY.a* muestra que sólo dos hebras muestran el mismo patrón que el plásmido conteniendo *BnaC.PSY.a*, confirmando la especificidad de la pareja de partidores (C) Análisis de SSCP de la reacción de RT-PCR de *BnaA.PSY.b* muestra que sólo dos hebras muestran el mismo patrón que el plásmido conteniendo *BnaC.PSY.b*, confirmando la especificidad de la pareja de partidores. L: 100 bp ladder; BnaX.PSY.a-f: Controles ADN plásmido; gDNA: control ADN genómico de *B. napus*; WC: control agua; ND. No determinado; 20 dpa: cDNA de semilla 20 días post antesis; Hoja: cDNA de hoja.

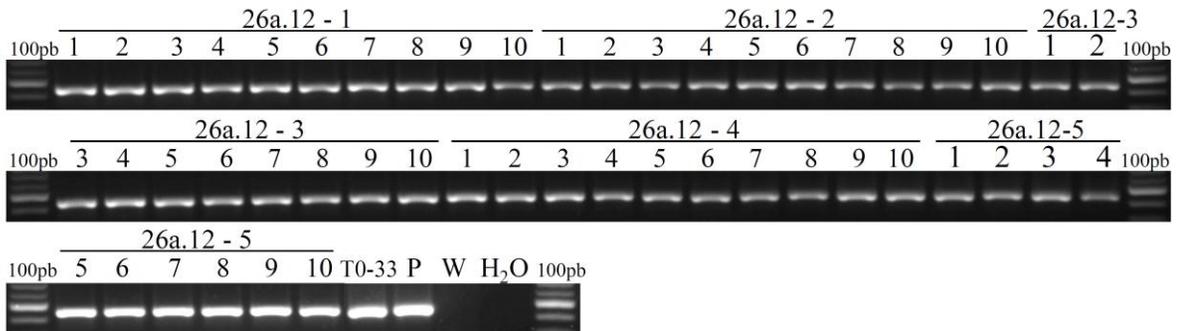
A



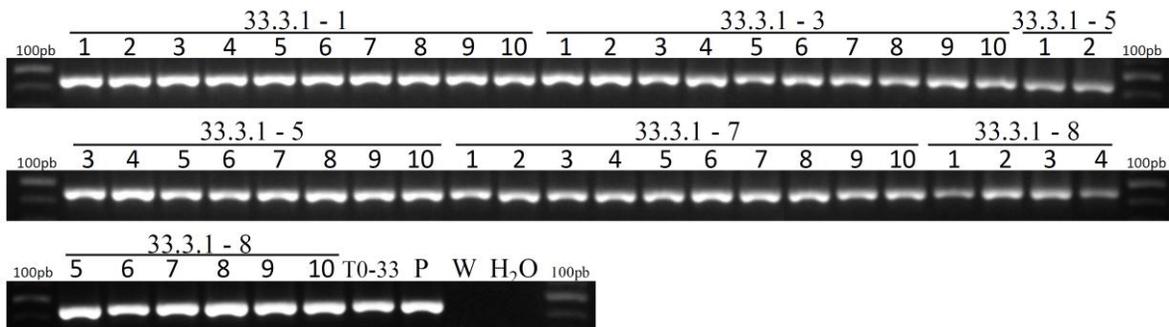
B



C



D



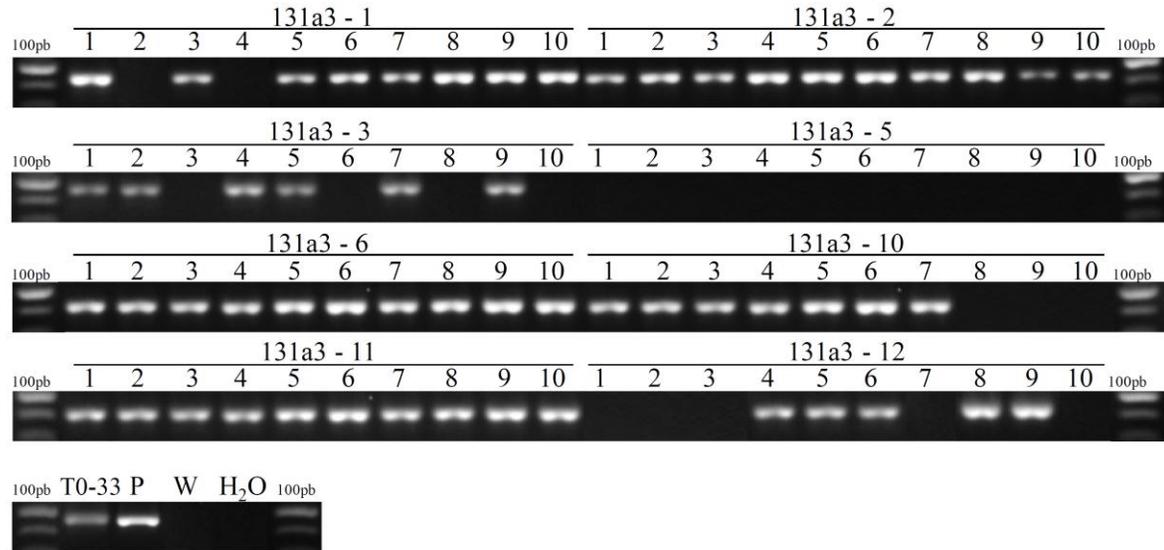
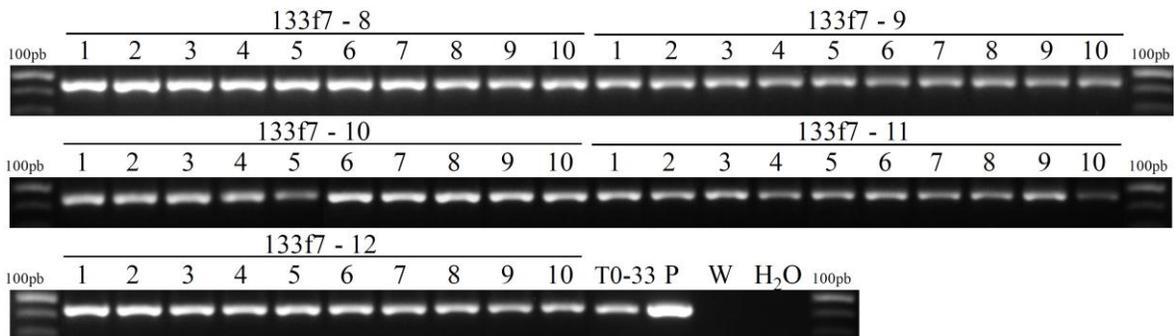
E**F**

Figura S3. Test de segregación por PCR. Evaluación de la segregación por PCR de la generación T₃ de los seis eventos transgénicos obtenidos de la transformación con el vector pCambia2300-Lec::*BnaC.PSYa-6XHis* (A) BnPSY.24.1.7 (B) BnPSY.25.1.8 (C) BnPSY.26a12 (D) BnPSY.33.3.1 (E) BnPSY.131a3-11 (F) BnPSY.133f7. T0 (24, 25, 26, 33, 131, 133): gDNA de cada evento transgénico (T0) usada como control positivo; P: plásmido, pCambia2300-Lec::*BnaC.PSYa-6XHis*, control positivo; W: gDNA de *B. napus* cv. Westar, control negativo; H₂O: control negativo.

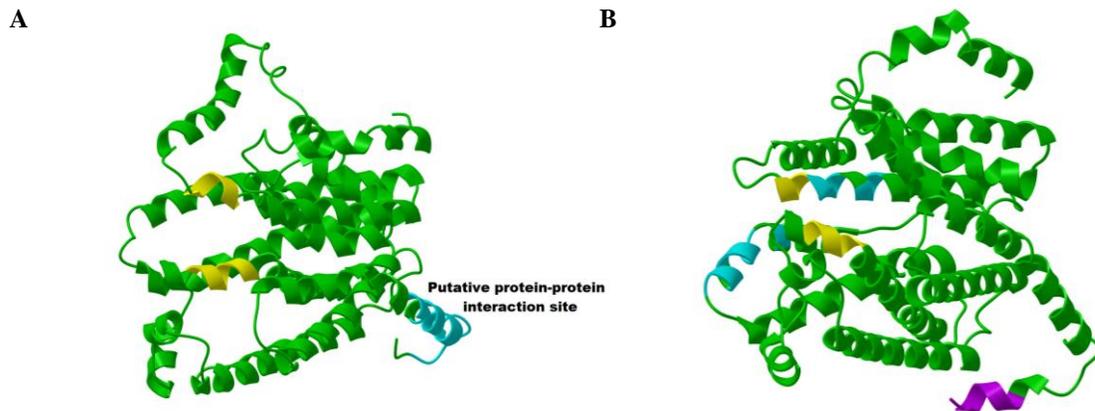


Figura S4. Predicción de la estructura tridimensional de BnaC.PSY.a endógena y transgénica (A) Estructura modelada de la proteína BnaC.PSY.a mostrando el sitio activo y el putativo sitio de interacción proteína-proteína (B) Estructura modelada de la proteína BnaC.PSY.a-6XHis mostrando el sitio activo y el putativo sitio de interacción proteína-proteína y el 6XHis. En celeste se destaca el putativo sitio de interacción proteína-proteína. Destacado en morado 6XHis tag. Putativo sitio activo (DXXXD) en amarillo.

2. LISTA DE ABREVIACIONES

ANOVA	Análisis de Varianza
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Bna	<i>Brassica napus</i>
<i>BnaX.PSY</i>	Homólogos <i>PSY</i> de <i>B. napus</i>
Bol	<i>Brassica oleracea</i>
Bra	<i>Brassica rapa</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
CTAB	Bromuro de Cetiltrimetilammonio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAseI	Ácido Desoxirribonucleasa I
dpa	días post antesis
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
g	gramo
gDNA	DNA genómico
GSP	partidor gen-específico (gene specific primer)
h	hora
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
LB	Luria-Bertani
mg	miligramo
MTM	millones de toneladas métricas
Min	minuto

mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
NaCl	cloruro de sodio
NCBI	Centro Nacional de Bioinformática (National Center of Bioinformatics)
nm	nanómetro
OD	densidad óptica (optical density)
Oligo (dT)	oligo desoxitimina
pb	pares de bases (base pairs)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PF	peso fresco
PS	peso seco
PSY	Fitoeno Sintasa
p/v	peso/volumen
RACE	Amplificación Rápida de Extremos de cDNA
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAsa	Ácido Ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa
SDS	sodio dodecil sulfato
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
u	unidad
UTR	región no traducida
V	volts

v/v	volumen/volumen
μm	micrómetro
μg	microgramo
μM	micromolar
μl	microlitro
$^{\circ}\text{C}$	grados Celsius