

## Artículo científico

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

### Metabolic engineering of carotenoid content in *Brassica napus* L. through seed-specific overexpression of an endogenous *PSY* gene

A. López Emparán<sup>1,2</sup>; H. Gajardo<sup>2</sup>; C. R. Stange<sup>3</sup>; M. L. Federico<sup>2\*#</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca, 2 Norte 685, Talca, Chile.

<sup>2</sup> Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola, Las Heras 350, Temuco, Chile. \*E-mail: mfederico@uspt.edu.ar

<sup>3</sup> Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras 3425, Casilla 653, Ñuñoa, Santiago, Chile.

#Filiación actual: Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica para la Competitividad Territorial, Universidad de San Pablo-Tucumán, Tucumán, Argentina.

#### Resumen

En plantas, el primer paso en la biosíntesis de los carotenoides es catalizado por la enzima fitoeno sintetasa (PSY). PSY cataliza la condensación de dos moléculas de geranyl-geranyl difosfato para producir fitoeno sintasa, un carotenoide incoloro. La sobreexpresión de genes *PSY* bacterianos (*CrtB*) y vegetales han aumentado el contenido de carotenoides en varias especies de plantas. En muchos casos, la elección del transgén ha demostrado ser crucial para alcanzar niveles más altos de carotenoides en plantas transgénicas. En colza, la sobreexpresión de *CrtB* aumentó los niveles de carotenoides en semilla 50 veces pero la sobreexpresión de un *PSY* de origen vegetal no ha sido reportada. De esta manera, el objetivo de este estudio fue sobreexpresar en semilla uno de los seis genes *PSY* endógenos presentes en este cultivo para lograr un mayor incremento en el contenido de carotenoides. Usando *Agrobacterium tumefaciens*, *Brassica napus* cv. Westar fue transformado con un vector binario que contiene la región codificante del gen BnaC.PSYa bajo el control del promotor de *Lectina* de soja (pCambia2300-Lec::BnaC.PSYa-6XHys). Seis eventos transgénicos fértiles fueron confirmados por análisis de PCR. La expresión del transgen fue evaluada por RT-PCR convencional y cuantitativa en tiempo real en semillas T3 a 30 y 60 días post antesis (dpa). Todos los eventos sobreexpresaron BnaC.PSYa-6XHys y no se detectó silenciamiento de los miembros de la familia *PSY*. Sin embargo, la cuantificación por HPLC reveló una leve modificación (2X) en el contenido de carotenoides. Estrategias futuras para maximizar el contenido de carotenoides en semillas de colza son discutidas.

**Palabras clave:** Biofortificación; Colza; Fitoeno sintasa; Luteína.

#### Abstract

In plants, the first committed step of the carotenoid biosynthetic pathway is catalyzed by the enzyme phytoene synthase (PSY). PSY catalyzes the condensation of two molecules of geranyl-geranyl diphosphate to produce phytoene, a colorless carotenoid. Overexpression of bacterial (*CrtB*) and plant *PSY* genes have increased seed carotenoid content in several plant species. In many instances, the choice of transgene has proven crucial in achieving higher carotenoid levels in transgenic plants. In rapeseed, overexpression of *CrtB* increased seed carotenoid levels 50 fold but the overexpression of a plant or endogenous *PSY* has not been reported to date. In this study, the aim was to further increase seed carotenoid content by over-expressing one of the six endogenous *PSY* genes present in this crop. Using an *Agrobacterium*-mediated transformation, we introduced a binary vector containing BnaC.PSYa coding region under the control of the soybean lectin promoter (pCambia2300-Lec:: BnaC.PSYa-6XHys) into *Brassica napus* cv. Westar. Six fertile transgenic events were recovered and confirmed by PCR analysis. Transgene expression was followed by conventional and quantitative real time RT-PCR in T3 seeds at 30 and 60 days post anthesis (dpa). All events over-expressed BnaC.PSYa-6XHys and no silencing of the *PSY* gene family members was detected. However, seed carotenoid profiling and quantification by HPLC revealed that only a minimal increase (2X) in carotenoid content was obtained. Future strategies to maximize seed carotenoid content in rapeseed are discussed.

**Keywords:** Biofortification; Rapeseed; Phytoene synthase; Lutein.

Recibido 12/09/17; Aceptado 24/11/17.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Introducción

Los carotenoides son compuestos isoprenoides sintetizados por todos los organismos fotosintéticos que presentan numerosas funciones fisiológicas como precursores de pigmentos esenciales en la fotosíntesis y de moléculas de señalización, como ácido abscísico (ABA), en respuesta a estrés abiótico en plantas superiores (Howitt y Pogson, 2006; Li *et al.*, 2008a; Welsch *et al.*, 2008). Asimismo, ciertos carotenoides son precursores de la vitamina A, la cual cumple un rol importante en humanos y animales. Dado que tanto humanos como animales no pueden sintetizar carotenoides *de novo* y deben ingerirlos en su dieta, existe gran interés en biofortificar cultivos a través de ingeniería genética para suplir los requerimientos diarios de vitamina A (Giuliano *et al.*, 2008; Federico y Schmidt, 2016; Giuliano, 2017).

Fitoeno sintasa (PSY) es la primera enzima de la ruta de síntesis de carotenoides que cataliza la condensación cabeza a cabeza de dos moléculas de geranyl geranyl pirofosfato (GGPP) para producir fitoeno, un carotenoide incoloro (Dellapenna y Pogson, 2006; Cazzonelli y Pogson, 2010). En *Arabidopsis thaliana*, PSY es codificada por un único gen (Scolnik y Bartley, 1994), sin embargo, se ha reportado la existencia de familias de genes *PSY* en numerosas especies vegetales (Bartley y Scolnik, 1993; Busch *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2008ab; Welsch *et al.*, 2008). Este es el caso de *Brassica napus* L. (AACC; n = 19), especie alotetraploide originada por la hibridación interespecífica de miembros de dos especies diploides, *Brassica rapa* L. (AA; n = 10) y *Brassica oleracea* L. (CC; n = 9) (U, 1935). Con seis miembros funcionales, la familia *PSY* de *B. napus* es la más extensa descrita hasta la fecha (Cárdenas *et al.*, 2012; López-Emarán *et al.*, 2014).

La actividad de PSY es un factor limitante para la biosíntesis de carotenoides en tejido no fotosintético (Maass *et al.*, 2009). En *B. napus*, uno de los cultivos oleaginosos más importantes a nivel mundial, esta limitación fue demostrada a través de un trabajo pionero donde la sobreexpresión en semilla de un gen *PSY* de origen bacteriano (CrtB) resultó en un incremento de 50 veces los niveles de  $\beta$ -caroteno y embriones visiblemente naranjas (Shewmaker *et al.*, 1999). 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 plastidios, 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 ilustrado en el "Arroz Dorado-2" donde la sobreexpresión de un gen *PSY* de maíz aumentó 23 veces los niveles de carotenoides en el endosperma de arroz comparado con el gen *PSY* de narciso (Paine *et al.*, 2005).

Considerando que se ha demostrado que la actividad PSY es limitante en la síntesis de carotenoides en *B. napus* y que hasta ahora no se han conducido estudios donde se sobreexpresen un gen *PSY* de origen vegetal, los objetivos de este estudio fueron: generar plantas transgénicas de *B. napus* que sobreexpresen en semillas uno de sus 6 genes *PSY* (BnaC.PSY.a), evaluar los niveles de expresión génica del transgen y de sus 6 contrapartes *PSY* nativas, y determinar el contenido de carotenoides en semillas de las líneas transgénicas obtenidas.

## Materiales y métodos

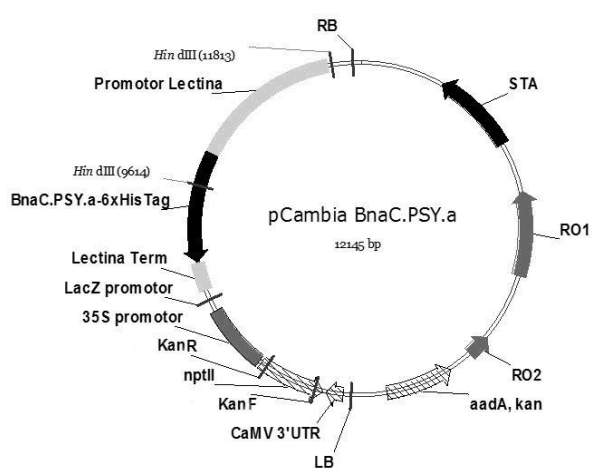
### Construcción del vector binario pCambia2300-Lec: BnaC.PSYa-6XHis

La secuencia codificante del gen *BnaC.PSY.a* (GenBank: KF297333) conteniendo el péptido de tránsito fue amplificada con el uso de cebadores específicos (BnaC.PSY.a.NotIF y BnaC.PSY.a-NotI-6xHisTagR) (Tabla 1) a partir de ADN plasmídico conteniendo la secuencia codificante del gen *BnaC.PSY.a* aislado de semilla (Cardenas *et al.*, 2012). Ambos cebadores contienen la secuencia de corte de la enzima de restricción *NotI* y el cebador BnaC.PSY.a-NotI-6xHisTagR contiene además un 6XHis-tag. Esta etiqueta de polihistidina fue incorporada a fin de discriminar entre los ADNc y proteínas codificadas por el transgen de sus contrapartes endógenas. El fragmento amplificado fue subclonado en el vector Topo TA (Invitrogen, CA, USA), digerido con la enzima *NotI* e insertado en el vector pUCAPS4, que contiene el promotor y terminador del gen *Lectina* (*LeI*) de *Glycine max* (GenBank: EU070414) (Vodkin *et al.*, 1983). El vector generado fue cortado con las enzimas *Sall* y *BamHI* (New England Biolabs, MA, USA) e insertado en el vector pCambia2300 previamente digerido con estas enzimas. De esta manera, la secuencia codificante del gen *BnaC.PSY.a* quedó bajo el control del promotor y

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados como cebadores.

Cebador	5' -secuencia-3'
BnaC.PSY.a.NotIF	GCGGCCGCAITGTTCTGTAGCAGTGTTATGG
BnaC.PSY.a-NotI-6xHisTagR	GCGGCCGCTAGTGGTGATGATGAGTTGTTCTCTTGAAC
KanF	CCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTA
KanR	TCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGC
BnaC.PSY.aF	ATGTCTTCTGTAGCAGTGTTATGG
BnaC.PSY.a-6xHisTagR	CTAGTGGTGATGATGAGTTGTTCTCTTGAAC
SSCP3F	AGTGTTTACAACGCTGCCTT
HisTag2R	CTAGTGGTGATGGTGATGATG
PSYaSpecF	CAAAATTCTCTTCCAAGAGGAGGAGAAAAG
PSYaRev	AGCTGTTTGTAAACAAAGCCGCTTGT
PSYbSpecF	AACAAAACAAAAGTTGAGATTTTTCCATT
BnaPSY.NRb	CAGAAGAAGAGGAAGAAGTCCATGTT
PSYcSpecF3	TTGGAGTTCTTCTGTTATGAGACGCCG
PSYcRev	CGCCATGGGAGTTATATGTGATGC
PSYdSpecF	TCTCTAGTGAGCTGCAGAAGGGGAAGA
PSYdRev	CTAACGCCATGGGAGTTATGTGTG
PSYeSpecF2	GAGTTCTTCTTCTTCTGTAATGAGCTTT
PSYeRev2	CCATGGGAGTTATATGTGATGCATTC
PSYfSpecF	CTTCTGTAATGAGCTGCAGAAGAAGATTAA
PSYfRev	CTTCCCATCTATCTAACGCCATGG
β-tubulin-F	GTCTGTGACATTGCACCAAAG
β-tubulin-R	GTCCATGCCTTCTCCTGTGT
Bna.ActinF	GAAGTGAATGGTGAAGGCTGGGTT
Bna.ActinR	TCTCTCAGCTCCGATGGTGATGACT
Bn.PSY.all-F	GGAACTTTGCTTATGACACC
Bn.PSY.all-R	TGCTTCCCATCTATCTAACG
BnaC.PSY.aRT-F2	CAGGAGAATATTGGACGAGA

terminador del gen *Lectina* de soja (Figura 1). El vector generado fue transferido a *A. tumefaciens* cepas LBA4404 y GV3101 por electroporación usando el equipo ECM600 (BTX, MA, USA) bajo las siguientes condiciones: 2 kV; 25 µF; 200 Ω; 5,0 msec, para la posterior transformación de *B. napus* cv. Westar.



**Figura 1.** Vector binario pCambia2300-Lec::*BnaC.PSYa-6XHis* 1. El vector binario generado posee la secuencia codificante del gen *BnaC.PSY.a*, con su correspondiente péptido de tránsito, bajo el control del promotor y terminador del gen *Lectina* de soja. Se agregó una etiqueta de seis histidinas (6xHisTag) localizada

en el extremo carboxilo terminal de la proteína transgénica para diferenciar el transgen de sus contrapartes endógenas. RB: borde derecho; LB: borde izquierdo; RO1: origen de replicación pBR322; RO2: origen de replicación pVS1; STA: región de estabilidad replicación pVS1.

### Transformación genética de *Brassica napus*

La transformación genética se realizó de acuerdo al protocolo descrito para especies *Brassica* spp. (Lee, 1996) con pequeñas modificaciones. Brevemente, cepas LBA4404 o GV3101 de *A. tumefaciens* conteniendo el vector pCambia2300-Lec::*BnaC.PSYa-6XHis* fueron crecidas en 10 ml de medio Luria-Bertani (LB) suplementado con antibióticos apropiados [LBA4404: kanamicina 25 µg/ml, rifampicina 25 µg/l, estreptomycin 100 µg/ml; GV3101: rifampicina 25 µg/ml, kanamicina 25 µg/ml (Hellens *et al.*, 2000)] hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> entre 1 a 1,8. Para el co-cultivo, se reconstituyó *A. tumefaciens* 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-h-noche) a 22 °C a fin de obtener cotiledones con un hipocótilo de 3 mm. Los cotiledones fueron cortados e incubados con *A. tumefaciens* por 5 días a 15 °C. Los cotiledones inoculados fueron pasados a placas conteniendo medio de regeneración (RM: MSMO 4,4 g/L, sacarosa 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  $\mu\text{mol/s m}^2$  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  $\mu\text{mol/s m}^2$ . Los cotiledones fueron traspasados luego a medio inductor de tallos (SEM: MSMO 4,4 g, sacarosa 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 cebadores específicos (Tabla 1), las plantas regeneradas fueron evaluadas por PCR para determinar la presencia del transgen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina (KanF, KanR) y del transgen *BnaC.PSYa-6XHis* (Bna.PSY.aF, BnaC.PSY.a6xHistagR). El proceso de amplificación para ambas reacciones se inició con un paso de desnaturalización a 95 °C por 2 min, seguido por 40 ciclos de 30 seg a 95 °C, 30 seg a 47 °C (Bna.PSY.aF, BnaC.PSY.a6xHistagR) ó 50 °C (KanF, KanR) ) y 30 seg a 72 °C, con una extensión final a 72 °C por 5 min. Los eventos  $T_0$  conteniendo ambos transgenes fueron autopolinizados para la obtención de la progenie  $T_1$ . Al menos diez plantas  $T_1$  provenientes de cada planta  $T_0$ , fueron crecidas y autopolinizadas para la obtención de semilla  $T_2$ . 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 por RT-PCR cuantitativo en tiempo real y la determinación del contenido y composición de carotenoides en semillas.

### Test de segregación

Para determinar el estado homocigota/hemicigota de las plantas  $T_2$  para el transgen *BnaC.PSY.a-6XHis*-tag se realizó un test de segregación final. Se germinaron y crecieron diez semillas  $T_3$  en invernadero, bajo condiciones controladas en ciclos de 16-h-día/8-h-noche, hasta la etapa de dos hojas para la posterior cosecha independiente de tejido foliar y extracción de ADN de cada una de las plántulas. La extracción 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 cebadores específicos transgen (SSCP3F y HisTag2R, Tabla 1). 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 cebadores específicos (Tabla 1). 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  $T_3$  (10 de 10) permitió determinar la homocigosis de cada planta  $T_2$  autopolinizada. Por el contrario, si en al menos una de las diez plántulas  $T_3$  no se detectaba el transgen, se determinó que la planta  $T_2$  aun segregaba para el transgen. Sólo una de las réplicas biológicas incluidas en este estudio corresponde a un individuo hemicigoto para el transgen (PSY-131a3-10).

### 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 transcrito *BnaC.PSYa-6XHis*, de su contraparte endógena *BnaC.PSY.a* y

de los otros cinco homólogos *PSY* en semillas T<sub>3</sub> 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 cebadores específicos en las regiones menos conservadas de la secuencia de ADNc de los genes homólogos *BnaX.PSY* (*PSYaSpecF*, *PSYaRev*; *PSYbSpecF*, *BnaPSY.NRb*; *PSYcSpecF3*, *PSYcRev*; *PSYdSpecF*, *PSYdRev*; *PSYeSpecF2*, *PSYeRev2*; *PSYfSpecF*, *PSYfRev*, Tabla 1). El ARN total de 100 mg de semillas (T<sub>3</sub>) 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 ARN se realizó a partir de tres réplicas biológicas (plantas T<sub>2</sub>) por evento transgénico. La síntesis de ADNc fue realizada usando el kit AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, CA, USA) desde 2 µg de RNA total, previamente tratado con DNase (RQ1 RNase free DNase, Promega) según indicaciones del fabricante, en un volumen de reacción de 20 µl. La síntesis de ADNc fue evaluada por amplificación por PCR del gen  $\beta$ -tubulina de *B. napus* usando cebadores específicos ( $\beta$ -tubulin-F y  $\beta$ -tubulin-R, Tabla 1). La ausencia de contaminación por ADN genómico fue evaluada por amplificación por PCR del gen *Actina* usando un set de cebadores (*Bna.Actin-F* y *Bna.Actin-R*, Tabla 1) que generan un fragmento de 725-pb en presencia de ADNc y un fragmento de 900-pb para ADN genómico debido a la presencia de un intrón (dato no mostrado). El ADNc 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 ( $\beta$ -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 cebadores homólogo-específicos (Tabla 1) 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.

#### RT-PCR cuantitativo en tiempo real

El nivel de transcritos del transgen *BnaC.PSY.a-6XHis*, y los genes endógenos *BnaX.PSY* fue evaluado utilizando cebadores específicos (*BnaC.PSY.aRT-F2*, *HisTag2R*; *Bn.PSY.all-F*, *Bn.PSY.all-R*, Tabla S1) en semillas T<sub>3</sub> de 6 eventos independientes, en dos estadios de desarrollo, 30 y 60 dpa mediante RT-PCR en tiempo real. La amplificación del gen  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -Tubulin-F,  $\beta$ -Tubulin-R, Tabla 1) 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 ADNc utilizados en las RT-PCR. Dos µl de una dilución 1 en 10 v/v de cada ADNc 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 µl) en un equipo Mx3000 qPCR System (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA) con el programa MxPro QPCR, de la 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  $\beta$ -tubulina (Welsch *et al.*, 2010). Los valores están representados por el promedio de las tres réplicas biológicas y de dos réplicas técnicas de RT-PCR. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de la varianza. La eficiencia de los cebadores fue evaluada mediante RT-PCR en tiempo real en diluciones seriadas de ADNc. La eficiencia de los cebadores se calculó mediante la siguiente ecuación  $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$  (Rasmussen R., 2001). Esto permitió determinar una eficiencia específica de 2,02 ( $\beta$ -tubulin-F,  $\beta$ -tubulin-R), 2,05 (*Bn.PSY.all-F*, *Bn.PSY.all-R*) y 1,98 (*BnaC.PSY.aRT-F2*, *HisTag2R*) para cada set.

#### Extracción de carotenoides y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Los 6 eventos transgénicos generados fueron evaluados en cuanto a composición y nivel de carotenoides en semillas T<sub>3</sub>, en dos estadios de desarrollo, 30 y 60 dpa mediante HPLC con 1 y 3 réplicas biológicas respectivamente. Como control se evaluaron semillas de *B. napus* cv Westar

sin transformar (30 y 60 dpa) en 3 réplicas biológicas. La extracción de carotenoides se realizó a partir 100 mg de semilla que fueron molidas con mortero en 1 ml de acetona (Welsch *et al.*, 2008). Se llevaron a cabo tres extracciones sucesivas para remover los carotenoides hasta que no se observó color remanente en el tejido. El extracto fue centrifugado (14000 rpm x 1 min) y posteriormente se concentró el sobrenadante y se lo secó con nitrógeno gaseoso. Los carotenoides fueron resuspendidos en 1 ml de acetona grado-HPLC al 100 % y se los utilizó en una primera etapa para la determinación de carotenoides totales con un espectrofotómetro siguiendo las ecuaciones descritas por Lichtenthaler y Buschmann (2001). Para ello, se registró la absorbancia a distintas longitudes de onda: 474 nm (carotenoides), 645/662 nm (clorofilas *a* y *b*, que es utilizada para determinar su contribución en la medición a 474 nm) y 520/750 nm (turbidez). Los carotenoides de semillas fueron medidos por espectrofotometría a 474 nm en un equipo Shimadzu HPLC (LC-10AT) con detector de arreglo de diodos. Los pigmentos fueron separados y cuantificados por HPLC usando una columna MultoHigh 100 RP 18-5 $\mu$  (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. 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, 1995; Britton *et al.*, 2008). Todas las actividades fueron realizadas en hielo y en condiciones de oscuridad para evitar la fotodegradación, el cambio estructural y la isomerización de los carotenoides.

#### Análisis estadístico

Los niveles de expresión de los genes *PSY* y *BnaC.PSY.a-6XHis-tag* de semillas 30 y 60 dpa, y el promedio de la concentración de carotenoides en semillas 60 dpa obtenido mediante HPLC de plantas control y transgénicas fueron sujetos a análisis de varianza de una vía 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  $P < 0,05$ .

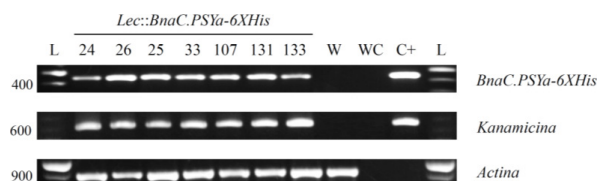
## Resultados y discusión

### Generación de eventos transgénicos de *B. napus*

Se realizaron 10 procesos de transformación genética totalizando 4280 hipocótilos infectados, a partir de los cuales se regeneraron un total de 162 plantas con una cantidad variable de brotes por planta (367 brotes totales) (Figura 2). De cada brote se colectó tejido foliar y se extrajo ADN para determinar por PCR la presencia/ausencia de transgenes. Este análisis confirmó la generación de 7 eventos transgénicos ( $T_0$ ) obtenidos luego de la transformación con el vector pCambia2300-Lec::*BnaC.PSYa-6XHisTag* (Figura 3). La eficiencia de transformación total obtenida fue de 0,16 %. De los 7 eventos transgénicos ( $T_0$ ), el evento BnPSY-107 mostró esterilidad por lo que los estudios funcionales se realizaron solo en los 6 eventos fértiles.



**Figura 2.** Transformación de *Brassica napus* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. (A) Selección (B) Regeneración (C) Transferencia a condiciones de invernadero.

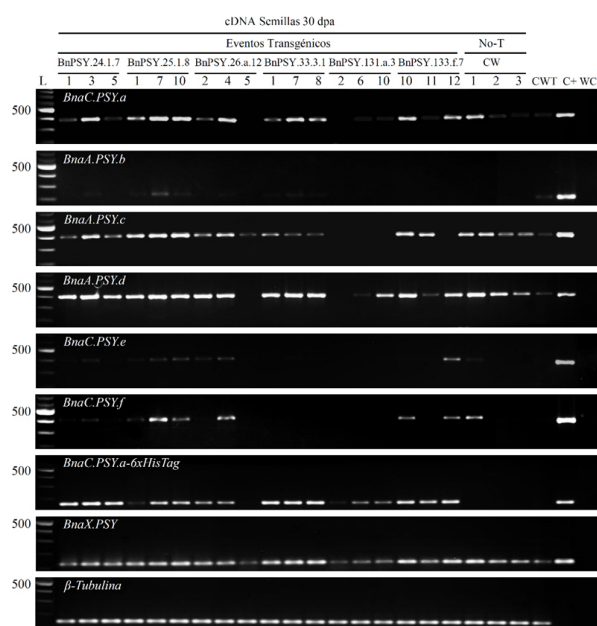


**Figura 3.** Análisis de amplificación por PCR de eventos transgénicos. Los eventos transgénicos  $T_0$  fueron confirmados mediante la amplificación de los transgenes *BnaC.PSYa-6XHis* y *nptII* (resistencia a kanamicina). La presencia de ADN en las distintas muestras fue confirmada mediante la amplificación del gen *Actina* de *B. napus*. L: marcador de peso molecular; W: *B. napus* cv. Westar no transformada, WC: control negativo; C+: control plásmido.

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

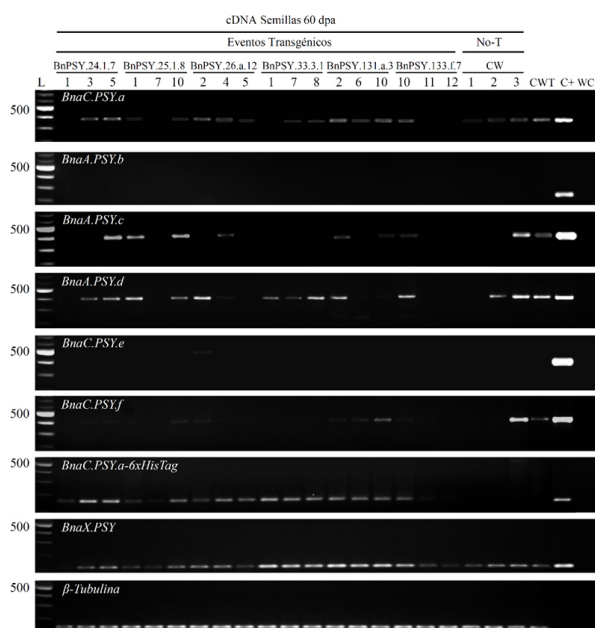
Se evaluó por RT-PCR la abundancia relativa de transcritos de la familia de genes *PSY* de *B. na-*

*pus* usando cebadores homólogo-específicos, del transgen *BnaC.PSYa-6XHis*, y conjunta de los homólogos (*BnaX.PSY*) y el transgen usando un set de cebadores conservados (Bn.PSY.all-F, Bn.PSY.all-R, Tabla 1) en semillas T<sub>3</sub> en dos etapas diferentes del desarrollo (30 y 60 dpa) de los 6 eventos transgénicos (Figuras 4 y 5). 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* cv. Westar sin transformar (Figuras 4 y 5). Como resultado se pudo confirmar que los 6 eventos transgénicos presentan transcritos para el transgen en las tres réplicas biológicas en semillas 30 y 60 dpa (Figuras 4 y 5). Además, se determinó que la familia *PSY* presenta una abundancia relativa de transcritos similar en los eventos transgénicos y *B. napus* sin transformar en semillas 30 y 60 dpa (Figura 4 y 5). Acorde a lo esperado, la pareja de cebadores Bn.PSY.all, amplificó en semillas 30 y 60 dpa tanto en los eventos transgénicos, como en el control sin transformar (Figuras 4 y 5).



**Figura 4.** Análisis de la abundancia relativa de transcritos para el transgen *BnaC.PSYa-6XHis* y la familia *PSY* en semilla (T<sub>3</sub>-30 dpa) de los eventos transgénicos de *Brassica napus* mediante RT-PCR. La expresión de genes *BnaX.PSY* fue determinada usando cebadores específicos para cada homólogo. La expresión del transgen *BnaC.PSYa-6XHis* fue determinada usando cebadores 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 cebadores conservados. Expresión del gen  $\beta$ -tubulina de *B. napus* (control). L: marcador de peso molecular; 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.



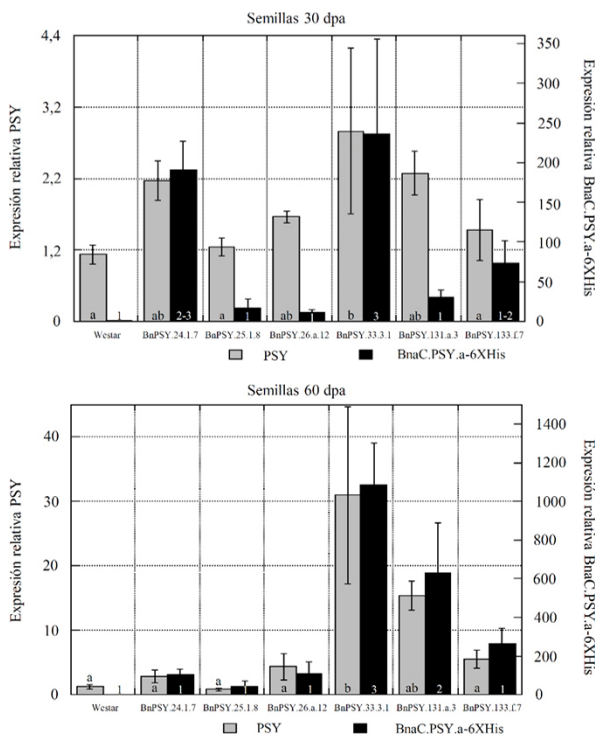
**Figura 5.** Análisis de la abundancia relativa de transcritos para el transgen *BnaC.PSYa-6XHis* y la familia *PSY* en semilla (T<sub>3</sub>-60 dpa) de los eventos transgénicos de *Brassica napus* mediante RT-PCR. La expresión de genes *BnaX.PSY* fue determinada usando cebadores específicos para cada homólogo. La expresión del transgen *BnaC.PSYa-6XHis* fue determinada usando cebadores específicos. *BnaX.PSY*, muestra la abundancia relativa de transcritos de los 6 genes *BnaX.PSY* y el transgen *BnaC.PSYa-6XHis* mediante el uso de cebadores conservados. La expresión del gen  $\beta$ -tubulina de *B. napus* funciona como control de síntesis de ADNc. L: control de peso molecular; 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.

El gen endógeno *BnaC.PSY.a*, presentó transcritos en semillas 30 y 60 dpa, sin embargo su homeólogo, *BnaA.PSY.b*, que presenta un patrón de expresión similar en diversos tejidos (Cardenas *et al.*, 2012) prácticamente no fue detectado en cDNAs de semilla a 30 y 60 dpa (Figuras 4 y 5). Esto ratifica la selección del gen *BnaC.PSY.a* para ser sobreexpresado en semilla, porque presenta un patrón de expresión temprano y se mantiene hasta la madurez del desarrollo del grano, lo que sería indicativo de su importancia en la carotenogénesis en semilla. Es interesante observar que uno de los eventos transgénicos, BnPSY.131.a.3, presenta reducida o nula expresión de los genes *PSY* ho-

mólogos en semilla 30 dpa mientras que presenta expresión del transgen en las tres réplicas biológicas y amplificación de la pareja de cebadores Bn.PSY.all (Figura 4). Solamente se observaron transcritos del gen *BnaA.PSY.d* en dos de las réplicas biológicas de este evento (BnPSY.131.a.3.6 y BnPSY.131.a.3.10) en semilla 30 dpa.

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

Usando cebadores específicos, se evaluó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real el nivel de transcritos para el transgen *BnaC.PSYa-6XHis* y el nivel conjunto de todos los transcritos *PSY* (*BnaX.PSY*) (endógenos y transgen) utilizando un set de cebadores conservados (Bn.PSY.all-F, Bn.PSY.all-R, Tabla 1) en semillas T3 en dos etapas diferentes del desarrollo (30 y 60 dpa) de los 6 eventos transgénicos (Figura 6).



**Figura 6.** Análisis del nivel de transcritos del transgen *BnaC.PSYa-6XHis* y los genes *PSY* endógenos de *Brassica napus* en semilla T<sub>3</sub> 30 y 60 dpa 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 cebadores específicos. *PSY*, corresponde al nivel de transcritos conjunto de los 6 genes *BnaX.PSY* y el transgen *BnaC.PSYa-6XHis* mediante el uso de cebadores conservados. Los transcritos del gen  $\beta$ -tubulina de *B. napus* fueron usados como control interno para la normalización

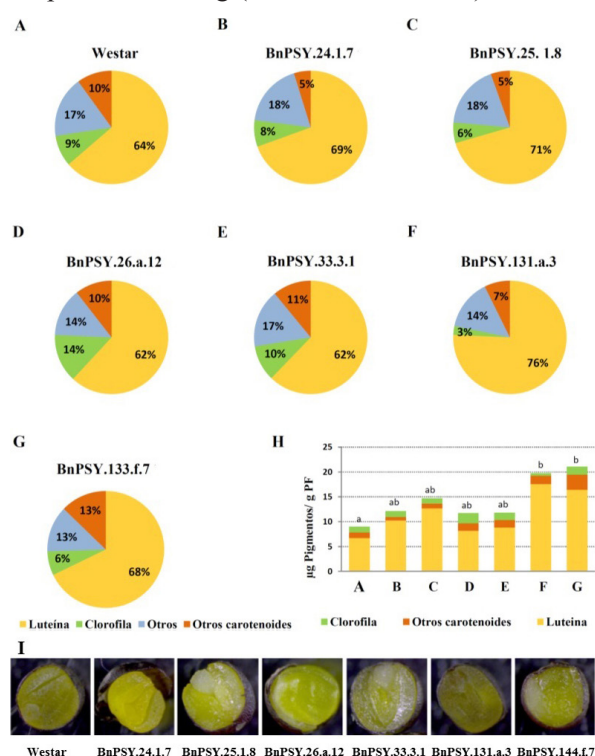
del nivel de transcritos de los genes blanco. Westar: *B. napus* sin transformar. Las barras representan el error estándar calculado desde tres réplicas biológicas (n = 3) y dos réplicas técnicas (n = 2). Número y letras representan diferencias significativas (P < 0,05) entre grupos.

Todos los eventos presentaron niveles diferenciales de transcritos del transgen y no hubo expresión alguna en el control sin transformar (Figura 6). A su vez, se observaron diferencias significativas en los niveles de transcritos del transgen en ambos estadios de desarrollo. Los eventos BnPSY.24.1.7 y BnPSY.33.3.1 mostraron los mayores niveles de transcritos del transgen *BnaC.PSYa-6XHis* en semillas 30 dpa (Figura 6A) mientras que los mayores niveles de transcritos del transgen en semillas 60 dpa se observaron en los eventos BnPSY.33.3.1 y BnPSY.131.a.3 (Figura 6B). Es interesante destacar que el nivel de transcritos *PSY* totales presentó diferencias significativas sólo en el evento BnPSY.33.3.1 en cDNA de semillas 30 y 60 dpa (Figura 6).

#### El contenido de carotenoides de los eventos transgénicos resulta levemente modificado

Con el propósito de incrementar los niveles de carotenoides en semilla de *B. napus* se utilizaron diversas estrategias (Shewmaker *et al.*, 1999; Ravello *et al.*, 2003; Fujisawa *et al.*, 2009). En este estudio, mediante el uso de un promotor tejido específico con dirección a semilla, se logró sobreexpresar uno de los 6 genes *PSY* presentes en el genoma de *B. napus*, determinándose que el transgen está siendo expresado en todas las líneas generadas. Los resultados obtenidos durante la identificación y cuantificación de pigmentos mediante HPLC son congruentes con el color observado en semillas (Figura 7). Solo dos eventos transgénicos (BnPSY.131.a.3 y BnPSY.133.f.7) presentaron aumentos significativos (2X) en los niveles de carotenoides en semilla 60 dpa respecto del control (Figura 7H). El aumento correspondió principalmente a la duplicación de la luteína presente en estos eventos (Figura 7). En *A. thaliana*, la sobreexpresión del gen *AtPSY* bajo el control de un promotor semilla-específico, también incrementó los niveles de luteína pero conjuntamente con un incremento en los niveles de  $\beta$ -caroteno; disminuyendo la proporción de luteína de un 61 % a un 40 % en el extracto de carotenoides totales (Lindgren *et al.*, 2003). En contraste, en este estudio se

encontraron niveles bajos o nulos de  $\beta$ -caroteno manteniendo o incrementándose el porcentaje de luteína presente en semillas 60 dpa respecto del control sin transformar (Figura 7). Estos resultados son congruentes con el hecho que las semillas transgénicas no muestran claras diferencias visuales en cuanto al color que evidencien la acumulación de  $\beta$ -caroteno respecto a semillas de las plantas control (Figura 7I). 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). Esto puede ser el resultado de varios factores. Uno de ellos está asociado al hecho que al extremo 3' de la secuencia codificante del gen endógeno *PSY*, se le insertó una secuencia que codifica para una etiqueta 6XHis con el objeto de diferenciar el transgen del gen *BnaC.PSY.a* endógeno. Desafortunadamente, la etiqueta 6XHis en el extremo carboxilo podría estar afectando sitios de interacción proteína-proteína (Cunningham, 2002; Cunningham y Gantt, 1998) según lo observado al modelar las proteínas *PSY* con o sin la etiqueta 6XHisTag (datos no mostrados).



**Figura 7.** Contenido y composición de carotenoides de los seis eventos transgénicos en semillas 60 dpa. El contenido y composición de carotenoides y otros pigmentos fueron analizados por HPLC. (A-G) Porcentaje de pigmentos en semillas Westar 60 dpa (control) y eventos transgénicos T<sub>3</sub> 60 dpa. (H) Contenido

( $\mu\text{g/gPF}$ ) y composición de pigmentos en semillas de los eventos transgénicos. (A) *B. napus* cv. Westar sin transformar; (B) BnPSY.24.1.7; (C) BnPSY.25.1.8; (D) BnPSY.26.a.12; (E) BnPSY.33.3.1; (F) BnPSY.131.a.3; (G) BnPSY.133.f.7. Las letras en las barras del gráfico representan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre grupos con tres réplicas biológicas ( $n = 3$ ) por grupo. (I) Semillas 60 dpa transgénicas y control.

Si bien se esperaba una acumulación principal de  $\beta$ -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 de oxígeno (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 sigue en expansión (Madaan *et al.*, 2017).

## Conclusiones

Este trabajo se realizó bajo la hipótesis que la sobreexpresión de un gen *PSY* endógeno podría producir un incremento en la acumulación de carotenoides en *B. napus* mayor al incremento que se produce con un gen bacteriano. El bajo incremento observado en los niveles de carotenoides en los eventos transgénicos y la baja o nula producción de  $\beta$ -caroteno podría deberse a esta modificación. En este caso, la condensación de dos moléculas de GGPP por la enzima *PSY* se mantendría como un cuello de botella (Cazonelli y Pogson, 2010). Es importante aclarar también que la presencia de la proteína transgénica no pudo ser confirmada de manera concluyente (datos no mostrados). Si bien esto puede deberse a problemas técnicos y a la selección de etiqueta (6xHis) utilizada, también podría ser otra razón detrás del bajo incremento de carotenoides observado.

Este trabajo es un paso inicial en el uso de un gen *PSY* endógeno en ingeniería metabólica del

contenido de carotenoides en colza. Surge de nuestra investigación que el promotor *Lectina* de soja ha demostrado ser eficiente en la expresión de un transgen y dirige un patrón de expresión congruente con el necesario para modificar la carotenogenesis en semillas de *B. napus*. Con respecto a la elección de otros posibles transgenes, la batería de genes *PSY* funcionales descrita en colza (López-Emparán *et al.*, 2014) permite la selección de por ejemplo (i) un transgen preferentemente expresado en pétalos que no requeriría etiquetado (*BnaC.PSY.e*) o (ii) un transgen que se expresa fuertemente en semilla en las distintas etapas de desarrollo y que presentó la mayor actividad en un sistema de complementación heterólogo (*BnaA.PSY.d*).

### Agradecimientos

Los autores desean agradecer a Jimena Carril, Fernando Westermeyer y Orlando Acevedo por su asistencia técnica y al Dr. Wayne Parrott de la Universidad de Georgia (EEUU) por facilitar acceso a los vectores pUCAPS4 y pCAMBIA2300. Esta investigación fue financiada por CONICYT FONDECYT 1090726 y CONICYT REGIONAL / GORE LA ARAUCANIA / CGNA / R10C1001.

### Referencias bibliográficas

- Alves-Rodrigues A., Shao A. (2004). The science behind lutein. *Toxicology Letters* 150: 57-83.
- Bartley G., Scolnik P. (1993). cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of *PSY2*, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *Journal of Biological Chemistry* 268: 25718-25721.
- Britton G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal* 9: 1551-1558.
- Britton G. (2008). Functions of intact carotenoids. En: *Carotenoids: natural functions*. Britton G., Li-aaen-Jensen S., Pfander H. (Eds.). Birkhäuser Verlag, Suiza. Pp. 189-212.
- Busch M., Seuter A., Hain R. (2002). Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology* 128: 439-453.
- Cárdenas P.D., Gajardo H.A., Huebert T., Parkin I.A., Iniguez-Luy F.L., Federico M.L. (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 B.J. (2010). Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 15 (5): 266-274.
- Cunningham F., Gantt E. (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 557-583.
- Cunningham F. (2002). Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure and Applied Chemistry* 74: 1409-1417.
- DellaPenna D., Pogson B.J. (2006). Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology* 57: 711-738.
- Federico M.L., Schmidt M.A. (2016). Modern Breeding and Biotechnological Approaches to Enhance Carotenoid Accumulation in Seeds. En: *Carotenoids in Nature*. Subcellular Biochemistry 79. Stange C. (Ed). Springer International Publishing, Suiza Pp. 345-358.
- Giuliano G., Tavazza R., Diretto G., Beyer P., Taylor M. (2008). Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Biotechnology* 26 (3): 139-145.
- Giuliano G. (2017). Provitamin A biofortification of crop plants: a gold rush with many miners. *Current Opinion in Biotechnology* 44: 169-180.
- Hartmann D., Thürmann P.A., Spitzer V., Schalch W., Manner B., Cohn W. (2004). Plasma kinetics of zeaxanthin and 3'-dehydro-lutein after multiple oral doses of synthetic zeaxanthin. *The American Journal of Clinical Nutrition* 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.
- Howitt C.A., Pogson B.J. (2006). Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment* 29: 435-445.
- Jansen R.J., Robinson D.P., Stolzenberg-Solomon R.Z., Bamlet W.R., de Andrade M., Oberg A.L., Rabe K.G., Anderson K.E., Olson J.E., Sinha R., Petersen G.M. (2013). Nutrients from fruit and vegetable consumption reduce the risk of pancreatic cancer. *Journal of Gastrointestinal Cancer* 44: 152-161.
- Kidwell K.K., Osborn T.C. (1992). Simple plant DNA isolation procedure. En: *Plant genomes: methods for genetic and physical mapping*. Beckman J., Osborn T.C. (Eds.). Kluwer, Países Bajos. Pp. 1-13.
- Lee S. (1996). Speedy Transformation Method: *Agrobacterium* mediated Cotyledonary Petiole Transformation of *Brassica* spp. Using Kanamycin Selection. Tesis doctoral, University of Saskatchewan, Saskatchewan, Canada. En: <http://hdl.handle.net/10388/etd-10212004-000633> (20/10/2010), consulta: noviembre 2017.
- 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 Physiology* 146 (3): 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 Physiology* 147: 1334-1346.
- Lichtenthaler H.K., Buschmann C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. En: *Current protocols in food analytical chemistry*. Wiley, EE.UU. Pp. F4.3.1-F4.3.8
- 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.
- López-Emparán A., Quezada-Martínez D., Zúñiga-Bustos M., Cifuentes V., Iñiguez-Luy F., Federico M.L. (2014). Functional analysis of the *Brassica napus* L. phytoene synthase (*PSY*) gene family. *PLoS One* 9 (12): e114878. doi: 10.1371/journal.pone.0114878.
- Ma L., Dou H.L., Wu Y.Q., Huang Y.M., Huang Y.B., Xu X.R., Zou Z.Y., Lin X.M. (2012). Lutein and zeaxanthin intake and the risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Nutrition* 107: 350-359.
- 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.
- Madaan T., Choudhary A.N., Gyenwalee S., Thomas S.H., Mishra H., Tariq M., Vohora D., Talegaonkar S. (2017). Lutein, a versatile phyto-nutraceutical: An insight on pharmacology, therapeutic indications, challenges and recent advances in drug delivery. *PharmaNutrition* 5 (2): 64-75.
- Olmedilla B., Granado F., Blanco I., Vaquero M. (2003). Lutein, but not  $\alpha$ -tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-y double-blind, placebo-controlled pilot study. *Nutrition* 19: 21-24.
- Paine J.A., Shipton C.A., Chaggar S., Howells R.M., Kennedy M.J., Vernon J., Wright S.Y., Hinchliffe E., Adams J.L., Silverstone A.L., Drake L. (2005). Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology* 23: 482-487.
- Rasmussen R. (2001). Quantification on the Light-Cycler instrument. En: *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications*. Meurer S., Wittwer C., Nakagawara K. (Eds.). Springer-Verlag Press, Alemania. 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.
- Santana Brum A.A., Pereira dos Santos P., Marques Da Silva M., Paese K., Stanisçuaski Guterres S., Haas Costa T.M., Raffin Pohlmann A., Jablonski A., Hickmann Flores S., de Oliveira Rios A. (2017). Lutein-loaded lipid-core nanocapsules: Physicochemical characterization and stability evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 522 (5): 477-484.
- 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.
- Scolnik P., Bartley G. (1994). Nucleotide sequence of an Arabidopsis cDNA for phytoene synthase. *Plant Physiology* 104: 1471-1472.
- 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.
- Vodkin L., Rhodes P., Goldberg R. (1983). A lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. *Cell* 34 (3): 1023-1031.
- 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., Beltrán J., Chavarriaga P., Ceballos H., Tohme J., Beyer P. (2010). Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene. *The Plant Cell* 22: 3348-3356.
- Zou Z., Xu X., Huang Y., Xiao X., Ma L., Sun T., Dong P., Wang X., Lin X. (2011). High serum level of lutein may be protective against early atherosclerosis: the Beijing atherosclerosis study. *Atherosclerosis* 219: 789-793.