



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA

ANÁLISIS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DE LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOS EN DIFERENTES TEJIDOS DE MAÍZ

VIRIDIANA SILVA PÉREZ

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2011

La presente tesis titulada: **"Análisis bioquímicos y moleculares de la biosíntesis de carotenos en diferentes tejidos de maíz"**, realizada por la alumna: **Viridiana Silva Pérez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



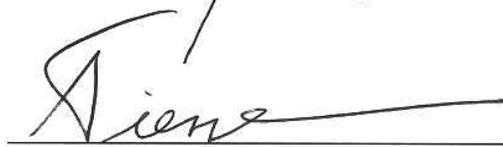
DR. J. JESÚS GARCÍA ZAVALA

DIRECTOR DE TESIS:



DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO

ASESOR:



DR. AXEL TIESSEN FAVIER

ASESOR:



DR. AMALIO SANTACRUZ VARELA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, junio de 2011

ANÁLISIS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DE LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOS EN DIFERENTES TEJIDOS DE MAÍZ

Viridiana Silva Pérez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2011

El maíz (*Zea mays* L.) es el cultivo básico más importante en México, y en los últimos años se ha secuenciado su genoma. En este trabajo se utiliza parte de la información genómica, 2,039 marcadores moleculares y se relaciona con el contenido de carotenos en líneas endogámicas recombinantes de maíz de la cruza B73 × Mo17 (IBM-RILs) para detectar *loci* de caracteres cuantitativos (QTLs). En la primera fase, se estudió el contenido de carotenos en las hojas, ya que éstos disipan la energía lumínica utilizada en la fotosíntesis, influyendo así en la tasa fotosintética y en el rendimiento de los cultivos. Se midió el contenido de luteína, β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina, y se encontró que β -caroteno representó 80% del total de carotenos. Se identificaron 21 QTLs significativos en los cromosomas 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8. En el bin 1.07 se localizó un QTL (asociado al marcador *umc2239*) significativo ($P \leq 0.001$) con valor aditivo alto para luteína, α -caroteno y β -caroteno. En la segunda fase, se estudió el contenido de algunos carotenos importantes para la alimentación humana por ser precursores de la vitamina A. Se evaluó luteína, β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina, provitamina A y total de carotenos en el grano y se realizó un análisis de QTLs para localizar regiones cromosómicas adicionales a las reportadas en la bibliografía y proponer genes candidatos. Los resultados coincidieron con la literatura revisada, pues en grano β -caroteno es el caroteno presente en menor proporción. Se identificaron nuevos QTLs, los más importantes mediante dos marcadores significativos (*umc12a* y *umc1777*) para luteína, β -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina y provitamina A en el bin 8.05. También se encontraron concordancias con genes anotados de *fitoeno sintasa*, ξ -caroteno desaturasa y licopeno ϵ -ciclase, y dos genes candidatos para *fitoeno sintasa* en el bin 6.01. Se concluye que existen situaciones contrastantes en hoja y grano de maíz en cuanto a su contenido de carotenos, así como en el número y ubicación de QTLs identificados.

Palabras clave: *Zea mays*, follaje, grano, fotosíntesis, provitamina A.

MOLECULAR AND BIOCHEMICAL ANALYSES OF CAROTENE BIOSYNTHESIS IN DIFFERENT MAIZE TISSUES

Viridiana Silva-Pérez, M. Sc.

Colegio de Postgraduados, 2011

Maize (*Zea mays* L.) is the most important staple crop in Mexico, and in recent years its genome has been sequenced. In this study, some of that genomic information is used, 2,039 molecular markers, related to carotene content in maize recombinant inbred lines from the B73 × Mo17 cross (IBM-RILs), in order to detect quantitative trait *loci* (QTLs). In the first phase, carotenes were studied in leaves because they dissipate the energy of light used in photosynthesis and thus influence the photosynthetic rate and crop yield. Lutein, β -carotene, α -carotene, β -cryptoxanthin and zeaxanthin were measured, and we found that β -carotene represented 80% of total carotenoids. Twenty-one significant QTLs were found on chromosomes 1, 2, 4, 5, 6, 7 and 8. One significant ($P \leq 0.001$) QTL (associated to *umc2239* marker) with high additive value for lutein, α -carotene and β -carotene was located at the 1.07 bin. In the second phase, the carotene content of some important carotenoids in human nutrition as they are precursors of vitamin A were studied. We evaluated lutein, β -carotene, α -carotene, β -cryptoxanthin, zeaxanthin, provitamin A and total carotenes in the kernel and a QTL analysis was performed in order to identify chromosomal regions other than those reported in literature and to detect candidate genes. Results were consistent with the literature, given that in kernel β -carotene is the carotenoid present in the smallest proportion. New QTLs were identified, the most important ones through two significant markers (*umc12a* and *umc1777*) for lutein, β -carotene, β -cryptoxanthin, zeaxanthin and pro-vitamin A at the 8.05 bin. We also found matches to annotated genes *phytoene synthase*, ξ -carotene desaturase and *lycopene ϵ -cyclase*, and two candidate genes for *phytoene synthase* at bin 6.01. We conclude that there are contrasting situations in maize leaf and kernel concerning their carotene content, as well as in the number and location of the identified QTLs.

Keywords: *Zea mays*, foliage, kernel, photosynthesis, pro-vitamin A.

AGRADECIMIENTOS

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) por el financiamiento económico para desarrollar mis estudios de maestría.

AL COLEGIO DE POSTGRADUADOS-SAGARPA, A LAS LÍNEAS PRIORITARIAS DE INVESTIGACIÓN 5 Y 6 y AL FIDEICOMISO INSTITUCIONAL por las facilidades y su apoyo económico brindado en la realización de este proyecto.

AL LABORATORIO DE METABOLÓMICA Y FISIOLÓGÍA MOLECULAR en CINVESTAV-IRAPUATO, a cargo de Dr. Axel Tiessen Favier por las facilidades brindadas para la realización de la parte experimental del proyecto y una parte teórica, tanto en el laboratorio como en el invernadero.

A CINVESTAV-IRAPUATO, LABORATORIO DE CROMATOGRFÍA a cargo de Yolanda Rodríguez y Maria Isabel Cristina Elizarraraz Anaya por su tiempo y paciencia para ayudarme en la medición de las cientos de muestras de carotenos.

AL DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO, por la propiedad para guiar y concretar favorablemente la presente tesis.

AL DR. AXEL TIESSSEN FAVIER, por sus numerosas propuestas de experimentos, de ideas, su gran motivación y alegría que imprimió para iniciar este proyecto.

AL DR. J. JESÚS GARCÍA ZAVALA y al DR. AMALIO SANTACRUZ VARELA, por sus acertadas observaciones y apoyo para concluir la tesis.

AL DR. JUAN BURGUEÑO FERREIRA y al DR. PAULINO PÉREZ por hacerme pensar, luchar por razonar, por las discusiones que enriquecieron enormemente el análisis y la redacción de este documento.

A la DRA. NATALIA PALACIOS, por los consejos e ideas básicas para el diseño y realización del tema de este proyecto.

AL DR. SERAFÍN CRUZ IZQUIERDO por su ayuda la elaboración de las Figuras A2 y A3 y a ALFONSO NARES para la elaboración de las Figuras 1 y 4.

DEDICATORIA

A DIOS, por estar siempre a mi lado.

A mi mamá BEATRIZ PÉREZ HERNÁNDEZ, por ser mi fortaleza y aliento para seguir adelante.

A mi padre VICENTE SILVA, por abrirme los ojos a la vida.

A mi FAMILIA, A MIS ABUELOS, A MIS TÍAS Y PRIMOS por ser parte de mis raíces.

A LA FAMILIA RODRÍGUEZ LICONA, por ser mi segunda familia.

A mis amigos: JULIETA RODRIGUEZ, JULIETA MIRELES, DIANA, CAJEME, SANDRA, MITZI, GABRIEL, MARIE, MAX, MECHE por compartir conmigo alegrías, tristezas, consejos y ayudarme a seguir adelante.

A DRA. MA. ANTONIETA GOYTIA JIMÉNEZ, por involucrarme en el campo de la investigación.

A los integrantes del laboratorio de Metabolómica y Fisiología molecular de CINVESTAV Irapuato: ANDRÉS ESTRADA, MAYELA ORENELAS, GABRIEL ANGELES, SHEILA JUÁREZ, DANIEL PADILLA, CRISTY MOLINA, ADRIAN, EMANUEL, DON NACHO y PACO, por su apoyo y consejos durante mi estancia

Al pueblo mexicano, por su apoyo en mis estudios a través de sus impuestos, esperando poder retribuir en un futuro.

Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas.

Ahora sabemos que está en nuestros genes.

James Watson

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS DEL ANEXO	x
ÍNDICE DE FIGURAS DEL ANEXO.....	x
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Objetivos.....	2
2. Hipótesis	2
3. Revisión de literatura	3
4. Literatura citada	13
CAPÍTULO 1. .. QTLs ASOCIADOS AL CONTENIDO DE CAROTENOS EN HOJAS DE MAÍZ (<i>Zea mays</i> L.).....	18
1.1. Resumen.....	18
1.2. Introducción	19
1.3. Materiales y métodos	21
1.4. Resultados y discusión.....	24
1.5. Conclusiones.....	31
1.6. Agradecimientos	31
1.7. Literatura citada	31
CAPÍTULO 2. QTLs ASOCIADOS AL CONTENIDO DE CAROTENOS EN GRANOS DE MAÍZ (<i>Zea mays</i> L.)	37
2.1. Resumen.....	37
2.2. Introducción	38
2.3. Materiales y métodos	41
2.4. Resultados y discusión.....	44
2.5. Conclusiones.....	56
2.6. Agradecimientos	56
2.7. Literatura citada	56
CONCLUSIONES GENERALES.....	61
PERSPECTIVAS.....	61
ANEXO	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
Cuadro 1. 1	Contenido de carotenos en hojas de diferentes especies y plantas de diferentes edades	24
Cuadro 1. 2	QTLs para carotenos medidos en hoja de maíz de IBM-RILs	27
Cuadro 1.3	Genes de la ruta de los carotenos en el genoma completo de maíz (B73).....	30
Cuadro 2. 1	Genes y mutantes de la ruta de los carotenos en el genoma de maíz B73	42
Cuadro 2. 2	Contenido de carotenos en grano maíz obtenidos en este estudio y comparación con otras fuentes.....	45
Cuadro 2. 3	Correlaciones de Pearson entre diferentes tipos de carotenos en grano	46
Cuadro 2. 4	QTLs de luteína medidos en grano de maíz de IBM-RILs.....	48
Cuadro 2. 5	QTLs de β -caroteno medidos en grano de maíz de IBM-RILs	49
Cuadro 2. 6	QTLs de β -criptoxantina medidos en grano de maíz de IBM-RILs	49
Cuadro 2. 7	QTLs de zeaxantina medidos en grano de maíz de IBM-RILs.....	50
Cuadro 2. 8	QTLs de provitamina A medidos en grano de maíz de IBM-RILs	50
Cuadro 2. 9	QTLs de total carotenos medidos en grano de maíz de IBM-RILs	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 1.	Ciclo de las xantofilas.	6
Figura 2.	Estructura del complejo del centro de reacción del fotosistema II.	7
Figura 3.	Estructura del complejo de cosecha de luz II de la espinaca.	7
Figura 4.	Síntesis de β -caroteno y α -caroteno a partir de licopeno..	8
Figura 1.1	Ruta mevalónica independiente de los tetraterpenoides.	20
Figura 1.2	Contenido de compuestos carotenoides en hojas de las IBM-RILs.	25
Figura 2.1	Ruta mevalónica independiente de los tetraterpenoides.	39
Figura 2.2	Contenido de compuestos carotenoides en granos de maíz de IBM-RILs.	45
Figura 2.3	QTLs de grano de las IBM-RILs.	53

ÍNDICE DE CUADROS DEL ANEXO

Figura	Título	Página
Cuadro A 1	Posición física de los marcadores significativos para los QTLs de grano	63

ÍNDICE DE FIGURAS DEL ANEXO

Figura	Título	Página
Figura A 1	Fenotipos deficientes en carotenos en maíz	65
Figura A 2	Representación de cromosomas 1 al 5 con marcadores y QTLs.	66
Figura A 3	Representación de cromosomas 6 al 8 con marcadores y QTLs.	67

INTRODUCCIÓN GENERAL

El maíz es un cultivo básico a nivel mundial, el cual ha sido ampliamente estudiado en los últimos años, en ámbitos tan diversos como su origen (Kato, 2009), evolución (Gallagher *et al.*, 2004), razas (Wellhausen *et al.*, 1952), distribución (Mera O., 2009) y mejoramiento (Hallauer, 1992). Además, se han desarrollado nuevas variedades o híbridos con ventajas agronómicas.

En 2009 se dio a conocer la secuencia completa de la línea de maíz B73 (Schnable *et al.*, 2009), la cual se puede encontrar en dos bases de datos principalmente: maizeGDB (<http://www.maizegdb.org/>) (Sen *et al.*, 2010) y Maizesequence (<http://www.maizesequence.org>). Las bases de datos anteriores compilan información fenotípica, marcadores moleculares y diversa información sobre el maíz. Esta información es de acceso libre y susceptible de ser utilizada por los investigadores para generar innovaciones que contribuyan a mejorar la alimentación de la población, valor nutritivo y rendimiento del cultivo.

El estudio del mejoramiento del rendimiento en maíz es un factor ampliamente discutido e involucra muchos aspectos de la planta; uno de ellos es la tasa fotosintética (Ding *et al.*, 2007). En el proceso de la fotosíntesis un aspecto primordial es la foto-oxidación (Stahl y Sies, 2003). Si la planta puede soportar mayor cantidad de luz, ésta no disminuirá su tasa fotosintética y por ende su rendimiento (Parry *et al.*, 2011). Los carotenos son pigmentos que se encuentran en los plástidos de las hojas de las plantas y son los encargados de evitar este daño lumínico (Martin, 1995), de ahí la importancia de su estudio en plantas de maíz.

Algunos carotenos proporcionan un valor nutritivo cuando son consumidos por el ser humano, ya que son precursores de la vitamina A (provitamina A). Su función es similar al de las hojas en las plantas pero en la parte ocular. La provitamina A protege a los ojos contra la luz y permite una mejor visibilidad. Personas deficientes en esta vitamina pueden llegar a presentar ceguera o xeroftalmia (Schalch *et al.*, 2009).

Una manera de aprovechar la nueva tecnología e información generada a través de varios años sobre el maíz, la constituye la técnica denominada *loci* de caracteres cuantitativos (QTLs).

Esta técnica explota el ligamiento a nivel cromosómico y relaciona marcadores moleculares y un fenotipo bajo estudio con el fin de encontrar regiones cromosómicas relacionadas a dicho fenotipo (Collard *et al.*, 2005).

En la literatura actual no existen estudios sobre QTLs en hojas de maíz asociados a carotenos y se conoce poco sobre el contenido de carotenos en este tejido. En grano, aún se requiere estudiar el contenido de carotenos, y localizar regiones cromosómicas adicionales a las reportadas en la bibliografía. Por lo anterior, los objetivos e hipótesis de esta investigación son los siguientes:

1. Objetivos

- 1.1. Analizar el contenido de luteína, α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina y total de carotenos en hojas de maíz e identificar regiones cromosómicas asociadas al contenido de carotenos en este tejido.
- 1.2. Evaluar el contenido de luteína, β -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina, provitamina A y total de carotenos en granos de maíz, e identificar regiones cromosómicas y genes candidatos asociados al contenido de carotenos.

2. Hipótesis

- 2.1. En hoja, β -caroteno se presenta en mayor cantidad que en grano, y las regiones cromosómicas involucradas en el contenido de carotenos en hoja son diferentes a las que existen en grano.
- 2.2. En grano, luteína y zeaxantina son los carotenoides presentes en mayor cantidad, y las líneas recombinantes de este estudio presentan nuevas regiones cromosómicas relacionadas con la ruta de los carotenos.

Con el fin de abordar el tema de investigación y dar cumplimiento a los objetivos planteados y contrastar las hipótesis, la tesis se estructuró, además de las secciones de Introducción General y Conclusiones Generales, en dos capítulos, presentados en el formato de artículos científicos. En el primer capítulo se discute la importancia de los carotenos en las hojas debido a que disipan la energía lumínica utilizada para la fotosíntesis en las plantas, lo cual está relacionado con la tasa fotosintética y el rendimiento de los cultivos. Se determinaron los contenidos de diferentes carotenoides y se relacionaron con marcadores moleculares mediante la técnica de QTLs, definiéndose regiones cromosómicas asociadas con el contenido de carotenos. El segundo capítulo está basado en el estudio de los carotenos en el grano por ser precursores de la vitamina A y esenciales en la alimentación humana. Se evaluó el contenido de distintos carotenos y se vincularon con marcadores moleculares para distinguir QTLs o regiones cromosómicas relacionadas con el contenido de carotenos.

3. Revisión de literatura

3.1. Importancia del maíz

El maíz se originó y se dispersó de la región central de la cuenca del río Balsas en México (Matsuoka *et al.*, 2002). Este cultivo cuenta con una gran diversidad genética, y hasta el año 2000 se habían reportado 59 razas mexicanas (Sanchez *et al.*, 2000). Actualmente, el maíz es el cultivo básico más importante en México y de suma importancia en el resto del mundo. El promedio anual de producción mundial es de 5.1 t ha⁻¹, y destaca Estados Unidos con el mayor rendimiento, 10.3 t ha⁻¹. México se ubica como uno de los principales países productores con menores rendimientos (2.8 t ha⁻¹) (FAOSTAT, 2011).

En México, anualmente se consumen alrededor de 11 millones de toneladas de maíz blanco en forma de tortillas, elaboradas mediante el proceso tradicional o utilizando harina de maíz. En los hogares mexicanos, el maíz es un producto básico, que se consume principalmente en forma de tortilla y platillos diversos. De acuerdo con la Cámara Nacional del Maíz Industrializado, el consumo *per capita* anual de tortilla de la población nacional es el proveniente de 105 kg de maíz. De hecho, el mexicano obtiene 47% de las calorías diarias del maíz consumido en tortilla.

La importancia del maíz en la alimentación del pueblo mexicano va más allá de su contribución a la dieta y a la economía familiar, pues es origen de nuestras tradiciones y costumbres, conforma la cultura ancestral y nos identifica como nación (Polanco y Flores, 2008).

El maíz es utilizado desde su grano, hoja, tallo y espigas. Todas las partes de la planta, incluyendo raíces, sirven como abono o combustible. La caña se usa en la fabricación de artesanías y en la construcción. La hoja sirve como envoltura de tamales y cigarros, para fabricar objetos rituales o artesanales. El olote se emplea como combustible, alimento para animales y como herramienta para desgranar mazorcas. Se consume en tortilla, elotes, pozole, esquites; se prepara en huitlacoche, tostadas, tamales, y se elaboran bebidas como el atole y el tejate, además de algunas que son embriagantes a partir de grano fermentado (Esteva, 2003).

En muchos países en desarrollo con altos niveles de pobreza, incluyendo numerosas regiones de México, el cultivo del maíz es una fuente importante para la nutrición de las familias. Aunque desde la perspectiva nutricional el maíz es superior a muchos otros cereales, su contenido de proteínas y vitaminas es deficiente, razón por la cual se explica el interés de los gobiernos nacionales por el desarrollo de variedades de alta calidad proteínica, denominados QPM, por sus siglas en inglés, que contribuyan a superar la desnutrición (Polanco y Flores, 2008). De igual forma es deficiente en contenido vitamínico, que unido a toda la importancia del maíz, sigue siendo esencial y justificada la investigación científica en este cultivo tan básico de México y el mundo, en específico del incremento de su valor nutritivo.

3.2. Importancia y función de los carotenos

3.2.1. En las plantas

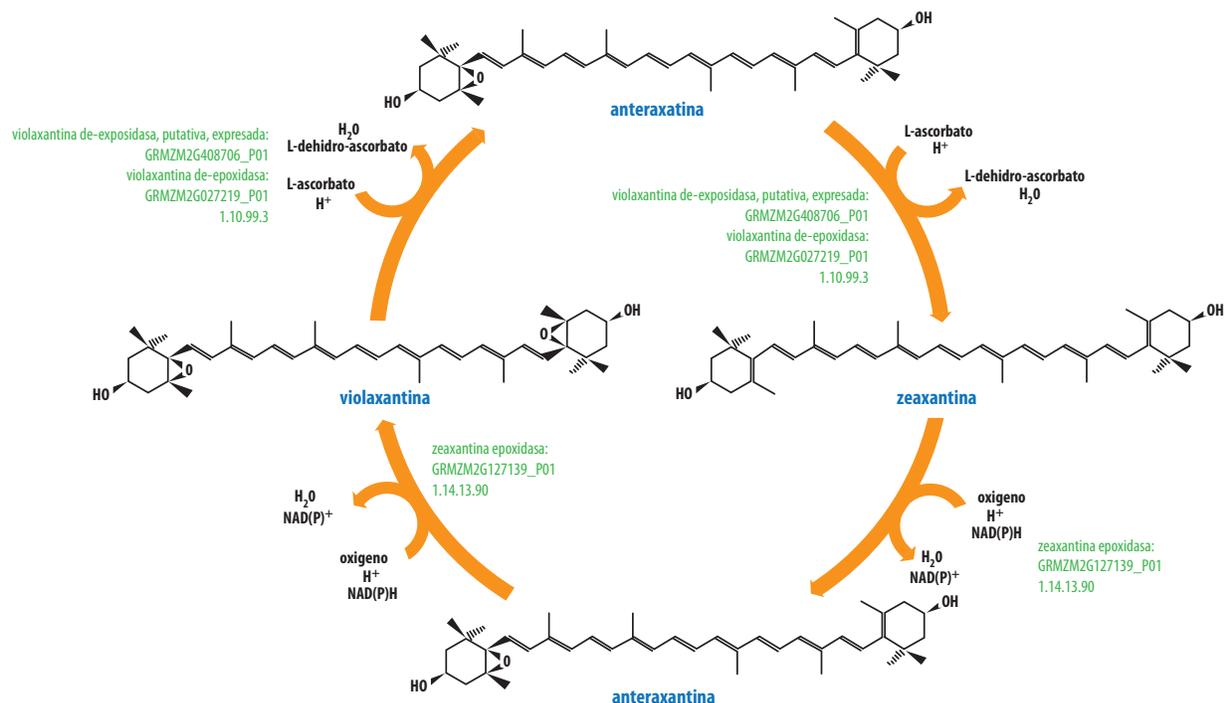
Los carotenos son pigmentos orgánicos que se producen predominantemente en organismos fotosintéticos. En las plantas se observan en un espectro de color amarillo a rojo, debido a su estructura molecular lineal de C_{40} con más de 11 enlaces dobles, lo que determina la máxima excitación y emisión para dar como resultado dicho espectro de colores. En las plantas se pueden apreciar principalmente en flores, frutos y órganos de almacenamiento. Estos pigmentos isoprenoides, están involucrados en la fotosíntesis durante la cosecha de luz y la foto-

oxidación; además, son precursores de moléculas de señalización en la respuesta a estrés biótico y abiótico (Farré *et al.*, 2010).

En las hojas verdes, los carotenos están enmascarados por la clorofila de color verde, pero cuando ésta se degrada en el otoño se pueden observar los pigmentos amarillo-anaranjado, esenciales en la fotosíntesis oxigénica (Telfer *et al.*, 2008).

Los organismos fotosintéticos son muy diversos y tienen una amplia variedad de complejos proteínicos que contienen clorofilas y pigmentos accesorios como carotenos y ficobilinas. Hay dos grandes complejos proteínicos de clorofila: (i) antena cosechadora de luz (LH), donde varias moléculas de clorofila transfieren energía dentro y entre diferentes tipos de complejos, y (ii) centro de reacción (RC), donde se catalizan las primeras reacciones fotoquímicas y transferencia de electrones. Los organismos oxigénicos (plantas superiores, algas y cianobacterias) utilizan el agua como fuente de electrones y las reacciones ocurren en los fotosistemas I y II (PSI, PSII) (Telfer *et al.*, 2008).

La disipación no fotosintética es un mecanismo presente en la mayoría de los organismos oxigénicos, en donde los carotenos disipan el exceso de la energía al liberar calor sin provocar algún daño, así se disminuye la sobre reducción en el lado aceptor de electrones de RC del PSII (Siefermann-Harms, 1987). La disipación de energía está ampliamente influenciada por el ciclo de las xantofilas, las cuales regulan o limitan la luz a través de la de-epoxidación, donde se remueven dos oxígenos de los grupos epoxi de la violaxantina, lo que resulta en un sistema de nueve enlaces dobles, en 10 de anteraxantina y en 11 de zeaxantina. Este proceso puede durar desde minutos hasta días, según el estrés al que esté sometida la planta (Demmig-Adams y Adams III, 1996) (Figura 1).



Fuente: <http://pathway.gamene.org/MAIZE/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-1141&detail-level=3>.
 Consulta: 05/04/2011.

Figura 1. Ciclo de las xantofilas.

El centro de reacción del PSII contiene dos moléculas de β -caroteno. Su localización ha sido muy debatida; sin embargo, observaciones espectroscópicas ubican a una molécula casi horizontal en el plano de la membrana (Car_{507}) y a otra perpendicular a este plano (Car_{489}). La última estructura de rayos X a 3.0 Å ubica a Car_{507} de lado de la proteína D2 y a Car_{489} de la proteína D1 (Loll *et al.*, 2005) como se muestra en la Figura 2 de una estructura de *Thermosynechococcus elongatus* (Protein Data Bank, número 2AXT). En la parte izquierda de esta figura se observan las hélices α de la transmembrana que encierra a los pigmentos y en la derecha se observan los cofactores que contienen dos carotenos (Car).

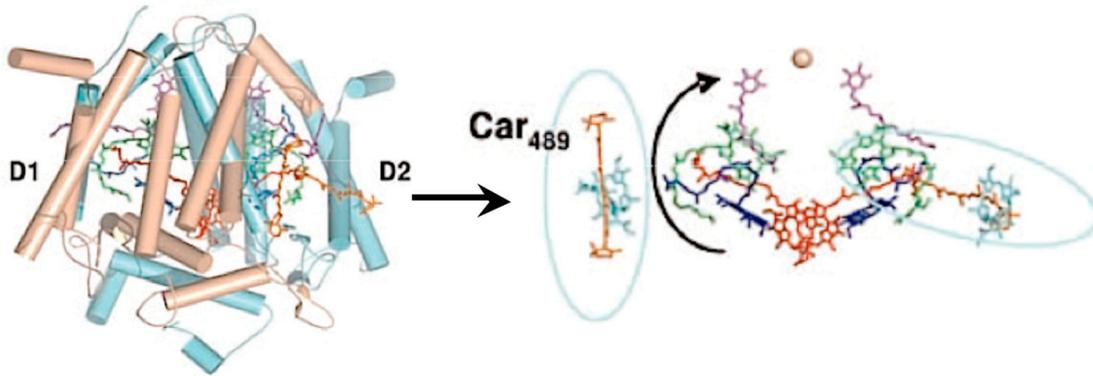


Figura 2. Estructura del complejo del centro de reacción del fotosistema II.

El complejo de cosecha de luz II (LHCII) está asociado con PSII, la estructura cristalizada del complejo de cosecha de luz II de la espinaca (*Spinacia oleracea*) (Protein Data Bank, número 1RWT) se puede ver en la Figura 3. Cada monómero tiene tres hélices, unión a ocho clorofilas *a*, seis clorofilas *b* (color verde), dos luteínas (color naranja), una neoxantina (color morado) y una xantofila (color magenta). Las antenas CP47 y CP43 del PSII están formadas por seis hélices transmembránicas, las cuales en plantas y algas verdes sólo permiten la unión de la clorofila *a* y β -caroteno, que actúan como intermediarios entre la antena y la luz capturada por LHC, en total contiene 35-36 clorofilas *a* y 11 carotenos por cada RC. La antena del PSI es más compleja, pues además de las seis hélices contiene más de 90 clorofilas *a* y 22 carotenos por cada RC. Todos los carotenos están unidos a las clorofilas por enlaces de vander Waals, lo que asegura una buena transferencia de energía entre los dos tipos de pigmentos, una eficiente cosecha de luz y fotoprotección (Telfer *et al.*, 2008).

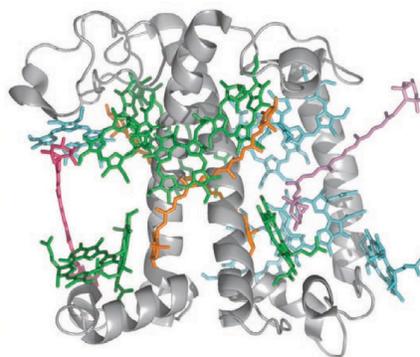


Figura 3. Estructura del complejo de cosecha de luz II de la espinaca.

Debido a que en las hojas de las plantas los carotenos son esenciales en la disipación de energía durante la fotosíntesis, las plantas con capacidad de incrementar dicha fotoprotección o de recuperarla fácilmente después de un alto estrés lumínico, representan una alternativa en el mejoramiento genético debido a la relación directa entre fotosíntesis y rendimiento (Parry *et al.*, 2011).

3.2.2. En los animales

Los animales no pueden sintetizar carotenos pero pueden adquirirlos a través de su dieta. Los cuatro carotenos: β -caroteno, α -caroteno, γ -caroteno y β -criptoxantina, son precursores de la vitamina A en humanos, lo que significa que pueden convertirse en retinol, como se muestra en cuadros punteados en la figura 4. El β -caroteno, está presente en una amplia variedad de frutas con colores de amarillo a anaranjado, en vegetales verde-oscuros y amarillos como brócoli, espinaca, nabo verde, zanahoria, camote y calabaza. Otras fuentes de vitamina A son el hígado, la leche, la mantequilla, el queso y el huevo. La vitamina A es importante en el crecimiento normal del cuerpo y en la reparación del tejido; además, el sistema inmunológico y la visión dependen particularmente de esta vitamina (Farré *et al.*, 2010).

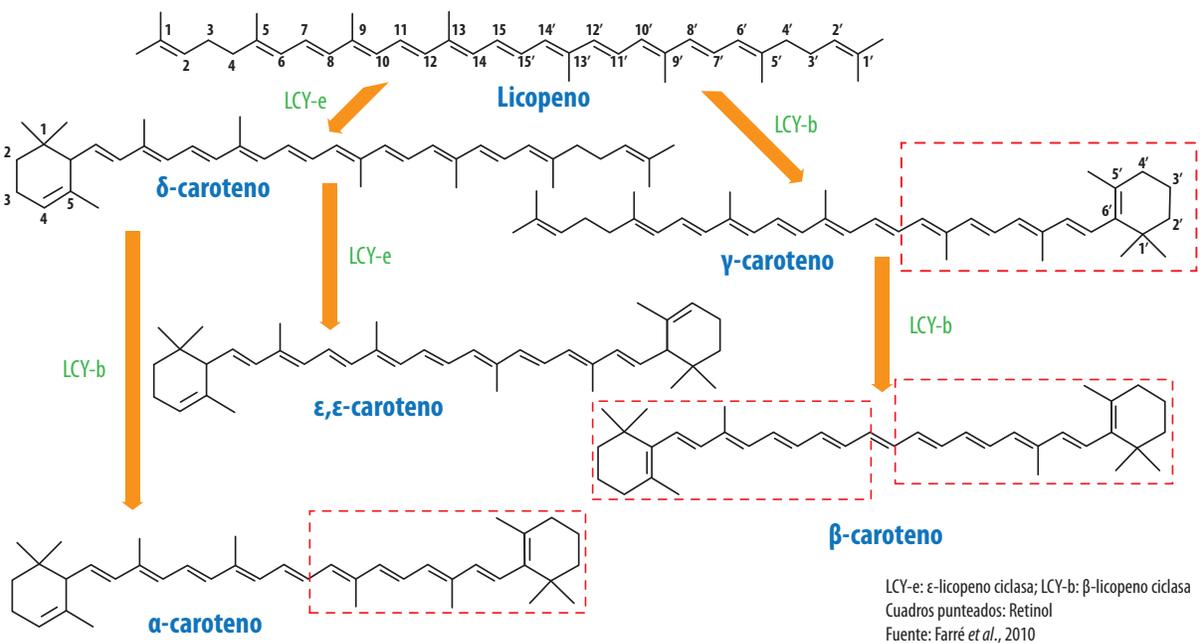


Figura 4. Síntesis de β -caroteno y α -caroteno a partir de licopeno.

Más de 840 millones de personas en el mundo carecen de los alimentos requeridos para cubrir sus necesidades básicas nutrimentales, y tres mil millones de personas sufren deficiencias micronutrientales. Los principales afectados son mujeres y niños en las regiones del Sub-Sahara de África, Sur y Sureste de Asia, Latinoamérica y el Caribe, quienes son susceptibles a enfermedades por falta de los micronutrientes esenciales, básicamente de hierro, vitamina A, yodo y zinc (Pfeiffer y McClafferty, 2007).

En México, se estima que cerca de 45 millones de personas presentan deficiencias nutrimentales. Las mayores prevalencias de deficiencia de vitamina A se reportaron en los niños de las zonas rurales, en donde se observó en 26.9% de los menores de 12 años, siendo el grupo inferior a los 6 años el más afectado. Se estimó también deficiencia de vitamina A en las mujeres en edad fértil y en las mujeres embarazadas (FAO, 2003).

Una causa de la deficiencia nutrimental es la mala alimentación que predomina actualmente, y es que se consumen indiscriminadamente productos de bajo valor nutricional. Se calcula que 22.3 millones de mexicanos que radican en zonas rurales padecen enfermedades relacionadas con la desnutrición, porque basan su alimentación en productos de bajo aporte nutricional, como es el maíz, lo cual implica gastos anuales del orden de 56 mil millones de pesos y ocasiona la muerte de cerca de 200 mil personas al año (Fuentes, 2008).

Una alternativa de solución al problema de la desnutrición es la biofortificación de productos básicos como el maíz. En este rubro se han hecho experimentos de biofortificación de tortillas, comprobando que con ellas se incrementa la cantidad total de ADN cerebral y número de neuronas, además de presentar menores índices de anemia y mejorar la fertilidad, demostrando así la importancia de una buena alimentación en los seres vivos (Stylianopoulos *et al.*, 2002). Además, se sugiere el uso del mejoramiento genético para la obtención de variedades con altos contenidos de carotenos precursores de la vitamina A, y es precisamente en este punto donde pueden incidir los resultados del presente estudio.

3.3. Biosíntesis de carotenos y genes implicados

Los carotenos son tetraterpenoides y pueden comprender ocho precursores isoprenoides C₅ condensados que generan una estructura molecular lineal de C₄₀. En plantas, esta reacción de

condensación involucra el precursor isomérico isopentenil bifosfato (IPP) y el dimetilalil bifosfato (DMAPP) que ocurre *de novo* dentro de los plástidos. IPP y DMAPP se derivan predominantemente de la ruta plastidial metileritritol 4-fosfato (MEP), aunque los mismos precursores se forman en la ruta de ácido mevalónico (MVA) citosólico (Farré *et al.*, 2010).

La formación de carotenoides por la vía mevalónica (MVA) independiente se lleva a cabo con la unión del piruvato y el grupo aldehído del grupo *D*-gliceraldehido 3 fosfato (G3P), dando como resultado 1-deoxi-*D*-xilulosa 5-fosfato (DXP). Dicho compuesto sufre diferentes modificaciones hasta formar 1-hidroxi-2-metil-2-(*E*)-butenil 4 fosfato (HMBPP), del cual se deriva el isopentenil bifosfato (IPP) y el dimetilalil bifosfato (DMAPP). La condensación de IPP y DMAPP genera una molécula C₁₀ denominada geranil pirofosfato (GPP). Por adiciones sucesivas de IPP se forma el geranil-geranil difosfato (GGPP), por la unión de 2 GGPP, la eliminación de un grupo bifosfato y un reacomodo esteroespecífico se forma el fitoeno (C₄₀) (Fraser y Bramley, 2004).

A través de cuatro desaturaciones el fitoeno incoloro se convierte en licopeno con su característico color rojizo, por acción de la luz o precursores de cloroplastos continúa un proceso de isomerización para pasar del fitoeno 15-*cis* al licopeno all-*trans*. Generalmente, el licopeno es precursor de la ciclación, la cual inicia con el ataque nucleofílico al C-2 terminal del doble enlace C-1,2. De esta manera, se forman dos tipos de ciclos: α y β -ionona, los cuales se diferencian por la posición del doble enlace dentro del anillo del ciclohexano. Se han encontrado dos tipos de ciclasas importantes en plantas superiores: la licopeno- ϵ -ciclasa (LCY-E) que introduce los anillos- ϵ , y la licopeno- β -ciclasa (LCY-B) que introduce los anillos β . De manera interesante, LCY-B puede catalizar la introducción de dos anillos- β al licopeno para formar β -caroteno vía δ -caroteno; sin embargo, LCY-E sólo puede incorporar un anillo- ϵ . Para la formación de α -caroteno deben interactuar ambas ciclasas. Se ha sugerido que la incapacidad de la ciclasa- ϵ de no poder añadir más que un anillo - ϵ provee un mecanismo de control en la formación cíclica de carotenoides (Fraser y Bramley, 2004).

En las plantas superiores las xantofilas son formadas enzimáticamente de la oxidación de α y β caroteno. La hidroxilación del C-3 y C-3' resulta en la formación de luteína vía α -criptoxantina y zeaxantina vía β -criptoxantina, y la catálisis es realizada por hidroxilasas. Los precursores

directos del ácido abscísico (ABA) son las zeaxantinas, violaxantinas y neoxantinas. La división oxidativa de 9-*cis*-epoxicarotenoides es la principal reacción específica de biosíntesis de ABA a partir de la cual se obtienen las xantoxinas, las cuales son transportadas al citoplasma para ser convertidas en aldehído abscísico y después de una oxidación en ABA (North *et al.*, 2007).

En maíz existen mutantes con genes involucrados en la ruta de los carotenos analizados en grano y hoja. El mutante *yellow 1* (*y1*) con endospermo blanco a amarillo pálido con hojas verdes o verde pálido (Figura 1A) (Buckner *et al.*, 1990) está asociado con la fitoeno sintasa (Buckner *et al.*, 1996).

El mutante *viviparous 2* (*vp2*) y *viviparous 5* (*vp5*) presentan el endospermo blanco, son deficientes en carotenos y ABA, lo que se refleja en una germinación prematura del grano. Están asociados a la fitoeno desaturasa (PDS), responsable de dos pasos de desaturación para convertir el fitoeno a ζ -caroteno. *Vp2* mostró niveles de proteína y transcrito de PDS similares a una planta silvestre (no mutante), mientras que *vp5* no presentó dicha proteína y mostró niveles bajos de transcrito, lo cual indica que *vp5* codifica PDS y *vp2* sólo puede estar involucrado en otro mecanismo que regule la actividad de esta enzima (Li *et al.*, 1996; Hable *et al.*, 1998).

El mutante *white seedling 3* (*w3*) tiene endospermo blanco, sus plántulas son blancas, algunas veces vivíparo; el alelo *w3-8686* presenta dormancia, endospermo blanco y plántulas verde pálido al crecer con luz tenue. Presenta acumulación de fitoeno, fitoflueno, ζ -caroteno. (Li *et al.*, 1996; Andorf *et al.*, 2010).

El mutante *viviparous 9* (*vp9*) presenta el endospermo blanco, está asociado a la ξ -caroteno desaturasa, responsable de dos pasos de saturación de la ζ -caroteno a licopeno (Matthews *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007).

Algunas enzimas importantes de la ruta de los carotenoides en maíz no han sido clonadas. Sobresale la licopeno β -ciclase y ϵ -ciclase, las cuales convierten una cadena recta de licopeno en β - y α -caroteno al añadir dos anillos β al β -caroteno y un anillo β y uno ϵ al α -caroteno.

El locus de la ϵ -ciclase licopeno altera el flujo del α -caroteno a la vía por β -caroteno. Cuatro polimorfismos explicaron el 58% de la variación de estas ramas y tres veces la diferencia de los

componentes de la provitamina A. La selección favorable de los alelos *lcyE* con marcadores moleculares permitiría desarrollar mejoramientos más efectivos en la producción de maíz con altos contenidos de provitamina A (Harjes *et al.*, 2008). Por lo anterior aún se requiere estudiar y analizar las enzimas de los carotenos y otras posibles isoformas que puedan estar relacionadas con la producción de provitamina A.

3.4. Loci de Caracteres Cuantitativos (QTLs)

El maíz cuenta con 10 cromosomas y más de 2000 marcadores disponibles en la red; además, se ha publicado la secuencia del genoma de la línea de maíz B73 (Schnable *et al.*, 2009). Esta información constituye un gran soporte para realizar investigación de mejoramiento genético a través de selección asistida por marcadores con base en la búsqueda de regiones cromosómicas relacionadas con un fenotipo mediante la técnica de QTLs, lo que puede conducir a un mejor entendimiento del funcionamiento de este importante cultivo.

La técnica de QTLs se basa en el ligamiento genético entre marcadores moleculares y genes responsables de la expresión de un carácter, distinguiendo así regiones de un genoma que contienen los genes asociados a la característica cuantitativa de interés, determinando dicha asociación con ayuda de métodos estadísticos. Así, la selección favorable de alelos de enzimas de la ruta de los carotenos a través de marcadores moleculares es importante para desarrollar metodologías de mejoramiento más efectivas en la producción de maíz con altos contenidos de provitamina A (Collard *et al.*, 2005).

Gracias a técnicas de QTLs se han identificado tres principales regiones que regulan el contenido de carotenos en maíz (Wong *et al.*, 2004); en una de ellas se encontró el locus de la *Lyc-E*, la cual altera el flujo del α -caroteno a la vía de β -caroteno (Harjes *et al.*, 2008). Sin embargo, aún se carece de suficiente información tanto en granos como otros tejidos del maíz (*e.g.* hojas) que están altamente relacionadas a los carotenos y pudieran dar información básica para el estudio en grano.

4. Literatura citada

- Andorf, C. M., C. J. Lawrence, L. C. Harper, M. L. Schaeffer, D. A. Campbell, and T. Z. Sen. 2010. The locus lookup tool at MaizeGDB: identification of genomic regions in maize by integrating sequence information with physical and genetic maps. *Bioinformatics* 26(3): 434-436.
- Buckner, B., T. L. Kelson, and D. S. Robertson. 1990. Cloning of the *yl* locus of maize, a gene involved in the biosynthesis of carotenoids. *Plant Cell* 2(9): 867-876.
- Buckner, B., P. San Miguel, D. Janick-Buckner, and J. L. Bennetzen. 1996. The *yl* gene of maize codes for phytoene synthase. *Genetics* 143(1): 479-488.
- Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer, and E. C. K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142(1): 169-196.
- Demmig-Adams, B., and W. W. Adams III. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1(1): 21-26.
- Ding, L., K. Wang, G. Jiang, M. Liu, and L. Gao. 2007. Photosynthetic rate and yield formation in different maize hybrids. *Biologia Plantarum* 51(1): 165-168.
- Esteva, G. 2003. Los Árboles de las Culturas Mexicanas. *In*: Esteva, G. and C. Marielle (comps). Sin Maíz No Hay País. CONACULTA. Museo Nacional de las Culturas Populares. México, D. F. pp: 17-28
- FAO. 2003. Perfiles Nutricionales por Países-México. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 45 p.
- FAOSTAT. 2011. Datos de producción y área cosechada en el cultivo de maíz en 2009. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor>).
Consulta:12/04/11

- Farré, G., G. Sanahuja, S. Naqvi, C. Bai, T. Capell, C. Zhu, and P. Christou. 2010. Travel advice on the road to carotenoids in plants. *Plant Science* 179(1-2): 28-48.
- Fraser, P. D., and P. M. Bramley. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* 43(3): 228-265.
- Fuentes, M. L. 2008. Obesidad y desnutrición: Problema infantil de peso. México. Periódico Excelsior. http://www.excelsior.com.mx/index.php?m=nota&buscado=1&id_nota=580527. Consulta: 30/05/2011
- Gallagher, C. E., P. D. Matthews, F. Li, and E. T. Wurtzel. 2004. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. *Plant Physiology* 135(3): 1776-1783.
- Hable, W. E., K. K. Oishi, and K. S. Schumaker. 1998. *Viviparous-5* encodes phytoene desaturase, an enzyme essential for abscisic acid (ABA) accumulation and seed development in maize. *Molecular and General Genetics* 257(2): 167-176.
- Hallauer, A. R. 1992. Recurrent selection in maize. *Plant Breeding Reviews* 9: 115-179.
- Harjes, C. E., T. R. Rocheford, L. Bai, T. P. Brutnell, C. Bermudez Kandianis, S. G. Sowinski, A. E. Stapleton, R. Vallabhaneni, M. Williams, E. T. Wurtzel, J. Yan, and E. S. Buckler. 2008. Natural genetic variation in *Lycopene Epsilon Cyclase* tapped for maize biofortification. *Science* 319(5861): 330-333.
- Kato Y., T. A. 2009. Teorías sobre el origen del maíz. *In*: Kato Y., T. A., C. Mapes S., L. M. Mera O., J. A. Serratos H. and R. A. Bye B. (comps). *Origen y Diversificación de Maíz: Una Revisión Analítica*. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. pp: 43-68.
- Li, F., C. Murillo, and E. T. Wurtzel. 2007. Maize *Y9* encodes a product essential for 15-cis- ζ -carotene isomerization. *Plant Physiology* 144(2): 1181-1189.

- Li, Z. H., P. D. Matthews, B. Burr, and E. T. Wurtzel. 1996. Cloning and characterization of a maize cDNA encoding phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Molecular Biology* 30(2): 269-279.
- Loll, B., J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, and J. Biesiadka. 2005. Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* 438(7070): 1040-1044.
- Martin, H. D. 1995. The function of natural colorants: the biochromes. *CHIMIA International Journal for Chemistry* 49(3): 45-68.
- Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M. M. Goodman, J. Sanchez G., E. Buckler, and J. Doebley. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(9): 6080-6084.
- Matthews, P. D., R. Luo, and E. T. Wurtzel. 2003. Maize phytoene desaturase and ζ -carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *Journal of Experimental Botany* 54(391): 2215-2230.
- Mera O., L. M. 2009. Diversificación y distribución reciente del maíz en México. *In*: Kato Y., T. A., C. Mapes S., L. M. Mera O., J. A. Serratos H. and R. A. Bye B. (comps). *Origen y Diversificación del Maíz: Una Revisión Analítica*. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. pp: 69-82.
- North, H. M., A. De Almeida, J. P. Boutin, A. Frey, A. To, L. Botran, B. Sotta, and A. Marion-Poll. 2007. The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant Journal* 50(5): 810-824.

- Parry, M. A. J., M. Reynolds, M. E. Salvucci, C. Raines, P. J. Andralojc, X.-G. Zhu, G. D. Price, A. G. Condon, and R. T. Furbank. 2011. Raising yield potential of wheat. II. Increasing photosynthetic capacity and efficiency. *Journal of Experimental Botany* 62(2): 453-467.
- Pfeiffer, W. H., and B. McClafferty. 2007. HarvestPlus: breeding crops for better nutrition. *Crop Science* 47(S3): S88-S105.
- Polanco, J. A., and M. T. Flores. 2008. Bases para una Política de I&D e Innovación de la Cadena de Valor del Maíz. . Foro Consultivo Científico y Tecnológico, A.C. México, D.F. 244 p.
- Sanchez G., J. J., M. Goodman, and C. Stuber. 2000. Isozymatic and Morphological Diversity in the Races of Maize of Mexico. *Economic Botany* 54(1): 43-59.
- Schalch, W., J. T. Landrum, and R. A. Bone. 2009. The eye. *In*: Britton, G., S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (eds). *Carotenoids. Vol. 5. Nutrition and Health*. Birkhauser Verlag. Basel, Switzerland. pp: 301-334.
- Schnable, P. S., *et al.* 2009. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326(5956): 1112-1115.
- Sen, T. Z., L. C. Harper, M. L. Schaeffer, C. M. Andorf, T. E. Seigfried, D. A. Campbell, and C. J. Lawrence. 2010. Choosing a genome browser for a Model Organism Database: surveying the Maize community. *Database (Oxford)* 2010 doi:10.1093/database/baq1007.
- Siefermann-Harms, D. 1987. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiologia Plantarum* 69(3): 561-568.
- Stahl, W., and H. Sies. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med* 24(6): 345-351.
- Stylianopoulos, C., S. O. Serna S., and G. Arteaga M. 2002. Effects of fortification and enrichment of maize tortillas on growth and brain development of rats throughout two Generations. *Cereal Chemistry* 79(1): 85-91.

Telfer, A., A. Pascal, and A. Gall. 2008. Carotenoids in photosynthesis. *In*: Britton, G., S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (eds.). Carotenoids. Vol. 4. Natural Functions. Birkhauser Verlag. Basel, Switzerland. pp: 265-308.

Wellhausen, E. J., L. M. Roberts, E. Hernández X, and P. C. Mangelsdorf. 1952. Races of maize in Mexico; their Origin, Characteristics and Distribution. Bussey Institution of Harvard University. Cambridge, MA. 237 p.

Wong, J. C., R. J. Lambert, E. T. Wurtzel, and T. R. Rocheford. 2004. QTL and candidate genes phytoene synthase and ζ -carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 108(2): 349-359.

CAPÍTULO 1. QTLs ASOCIADOS AL CONTENIDO DE CAROTENOS EN HOJAS DE MAÍZ (*Zea mays* L.)¹

1.1. Resumen

Los carotenos son pigmentos antioxidantes que captan fotones dentro del espectro de luz visible y protegen a los tejidos de las plantas contra la foto-oxidación, lo cual está relacionado con la tasa fotosintética y rendimiento de los cultivos. La biosíntesis de los carotenos ocurre dentro de los plástidos, donde se sintetizan a partir de la vía mevalónica independiente y en la cual participan más de 10 enzimas y un número de factores aún no determinado. Con el objetivo de identificar regiones cromosómicas de maíz (*Zea mays* L.) asociadas al contenido de carotenos, se midió el contenido de estos compuestos en hojas de 200 líneas endogámicas recombinantes de maíz de la cruz B73 × Mo17 sembradas en Irapuato, México, en el ciclo primavera-verano 2009. Los QTLs localizados fueron para luteína, α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina. El caroteno presente en mayor cantidad en las hojas fue β -caroteno (80 % del total de carotenos) y el menor β -criptoxantina (0.2 %). Se detectaron 21 QTLs significativos en los cromosomas 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8. En el bin 1.07 se localizó un QTL altamente significativo ($p \leq 0.001$) con valor aditivo alto para luteína ($-89.16 \mu\text{g g}^{-1}$ PMS, $r^2=0.07$), α -caroteno ($-25.41 \mu\text{g g}^{-1}$ PMS, $r^2=0.07$) y β -caroteno ($-674.98 \mu\text{g g}^{-1}$ PMS, $r^2=0.09$). Un QTL de β -criptoxantina en el cromosoma 8 se detectó con el marcador *psy2* que es parálogo de la enzima fitoeno sintasa, y otro coincidió con un QTL evaluado para ácido abscísico, relacionado al gen *caroteno dioxigenasa*. Se infiere que en el genoma de maíz existen muchos factores aún no identificados relacionados al contenido de carotenos en hojas verdes y los nuevos QTLs identificados en este estudio podrían ayudar a encontrar nuevos genes o factores que determinan el contenido de carotenos en hojas de maíz.

Palabras Clave: Gramíneas, Loci de Caracteres Cuantitativos, carotenoides, follaje.

¹ Enviado para su publicación como artículo científico en la revista Agrocencia

1.2. Introducción

Los carotenoides son pigmentos naturales de color amarillo a rojo producidos por los organismos autótrofos (Farré *et al.*, 2010), los cuales son relevantes en la nutrición humana y animal (Pfeiffer y McClafferty, 2007). En las plantas, los carotenoides están involucrados en la fotosíntesis, ya sea como antenas accesorias durante la cosecha de luz, o como antioxidantes que protegen las membranas contra la foto-oxidación (Demmig-Adams y Adams III, 1996). Estos compuestos afectan el rendimiento de las plantas, ya que en parte determinan la tasa fotosintética y eficiencia en la captura de energía solar (Parry *et al.*, 2011); además, son precursores de moléculas de señalización en la respuesta de estrés biótico y abiótico, como el ácido abscísico (ABA) (North *et al.*, 2007).

En hojas verdes, la biosíntesis de carotenos ocurre en las membranas internas de los cloroplastos (Gallagher *et al.*, 2004) y se sintetizan por la vía mevalónica independiente (Fraser y Bramley, 2004) (Figura 1.1).

En maíz (*Zea mays* L.) se conocen varios mutantes de genes involucrados en la ruta de los carotenos, tanto en granos como en hojas. El mutante *yellow 1* (*y1*) está asociado con la enzima fitoeno sintasa 1 (PSY) y presenta semillas blancas (Buckner *et al.*, 1996). Los mutantes *viviparous 2* (*vp2*) y *viviparous 5* (*vp5*) presentan endospermo blanco, son deficientes en carotenos y ABA, lo que se refleja en una germinación prematura del grano, y están asociados a la fitoeno desaturasa (PDS) (Li *et al.*, 1996; Hable *et al.*, 1998). El mutante *white seedling* (*w3*) tiene endospermo blanco, algunas veces vivíparo, sus hojas son blancas y acumulan fitoeno (Li *et al.*, 1996). El mutante *viviparous 9* (*vp9*), con endospermo blanco, se asocia con la ξ -caroteno desaturasa (ZDS) (Matthews *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007). A pesar de que se conocen muchos

mutantes de carotenos en maíz (Figura 1.1), aún no se han identificado todas las enzimas de la ruta, ni se han mapeado todos los genes relevantes.

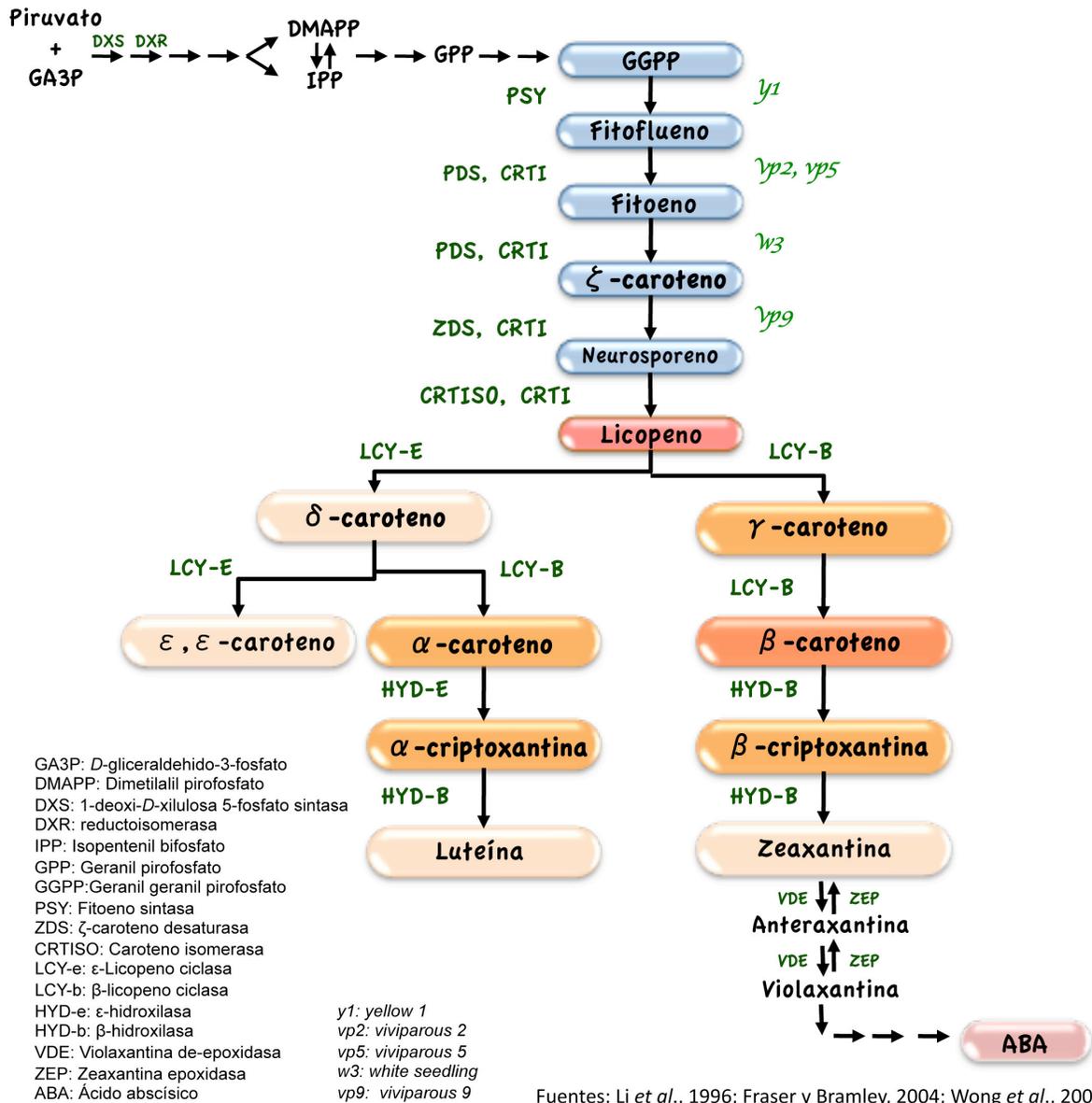


Figura 1.1 Ruta mevalónica independiente de los tetraterpenoides.

Una manera de localizar regiones en los cromosomas relacionadas con una característica fenotípica específica es mediante la identificación de *loci* de caracteres cuantitativos (QTL). La técnica se basa en el desequilibrio de ligamiento y hace uso de herramientas estadísticas al asociar marcadores moleculares con un fenotipo en particular. Los resultados permiten ubicar regiones cromosómicas que contienen uno o varios genes responsables de la característica cuantitativa de estudio (Collard *et al.*, 2005). En la literatura actual no existen estudios sobre QTLs en hojas de maíz asociados a carotenos, por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar el contenido de luteína, β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, y zeaxantina, así como localizar los QTLs respectivos en este tejido fotosintético.

1.3. Materiales y métodos

Material vegetativo y siembra

Se utilizaron líneas endogámicas recombinantes (RILs, por su siglas en inglés) de maíz derivadas de la población IBM, proveniente de la cruce entre las líneas B73 y Mo17 (Lee *et al.*, 2002). La semilla original de las IBM-RILs se obtuvo del banco de germoplasma Maize Genetics Cooperation Stock Center de Estados Unidos. Las plantas crecieron en un sustrato de *peat moss* y vermiculita (en proporciones de 1:1). Los genotipos se sembraron de manera sistemática con cuatro repeticiones cada uno en una maceta de 25 cm de diámetro y 25 cm de altura, dentro de un invernadero con luz solar natural y condiciones de temperatura y humedad semicontroladas, ubicado en Irapuato, México (20° 43' 06.19" latitud N, 101° 19' 44.53" longitud O, 1,730 msnm). La densidad de población fue de 5.7 plantas m⁻². El manejo agronómico de riego, fertilización y control de plagas fue el óptimo para las condiciones de crecimiento en invernadero.

Muestreo y extracción de carotenos

Se obtuvieron muestras de 200 líneas IBM-RILs a los 65 d después de la siembra (DDS) (10^a hoja desarrollada). Para la cosecha se usaron sólo hojas verdes, saludables y homogéneas. Por cada RIL se mezcló la cuarta hoja de cuatro plantas diferentes. El tejido se colocó en nitrógeno líquido, se trituró y se tomaron dos submuestras que se liofilizaron por 36 h. El tejido seco se molió con un molino Retsch MM 301 (Haan, Alemania) por 30 s a una frecuencia de 1/30 Hz. La extracción de carotenos se realizó de 20 mg de tejido seco, con la técnica modificada de (Kurilich y Juvik, 1999): después de agregar 500 µL de etanol más 3,5-Di-tert-4-butilhidroxitolueno (BHT) 1 % y mezclar con agitador tipo vórtex, la muestra se colocó a 80 °C por 5 min, se agregaron 20 µL de KOH 80 % y se sometió a 80 °C por 20 min; después, la muestra fue colocada en hielo y se añadieron 500 µL de agua destilada a 4 °C. Se agregaron 500 µL de hexano en un primer lavado, y en el segundo se utilizaron 250 µL de hexano. El sobrenadante de 750 µL se separó, se desecó y se resuspendió con 200 µL de etanol absoluto.

Cuantificación de carotenos

Se inyectaron 20 µL de las muestras en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Agilent Technologies serie 1200, Santa Clara, CA, EUA) acoplado a una columna YMC Carotenoid, 5 µm 4.6 x 150 mm de (Waters, Milford, MA, EUA). Como fase móvil se utilizó una mezcla de metanol/acetonitrilo/diclorometano/BHT 55/40/5/1 (v/v/v/p) con una elución isocrática de los compuestos a una temperatura de columna de 40 °C. Se utilizó un detector de arreglo de diodos para registrar la absorbancia a tres longitudes de onda simultáneamente: 420, 450 y 473 nm. Los picos de los cromatogramas se integraron manualmente. Los valores de las áreas a las tres longitudes de onda se promediaron y se

utilizaron para determinar el contenido de los carotenos. Los tiempos de retención se obtuvieron con los estándares puros (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA): α -caroteno (05784), β -caroteno (C4582) y zeaxantina (14681), (CaroteNature, Lupsingen, Suiza): luteína (0133) y β -criptoxantina (0055). Los datos se analizaron con las funciones estadísticas de la hoja de cálculo Excel para obtener un resultado final en microgramos de carotenos por gramo de peso de la materia seca (μg carotenos g^{-1} PMS). El contenido total de carotenos se calculó como la suma de luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno y α -caroteno.

Análisis estadístico de QTLs

En el análisis de QTLs los valores fenotípicos fueron los datos obtenidos de contenido de carotenos en cada una de las 200 RILs. Los datos genotípicos se basaron en 2,039 marcadores moleculares correspondientes a la población IBM-RIL 302 contenidos en la base de datos de maizeGDB (www.maizegdb.org). La distancia promedio de los marcadores utilizados fue 4.4 cM en los 10 cromosomas. Los datos se evaluaron con el paquete de qtl en R y *bioconductor* (Broman y Wu, 2010) y se realizó un análisis de varianza (“lm” y “anova”) en R versión 2.11.1 (31-05-2010). Para localizar QTLs significativos se distinguieron picos con una probabilidad $p \leq 0.001$ y se estimaron sus valores aditivos.

Análisis bioinformático

El análisis bioinformático consistió en analizar la posible asociación de genes conocidos de la ruta de los carotenos con los QTLs obtenidos en este trabajo. La localización de los genes y los mutantes se determinó con base en búsquedas en las bases de datos de Maizesequence (<http://www.maizesequence.org/>) y MaizeGDB (<http://www.maizeGDB.org/>).

1.4. Resultados y discusión

Contenido de β -caroteno en hojas

El contenido total de β -caroteno en hojas maduras de maíz fue similar al reportado en hojas maduras de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Cuadro 1.1); sin embargo, la concentración fue 10.7 veces mayor al reportado en hojas de plantas jóvenes de *Arabidopsis thaliana* (Carol *et al.*, 1999) y 50 veces más que en las hojas de *Nicotiana glauca* (40-65 DDS) (Zhu *et al.*, 2007). Lo anterior indica que el contenido de carotenos en hojas puede variar considerablemente según la especie, y probablemente también sea afectado por la edad fisiológica de las hojas. Existió una tendencia similar en el contenido de luteína y en la razón β -caroteno/luteína (1.1).

Cuadro 1. 1 Contenido de carotenos en hojas de diferentes especies y plantas de diferentes edades.

Especie (edad fisiológica)	β -caroteno [†]	Luteína [†]	β -car/lut	Referencia
<i>Zea mays</i> (7 DDS)	514±29	432±25	1.190	(Kay y Phinney, 1956)
<i>Zea mays</i> (B73) (65 DDS)	5,339±1,816	1,142±278	4.675	Este estudio
<i>Arabidopsis thaliana</i>	500	750	0.667	(Carol <i>et al.</i> , 1999)
<i>Nicotiana tabacum</i>	5,200±1,200	10,300±2,100	0.505	(Ralley <i>et al.</i> , 2004)
<i>Nicotiana tabacum</i>	1,390±280	1,111±250	1.251	(Hasunuma <i>et al.</i> , 2008)
<i>Nicotiana glauca</i> (7-21 DDS)	69	162	0.426	(Zhu <i>et al.</i> , 2007)
<i>Nicotiana glauca</i> (40-56 DDS)	103	123	0.836	(Zhu <i>et al.</i> , 2007)

DDS: Días después de la siembra. [†] μ g carotenos g^{-1} PMS. β -caroteno/luteína: β -car/lut

La razón β -caroteno/luteína indica la repartición metabólica en las dos ramas de la ruta, y refleja los niveles de actividad y afinidad por el sustrato de las enzimas LYC-E y LYC-B en estos tejidos (Figura 1.1). Las hojas de maíz tienen una relación mayor de β -caroteno/luteína que contrasta con los valores menores a 1 en hojas de otras especies vegetales (Cuadro 1.1), lo que resulta interesante, ya que para producir el arroz dorado transgénico con alto contenido de carotenos, se utilizó una enzima PSY heteróloga de maíz (Paine *et al.*, 2005), y no una de

bacterias o de *Arabidopsis thaliana* como en muchos otros estudios, lo cual implica que el genoma de maíz puede ser una fuente valiosa de genes para entender la función de los carotenos en otras especies vegetales.

Perfil de carotenos en hojas de maíz de la población IBM-RILs

Después de confirmar que hay fuertes variaciones genéticas en el contenido de β -caroteno y luteína, se analizó el perfil completo de compuestos carotenoides en hojas de las 200 IBM-RILs, cuyo resultado se muestra en la Figura 1.2 a manera de una gráfica *boxplot* que analiza las medias, las amplitudes intercuartiles y la desviación estándar del contenido de carotenos en las muestras evaluadas.

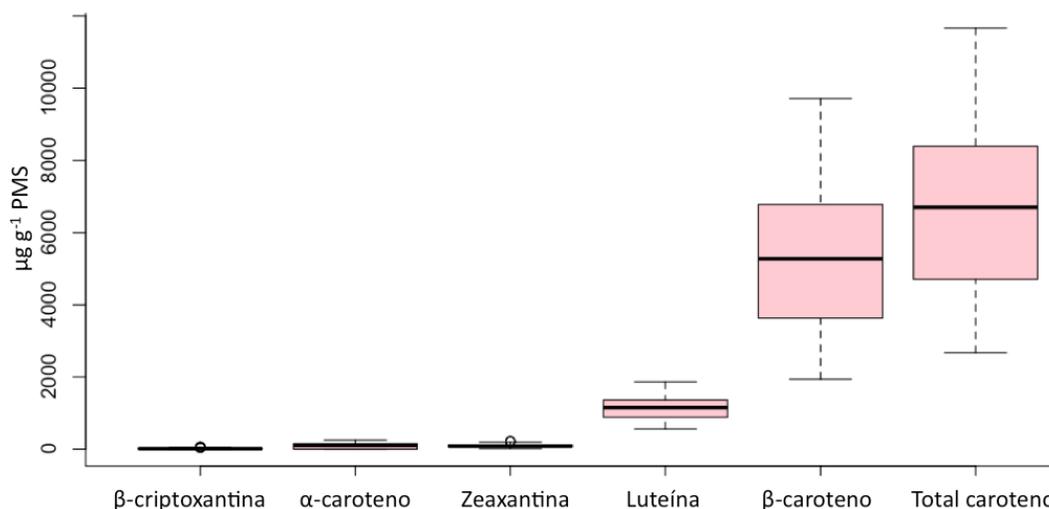


Figura 1.2 Contenido de compuestos carotenoides en hojas de las IBM-RILs.

En relación al contenido total de carotenos medido en las hojas de los IBM-RILs, el β -caroteno fue el metabolito que presentó mayor concentración con base en el peso de la materia seca (80 %), seguido de luteína (17.1 %), zeaxantina (1.4 %), α -caroteno (1.4 %) y β -criptoxantina (0.2 %). Este perfil de compuestos carotenoides contrasta con el típico de granos de maíz, en los cuales la zeaxantina y la luteína son los compuestos dominantes, y el β -caroteno está presente en concentraciones menores (Berardo *et al.*, 2004; Ortiz-Monasterio *et al.*, 2007).

La razón por la que el β -caroteno es dominante en las hojas de maíz aún se desconoce; quizá se debe a sus propiedades químicas fuertemente hidrofóbicas, porque es ubicuo en todos los organismos fototrópicos oxigénicos (Britton, 2008), y porque está íntimamente asociado con los centros de reacción fotosintéticos de las clorofilas, específicamente en el fotosistema II (PS II) de los cloroplastos y la fotoprotección (Trebst y Depka, 1997). La luteína es un compuesto menos hidrofóbico y está asociada con la cosecha de luz y su capacidad antioxidante (Telfer *et al.*, 2008; Ruban y Johnson, 2010); también forma parte del PSII y está involucrada en la transferencia de energía de las clorofilas *b* y *a* (Polivka y Frank, 2010). La zeaxantina, igualmente menos hidrofóbica que el β -caroteno, está involucrada en la disipación del exceso de energía lumínica capturada durante la fotosíntesis (Ruban y Johnson, 2010), e interviene en la transferencia de energía a la clorofila *a* (Connelly *et al.*, 1997). La β -criptoxantina y el α -caroteno son hidrofóbicos (Telfer *et al.*, 2008), pero no se les conocen funciones fotosintéticas, razón por la que posiblemente se encuentran en bajas concentraciones en hojas y presentan una menor actividad antioxidante.

Análisis de QTLs de carotenos

Se identificaron QTLs en una primera aproximación mediante el mapeo de las regiones cromosómicas para identificar genes regulatorios. El Cuadro 1.2 muestra los marcadores que representaron picos con $p \leq 0.001$ de las IMB-RILs para α -caroteno, luteína, β -caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina, en los cromosomas 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8 del genoma de esta población de maíz.

Los marcadores con mayor efecto aditivo para luteína fueron *umc2239* en el cromosoma 1 y *asg73* en el cromosoma 5. Para los otros compuestos, la mayor aditividad se encontró para los marcadores *umc2239* (α -caroteno y β -caroteno), *cdo507b* (β -criptoxantina) y *mmp169*

(zeaxantina). Sobresale el marcador *umc2239* ubicado en el bin 1.07, ya que fue altamente significativo ($p \leq 0.0001$) y tuvo un valor aditivo alto para α -caroteno, luteína y β -caroteno. En esta región se ubicaron 11 genes que aún no se encuentran anotados en la base de datos de Maizesequence, pero podrían ser genes regulatorios de algunas de las enzimas de la ruta de los carotenos.

Cuadro 1. 2 QTLs para carotenos medidos en hoja de maíz de IMB-RILs.

No.	Marcador	Bin	Pos (cM)	Inicio (pb)	Fin (pb)	P-value	r ²	V. A. [†]
α-Caroteno								
1	<i>AY110393</i>	1.03	302.8	51,157,714	51,657,713	0.00040	0.07132	-21.8907
2	<i>AW400087</i>	1.03	287.2	51,160,033	51,660,032	0.00011	0.08498	-22.2197
3	<i>umc2239</i>	1.07	630.6	201,781,351	202,281,350	0.00060	0.07199	-25.4108
4	<i>AY109592</i>	2.09	601.6	221,951,477	222,451,476	0.00009	0.12822	30.0308
5	<i>umc1019</i>	5.06	469.6	189,831,779	190,331,778	0.00067	0.05951	-19.4701
6	<i>phi328175</i>	7.04	472.9	157,224,638	157,724,637	0.00088	0.06582	20.0561
Luteína								
7	<i>umc2239</i>	1.07	630.6	201,781,351	202,281,350	0.00083	0.06845	-89.1583
8	<i>bnl6.32</i>	1.11	968	296,590,319	297,090,318	0.00043	0.07868	77.8488
9	<i>asg73</i>	5.02	121.5	9,030,040	9,530,039	0.00001	0.09743	-86.4633
10	<i>umc1587</i>	5.02	128.7	9,878,541	10,378,540	0.00048	0.06291	-69.6535
β-Caroteno								
11	<i>umc2239</i>	1.07	630.6	201,781,351	202,281,350	0.00008	0.09371	-674.9790
12	<i>phi251315</i>	2.07	403.4	195,264,541	195,764,540	0.00097	0.08632	-664.4012
13	<i>umc1682</i>	4.01	47.6	2,602,044	3,102,043	0.00065	0.06016	-442.8758
β-Criptoxantina								
14	<i>umc2278</i>	4.00	0	359,891	859,890	0.00015	0.08244	-4.1683
15	<i>ufg26</i>	4.00	6.7	592,526	1,092,525	0.00052	0.06222	-3.5924
16	<i>ufg52</i>	4.00	11.7	593,464	1,093,463	0.00072	0.06070	-3.4030
17	<i>cdo507b</i>	5.06	460.6	202,434,077	202,934,076	0.00013	0.08267	-4.4731
18	<i>umc1020</i>	6.05	288.8	123,638,110	124,138,109	0.00028	0.06727	3.8954
19	<i>psy2</i>	8.07	447	166,729,793	167,229,792	0.00765	0.03742	-2.7015
Zeaxantina								
20	<i>mmp43</i>	5.01	73.3	3,472,750	3,972,749	0.00039	0.07124	-11.4803
21	<i>mmp169</i>	5.06	456.8	201,822,886	202,322,885	0.00005	0.09406	-12.8338

V. A.: Valor aditivo [†] μg carotenos g^{-1} PMS (B73 = 1; Mo17 = -1).

Correspondencia con QTLs previamente reportados para otras características

Algunas características fenotípicas y metabólicas pueden estar relacionadas con el contenido de carotenos, es por ello que se revisó la co-localización de los QTLs con otros reportados. El QTL de zeaxantina (marcador *mmp43*) se encuentra cerca del rango de marcadores (77 a 115 cM del bin 5.01) de un QTL previamente descrito para “Contenido de ABA” que presenta un gen candidato de caroteno dioxigenasa (*CCD-EST*) (Capelle *et al.*, 2010), el cual está involucrado en la ruptura oxidativa de carotenos que permite formar fragancias (β -inonoa, geraniol, β -damascenona). *CCD-EST* conlleva a la síntesis de fitohormonas (ABA) y estimula el crecimiento de micorrizas, antifungicidas y feromonas (Matthews y Wurtzel, 2008). El marcador *asg73* está dentro del intervalo 83 a 122 en el bin 5.02 del QTL “Desección, DW 60_4” que contiene el gen candidato de la dehidrina *Rab28*, una proteína LEA (Late Embryogenesis Abundant) involucrada en procesos de resistencia a la desecación (Capelle *et al.*, 2010). Los dos ejemplos anteriores dan indicio de que algunos de los genes ubicados en los marcadores significativos para los IBM-RILs pueden estar involucrados en vías alternas de protección a estrés biótico y abiótico.

Correspondencia con QTLs previamente reportados para granos

El QTL de zeaxantina (*mmp43*) identificado en este estudio (Cuadro 1.2) está a una proximidad de 6 a 12 cM de cuatro QTLs de grano (dos de carotenos totales, uno de β -caroteno y otro de luteína) localizados en las RILs de maíz de la craza By804 \times B73 (Chander *et al.*, 2008).

Los QTLs encontrados para hoja no coincidieron con los QTLs descritos en la craza W64a \times A632 para carotenos en grano, donde se identificaron QTLs en el cromosoma 6 (14 a 25 cM), cromosoma 7 (80 a 85 cM) y cromosoma 8 (54 a 88 cM) (Wong *et al.*, 2004). Una posible razón es que la craza B73 \times Mo17 utilizada en este estudio puede generar QTLs diferentes a los

reportados en otras cruzas como la W64a × A632 (Wong *et al.*, 2004), o que las rutas biosintéticas de hoja y de grano se regulen de forma diferente en la planta y existan conjuntos separados de genes y factores que determinen el contenido de carotenos en cada tejido; ejemplo de ello es el mutante *yl* (PSY) que carece de carotenos en el grano, pero presenta hojas normales, lo que indica que existen diversos parálogos e isoformas para cada paso enzimático, que se expresan diferencialmente en los diversos tejidos. Este fue el caso de la enzima fitoeno sintasa 2 (*psy2*), para la cual el QTL de β-criptoxantina tuvo una significancia de $p = 0.0076$ (Cuadro 1.2), probablemente se debe a que en tejidos fotosintéticos sus funciones predominantes son la cosecha de luz y la foto-protección (Delgado-Vargas *et al.*, 2000); en cambio, en el grano los carotenos son precursores del ABA como se demuestra en los mutantes *viviparous 2* y *5* de maíz (Li *et al.*, 1996; Hable *et al.*, 1998). Esta fitohormona, además de asegurar la latencia en semillas, es mediador de la muerte celular programada en el grano de maíz (Young y Gallie, 2000).

Correspondencia de QTLs con enzimas conocidas de la ruta

Se realizó una búsqueda bioinformática en las bases de datos <http://www.maizesequence.org> y <http://www.maizegdb.org> (Andorf *et al.*, 2010) para determinar la eventual correspondencia entre los QTLs identificados y las enzimas conocidas de la ruta de los carotenos (Cuadro 1.3). De los 21 QTLs identificados (Cuadro 1.2) sólo el QTL correspondiente al marcador *psy2* ($p=0.007$) coincide con la región del gen de *fitoeno sintasa 2* (GRMZM2G149317), uno de los 18 genes anotados de la ruta de los carotenos (Cuadro 1.3). Los demás genes se encuentran a una distancia de más de 800 kb de los picos significativos de los QTLs, lo cual indica la posible existencia de enzimas aún no identificadas que determinan el contenido de carotenos en hojas de maíz, y sus genes codificantes podrían localizarse en los QTLs identificados en este estudio.

Cuadro 1.3 Genes de la ruta de los carotenos en el genoma completo de maíz (B73).

Gen / Mutante	Descripción	Bin	Localización (pb)
Mutante PDS	<i>viviparous 5 (vp5)</i>	1.02	17,596,049 - 17,596,364
GRMZM2G410515	<i>Fitoeno desaturasa</i>	1.02	17,660,941-17,667,054
Mutante	<i>Albescent plant 1 (all)</i>	2.00	1,337,904 - 1,790,108
GRMZM2G164318	<i>Beta-caroteno hidroxilasa</i>	2.03	15,865,938 - 15,868,219
GRMZM2G158657	<i>Caroteno dioxigenasa</i>	2.03	19,458,968 - 19,461,625
GRMZM2G127139	<i>Zeaxantina epoxidasa</i>	2.04	44,440,299-44,449,237
GRMZM2G027219	<i>Violaxantina de-epoxidasa</i>	2.05	74,086,504-74,089,290
Mutante	<i>white seedling 3 (w3)</i>	2.06 - 2.08	196,267,019 - 203,715,282
GRMZM2G106531	<i>Caroteno isomerasa 2</i>	2.09	226,366,352 - 226,371,341
GRMZM2G446858	<i>Caroteno dioxigenasa</i>	3.07	197,015,856 - 197,019,350
GRMZM2G108457	<i>Caroteno isomerasa 1</i>	4.08	200,869,070 - 200,873,710
Mutante PDS	<i>viviparous 2 (vp2)</i>	5.03 - 5.04	62,845,784 - 79,299,122
Mutante LYCB	<i>pink scutellum1 (ps1)</i>	5.04	100,000,771 - 99,998,496
GRMZM2G403196	<i>Licopeno beta-ciclasa</i>	5.04	100,700,176-100,702,145
GRMZM5G849107	<i>Licopeno beta-ciclasa</i> Similar a fitoeno	5.04	100,700,176 - 100,702,026
GRMZM2G139650	<i>dehidrogenasa</i>	5.04	101,172,186 - 101,181,639
GRMZM2G011915	<i>Fitoeno sintasa</i>	6.01	55,671,246 - 55,674,458
Mutante PSY1	<i>yellow endosperm1 (yl o psy1)</i>	6.02	80,876,391 - 80,876,153
GRMZM2G300348	<i>Fitoeno sintasa</i>	6.02	82,017,148-82,021,007
Mutante ZDS	<i>viviparous 9 (vp9)</i>	7.02	17,354,856 - 17,355,355
GRMZM2G454952	<i>Zeta-caroteno desaturasa</i>	7.02	17,470,585 - 17,479,020
GRMZM2G164967	<i>Caroteno dioxigenasa</i>	7.02	87,192,392 - 87,195,740
GRMZM2G012966	<i>Licopeno epsilon-ciclasa</i>	8.05	138,882,594 - 138,889,812
GRMZM2G149317	<i>Fitoeno sintasa 2</i>	8.07	168,273,042 - 168,276,092
GRMZM2G057243	<i>9,10-9,10 caroteno dioxigenasa</i>	9.07	152,086,899 - 152,092,882
GRMZM2G382534	<i>Beta-caroteno hidroxilasa</i>	9.07	153,692,212 - 153,694,57
GRMZM2G179564	<i>Fitoeno sintasa 3</i>	10.02	4,705,086 - 4,705,639
Mutante CRTISO	<i>pale yellow 9 (y9)</i>	10.02 10.04	16,286,920 - 26,599,216
GRMZM2G152135	<i>Beta-caroteno hidroxilasa</i>	10.05	136,057,100 - 136,060,219

Fuentes: <http://www.maizesequence.org> y <http://www.maizegdb.org>. Consulta 17/01/2011.

1.5. Conclusiones

El análisis de los resultados mostró que β -caroteno es el caroteno mayoritario en las hojas de maíz, en tanto que β -criptoxantina se encuentra en menor cantidad comparativamente. Se identificaron 21 QTLs en hojas de maíz para carotenos, localizados en los cromosomas 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8; de estos QTLs, 6 correspondieron a α -caroteno, 4 a luteína, 3 a β -caroteno, 6 a β -criptoxantina y 2 a zeaxantina. El QTL *psy2* asociado al gen GRMZM2G149317 corresponde al gen de la *fitoeno sintasa 2*. El QTL asociado al marcador *umc2239* fue el más significativo ($p \leq 0.001$) y con mayor valor aditivo para luteína, α -caroteno y β -caroteno.

1.6. Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo y la facilidad brindada por las Líneas Prioritarias de Investigación 5 y 6 del Colegio de Postgraduados y al Fideicomiso Institucional. De la misma manera, se agradece el apoyo económico previo del fondo sectorial SAGARPA-COFUPRO y CONACYT. Este proyecto fue posible gracias a una colaboración interinstitucional entre investigadores del CINVESTAV y el Colegio de Posgraduados.

1.7. Literatura citada

Andorf, C. M., C. J. Lawrence, L. C. Harper, M. L. Schaeffer, D. A. Campbell, and T. Z. Sen. 2010. The locus lookup tool at MaizeGDB: identification of genomic regions in maize by integrating sequence information with physical and genetic maps. *Bioinformatics* 26: 434-436.

- Berardo, N., O. V. Brenna, A. Amato, P. Valoti, V. Pisacane, and M. Motto. 2004. Carotenoids concentration among maize genotypes measured by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5: 393-398.
- Britton, G. 2009. Vitamin A and vitamin A deficiency. *In: Britton, G., S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (eds). Carotenoids. B. Verlag, Basel. pp: 173 - 190.*
- Broman, K. W., and H. Wu. 2010. Tools for analyzing QTL experiments. CRAN. Wien. 19 p.
- Buckner, B., P. S. Miguel, D. Janick-Buckner, and J. L. Bennetzen. 1996. The *yl* gene of maize codes for phytoene synthase. *Genetics* 143: 479-488.
- Capelle, V., C. Remoue, L. Moreau, A. Reyss, A. Mahe, A. Massonneau, M. Falque, A. Charcosset, C. Thevenot, P. Rogowsky, S. Coursol, and J. L. Prioul. 2010. QTLs and candidate genes for desiccation and abscisic acid content in maize kernels. *BMC Plant Biology* 10: 2.
- Carol, P., D. Stevenson, C. Bisanz, J. Breitenbach, G. Sandmann, R. Mache, G. Coupland, and M. Kuntz. 1999. Mutations in the Arabidopsis gene *IMMUTANS* cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell* 11: 57-68.
- Collard, B., M. Jahufer, J. Brouwer, and E. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.

- Connelly, J. P., M. G. Müller, R. Bassi, R. Croce, and A. R. Holzwarth. 1997. Femtosecond transient absorption study of carotenoid to chlorophyll energy transfer in the light-harvesting complex II of photosystem II. *Biochemistry* 36: 281-287.
- Chander, S., Y. Q. Guo, X. H. Yang, J. Zhang, X. Q. Lu, J. B. Yan, T. M. Song, T. R. Rocheford, and J. S. Li. 2008. Using molecular markers to identify two major loci controlling carotenoid contents in maize grain. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 223-233.
- Demmig-Adams, B., and W. W. Adams III. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1: 21-26.
- Farré, G., G. Sanahuja, S. Naqvi, C. Bai, T. Capell, C. Zhu, and P. Christou. 2010. Travel advice on the road to carotenoids in plants. *Plant Science* 179: 28-48.
- Fraser, P. D., and P. M. Bramley. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* 43: 228-265.
- Gallagher, C. E., P. D. Matthews, F. Li, and E. T. Wurtzel. 2004. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. *Plant Physiology* 135: 1776-1783.
- Hable, W. E., K. K. Oishi, and K. S. Schumaker. 1998. *Viviparous-5* encodes phytoene desaturase, an enzyme essential for abscisic acid (ABA) accumulation and seed development in maize. *Molecular & General Genetics* 257: 167-176.

- Hasunuma, T., S. Miyazawa, S. Yoshimura, Y. Shinzaki, K. Tomizawa, K. Shindo, S. K. Choi, N. Misawa, and C. Miyake. 2008. Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering. *Plant Journal* 55: 857-868.
- Kay, R. E., and B. O. Phinney. 1956. The control of plastid pigment formation by a virescent gene, pale-yellow-1, of maize. *Plant Physiology* 31: 415-420.
- Kurilich, A. C., and J. A. Juvik. 1999. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1948-1955.
- Lee, M., N. Sharopova, W. D. Beavis, D. Grant, M. Katt, D. Blair, and A. Hallauer. 2002. Expanding the genetic map of maize with the intermated B73 x Mo17 (IBM) population. *Plant Molecular Biology* 48: 453-461.
- Li, F., C. Murillo, and E. T. Wurtzel. 2007. Maize *Y9* encodes a product essential for 15-cis- ζ -carotene isomerization. *Plant Physiology* 144: 1181-1189.
- Li, Z. H., P. D. Matthews, B. Burr, and E. T. Wurtzel. 1996. Cloning and characterization of a maize cDNA encoding phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Molecular Biology* 30: 269-279.
- Matthews, P. D., R. Luo, and E. T. Wurtzel. 2003. Maize phytoene desaturase and ζ -carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *Journal of Experimental Botany* 54: 2215-2230.

- Matthews, P. D., and E. T. Wurtzel. 2008. Biotechnology of food and colorant production. *In*: Socaciu, C. (ed). Food Colorants: Chemical and Functional Properties. CRC Press, Boca Raton. pp: 347-398.
- North, H. M., A. De Almeida, J. P. Boutin, A. Frey, A. To, L. Botran, B. Sotta, and A. Marion-Poll. 2007. The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant Journal* 50: 810-824.
- Ortiz-Monasterio, J. I., N. Palacios-Rojas, E. Meng, K. Pixley, R. Trethowan, and R. J. Peña. 2007. Enhancing the mineral and vitamin content of wheat and maize through plant breeding. *Journal of Cereal Science* 46: 293-307.
- Paine, J. A., C. A. Shipton, S. Chaggar, R. M. Howells, M. J. Kennedy, G. Vernon, S. Y. Wright, E. Hinchliffe, J. L. Adams, A. L. Silverstone, and R. Drake. 2005. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology* 23: 482-487.
- Parry, M. A., M. Reynolds, M. E. Salvucci, C. Raines, P. J. Andralojc, X. G. Zhu, G. D. Price, A. G. Condon, and R. T. Furbank. 2010. Raising yield potential of wheat. II. Increasing photosynthetic capacity and efficiency. *Journal of Experimental Botany* 62: 453-467.
- Pfeiffer, W. H., and B. McClafferty. 2007. HarvestPlus: breeding crops for better nutrition. *Crop Science* 47(S3): S88-S105.
- Polivka, T., and H. A. Frank. 2010. Molecular factors controlling photosynthetic light harvesting by carotenoids. *Accounts of Chemical Research* 43: 1125-1134.

- Ralley, L., E. M. Enfissi, N. Misawa, W. Schuch, P. M. Bramley, and P. D. Fraser. 2004. Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. *Plant Journal* 39: 477-486.
- Ruban, A. V., and M. P. Johnson. 2010. Xanthophylls as modulators of membrane protein function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 504: 78-85.
- Telfer, A., A. Pascal, and A. Gall. 2008. Carotenoids in photosynthesis. *In*: Britton, G., S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (eds). *Carotenoids*. B. Verlag, Basel. pp: 265-308.
- Trebst, A., and B. Depka. 1997. Role of carotene in the rapid turnover and assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* 400: 359-362.
- Wong, J. C., R. J. Lambert, E. T. Wurtzel, and T. R. Rocheford. 2004. QTL and candidate genes phytoene synthase and ζ -carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 349-359.
- Young, T. E., and D. R. Gallie. 2000. Programmed cell death during endosperm development. *Plant Molecular Biology* 44: 283-301.
- Zhu, C., T. Gerjets, and G. Sandmann. 2007. *Nicotiana glauca* engineered for the production of ketocarotenoids in flowers and leaves by expressing the cyanobacterial *crtO* ketolase gene. *Transgenic Research* 16: 813-821.

CAPÍTULO 2. QTLs ASOCIADOS AL CONTENIDO DE CAROTENOS EN GRANOS DE MAÍZ (*Zea mays* L.)²

2.1. Resumen

Una alternativa de solución al problema de la desnutrición humana es la biofortificación de productos básicos de consumo como el maíz (*Zea mays* L.). La deficiencia de vitamina A ocasiona principalmente xerofthalmia en el ser humano. Los carotenos se sintetizan a partir de la vía mevalónica independiente, donde se genera el β -caroteno, principal precursor de la vitamina A. Una forma de identificar regiones cromosómicas asociadas con la vía de los carotenos es mediante la identificación de *loci* de caracteres cuantitativos (QTLs), por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar el contenido de carotenos y localizar QTLs en líneas recombinantes (RIL) de la población de maíz IBM-302. Los resultados mostraron que el contenido de β -caroteno en los granos de las IBM-RIL representó el 10% del contenido total de carotenos en el grano. Se identificaron 99 QTLs en los cromosomas 6, 7, 8, 9 y 10, con dos marcadores significativos sobresalientes (*umc12a* y *umc1777*) en luteína ($r^2 \approx 0.15$ y 0.25), β -caroteno ($r^2 \approx 0.08$ y 0.06), β -criptoxantina ($r^2 \approx 0.14$ y 0.16), zeaxantina ($r^2 \approx 0.08$ y 0.07) y provitamina A ($r^2 \approx 0.1$ y 0.09) en el bin 8.05, como región fuertemente relacionada con el contenido de caroteno. En otros QTLs se encontraron concordancias con genes previamente anotados de *fitoeno sintasa*, ξ -caroteno desaturasa y licopeno ϵ -ciclase, con QTLs identificados en otros experimentos y dos genes candidatos para *fitoeno sintasa*. Por la gran cantidad de QTLs identificados, se concluye que los mecanismos de control genético para la síntesis de carotenos son variados y complejos, generando fenotípicamente una gran variabilidad en el contenido de carotenos en grano.

Palabras Clave: *Zea mays*, *loci* de caracteres cuantitativos, carotenoides, semilla, provitamina A

² Contribución escrita con formato de artículo científico para ser enviada para su publicación a la revista Agrociencia

2.2. Introducción

Los carotenos son precursores de la vitamina A (Fraser y Bramley, 2004), y el ser humano los ingiere a través de productos animales y vegetales. La deficiencia de vitamina A (VAD) ocasiona xeroftalmia, ceguera, anemia, reduce las defensas del organismo, afecta el crecimiento celular, la reproducción e incrementa el riesgo de muerte en humanos (Britton, 2009; WHO, 2009). A nivel mundial se estima que 925 millones de personas se encuentran desnutridas (FAO, 2010). En México, la última encuesta nacional de nutrición en 1999 estimó que el 23% de niños entre 0 y 12 años tuvieron VAD (Villalpando-Hernández *et al.*, 2001; FAO, 2003).

Una alternativa al problema de la desnutrición humana es la biofortificación de cultivos básicos como el maíz (*Zea mays* L.), o su mejoramiento genético para hacerlos más nutritivos. El consumo de maíz en tortilla de la población es de 105 kg *per capita*, lo que representa 47% de las calorías diarias (Polanco y Flores, 2008). El consumo de este grano con mejores valores nutricionales en una época donde la mala alimentación predomina sería importante para evitar la desnutrición.

En el grano, la biosíntesis de carotenos ocurre en las membranas de los cromoplastos y amiloplastos (Gallagher *et al.*, 2004). Los carotenos de las plantas se sintetizan por la vía mevalónica independiente, se genera isopentenil pirofosfato (IPP) a partir de piruvato y gliceraldehido-3-fosfato. Cuatro moléculas de IPP se polimerizan para formar el geranil-geranil pirofosfato (GGPP) que contiene 20 átomos de carbono. A partir de dos unidades de GGPP se produce el fitoeno, dando inicio así a la ruta de los tetra-terpenoides y la formación de los compuestos carotenoides de las plantas. Después de cuatro desaturaciones, el fitoeno incoloro se convierte en licopeno, de color rojizo. El licopeno es el precursor de las reacciones de ciclación en donde la ruta se divide en dos ramas. En la primera rama participa la licopeno- ϵ -ciclasa (LYC-E) que introduce los anillos- ϵ , se produce α -caroteno, α -criptoxantina y finalmente luteína.

En la segunda participa la licopeno-β-ciclasa (LYC-B) que introduce los anillos β, se produce β-caroteno, β-criptoxantina y zeaxantina. Por esta segunda rama es que también se generan otras xantofilas fotosintéticas, y después de varias reacciones, el ABA (Fraser y Bramley, 2004) (Figura 2.1).

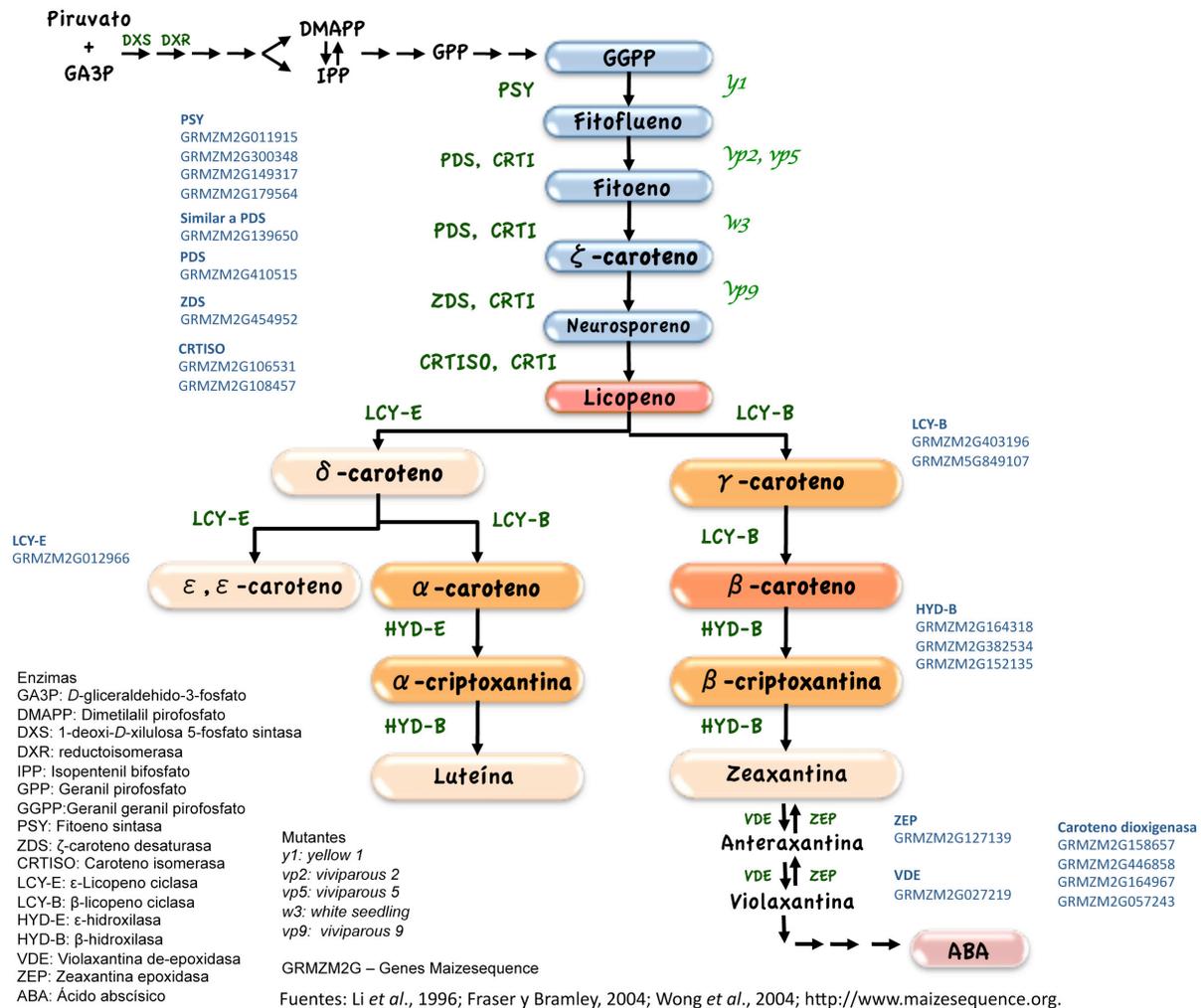


Figura 2. 1 Ruta mevalónica independiente de los tetraterpenoides con genes.

En maíz se conocen varios mutantes de genes involucrados en la ruta de los carotenos. El mutante *yellow 1* (*y1*) presenta semillas blancas y está asociado con la enzima fitoeno sintasa 1 (PSY1) (Buckner *et al.*, 1990). Los mutantes *viviparous 2* (*vp2*) y *viviparous 5* (*vp5*) presentan endospermo blanco, son deficientes en carotenos y ABA, lo que se refleja en una germinación prematura del grano y están asociados a la fitoeno desaturasa (PDS) (Li *et al.*, 1996; Hable *et al.*, 1998). El mutante *white seedling* (*w3*) tiene endospermo blanco, algunas veces vivíparo y acumula fitoeno (Li *et al.*, 1996). El mutante *viviparous 9* (*vp9*) con endospermo blanco, se asocia con la ξ -caroteno desaturasa (ZDS) (Matthews *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007). Existen otros genes asociados a un fenotipo deficiente en carotenos como *albescent plant 1* (*all*), *pink scutellum 1* (*ps1*) y *pale yellow 9* (*y9*) (www.maizesequence.org). A pesar de que se conocen muchos mutantes de carotenos en maíz, aún no se han identificado todas las enzimas de la ruta, ni se han mapeado todos los genes relevantes (Cuadro 2.1).

Además del uso de mutantes en la identificación cualitativa e individual de ciertos genes, una manera de localizar regiones en los cromosomas relacionadas con una característica fenotípica específica es mediante la identificación de *loci* de caracteres cuantitativos (QTLs). La técnica se basa en la existencia de desequilibrio de ligamiento, y por medio de herramientas estadísticas se asocian marcadores moleculares con un fenotipo en particular. El resultado son regiones cromosómicas que contienen uno o varios genes responsables de la característica cuantitativa bajo estudio (Collard *et al.*, 2005).

En este contexto, la presente investigación tuvo como finalidad cuantificar el contenido de diferentes carotenos en grano de maíz, identificar y localizar nuevas regiones cromosómicas relacionadas con la síntesis y acumulación de luteína, β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina,

zeaxantina y carotenos totales en un grupo de líneas derivadas de la población de maíz amarillo IBM (Intermated B73 × Mo17).

2.3. Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron 250 líneas endogámicas recombinantes (RIL, por su siglas en inglés) derivadas de la población de maíz amarillo IBM (Intermated B73 × Mo17), proveniente de la cruce entre las líneas B73 y Mo17 (Lee *et al.*, 2002). La semilla original de las IBM-RIL se obtuvo del banco de germoplasma *Maize Genetics Cooperation Stock Center* de los Estados Unidos.

Extracción de carotenos

El grano seco se procesó en un molino Retsch MM 301 (Haan, Alemania) durante 1.5 min a una frecuencia de 1/30 Hz. La extracción de carotenos se realizó a partir de 50 mg de tejido, con la técnica modificada por (Kurilich y Juvik, 1999). Después de agregar 500 µL de etanol + 3,5-Di-tert-4-butilhidroxitolueno (BHT) 1% y mezclar con agitador tipo vortex, la muestra se mantuvo a 80 °C durante 5 minutos, luego se agregaron 10 µL de KOH 80% y se sometió a 80°C por 10 minutos. Posteriormente se colocó en hielo y se añadieron 500 µL de agua fría y 250 µL de hexano en un primer lavado, se realizaron dos lavados adicionales con 250 µL de hexano. El sobrenadante de 750 µL se desecó y se resuspendió en 200 µL de etanol absoluto. Este procedimiento permite la extracción de carotenos totales, los cuales posteriormente se cuantifican por separado.

Cuadro 2. 1 Genes y mutantes de la ruta de los carotenos en el genoma de maíz B73.

Gen / Mutante	Descripción	Bin	Localización (pb)
Mutante PDS	<i>Viviparous 5 (vp5)</i>	1.02	17,596,049 - 17,596,364
GRMZM2G410515	<i>Fitoeno desaturasa</i>	1.02	17,660,941-17,667,054
Mutante	<i>Albescent plant 1 (al1)</i>	2.00	1,337,904 - 1,790,108
GRMZM2G164318	<i>Beta-caroteno hidroxilasa</i>	2.03	15,865,938 - 15,868,219
GRMZM2G158657	<i>Caroteno dioxigenasa</i>	2.03	19,458,968 - 19,461,625
GRMZM2G127139	<i>Zeaxantina epoxidasa</i>	2.04	44,440,299-44,449,23
GRMZM2G027219	<i>Violaxantina de-epoxidasa</i>	2.05	74,086,504-74,089,29
Mutante	<i>white seedling 3 (w3)</i>	2.06 - 2.08	196,267,019 - 203,715,282
GRMZM2G106531	<i>Caroteno isomerasa 2</i>	2.09	226,366,352 - 226,371,341
GRMZM2G446858	<i>Caroteno dioxigenasa</i>	3.07	197,015,856 - 197,019,350
GRMZM2G108457	<i>Caroteno isomerasa 1</i>	4.08	200,869,070 - 200,873,710
Mutante PDS	<i>viviparous 2 (vp2)</i>	5.03 - 5.04	62,845,784 - 79,299,122
Mutante LYCB	<i>pink scutellum1 (ps1)</i>	5.04	100,000,771 - 99,998,496
GRMZM2G403196	<i>Licopeno beta-ciclasa</i>	5.04	100,700,176-100,702,145
GRMZM5G849107	<i>Licopeno beta-ciclasa</i>	5.04	100,700,176 - 100,702,026
	<i>Similar a fitoeno</i>		
GRMZM2G139650	<i>dehidrogenasa</i>	5.04	101,172,186 - 101,181,639
GRMZM2G011915	<i>Fitoeno sintasa</i>	6.01	55,671,246 - 55,674,458
Mutante PSY1	<i>yellow endosperm1 (y1 o psy1)</i>	6.02	80,876,391 - 80,876,153
GRMZM2G300348	<i>Fitoeno sintasa</i>	6.02	82,017,148-82,021,007
Mutante ZDS	<i>viviparous 9 (vp9)</i>	7.02	17,354,856 - 17,355,355
GRMZM2G454952	<i>Zeta-caroteno desaturasa</i>	7.02	17,470,585 - 17,479,020
GRMZM2G164967	<i>Caroteno dioxigenasa</i>	7.02	87,192,392 - 87,195,740
GRMZM2G012966	<i>Licopeno epsilon-ciclasa</i>	8.05	138,882,594 - 138,889,812
GRMZM2G149317	<i>Fitoeno sintasa 2</i>	8.07	168,273,042 - 168,276,092
GRMZM2G057243	<i>9,10-9,10 caroteno dioxigenasa</i>	9.07	152,086,899 - 152,092,882
GRMZM2G382534	<i>Beta-caroteno hidroxilasa</i>	9.07	153,692,212 - 153,694,57
GRMZM2G179564	<i>Fitoeno sintasa 3</i>	10.02	4,705,086 - 4,705,639
Mutante CRTISO	<i>pale yellow 9 (y9)</i>	10.02 10.04	16,286,920 - 26,599,216
GRMZM2G152135	<i>Beta-caroteno hidroxilasa</i>	10.05	136,057,100 - 136,060,219

Fuente: <http://maizesequence.org> (Consulta: 17/01/2011) (Andorf *et al.*, 2010).

Cuantificación de carotenos

Se inyectaron 20 μL de las muestras en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Agilent Technologies Serie 1200, Santa Clara, CA, Estados Unidos) acoplado a una columna YMC Carotenoid, 5 μm 4.6 x 150 mm (Waters, Milford, MA, Estados Unidos). Como fase móvil se utilizó una mezcla de metanol/acetonitrilo/diclorometano/BHT 55/40/5/1 (v/v/v/p) con una elución isocrática de los compuestos a una temperatura de columna de 40 °C. Se utilizó un detector de arreglo de diodos para registrar la absorbancia a tres longitudes de onda simultáneamente: 420, 450 y 473 nm. Los picos de los cromatogramas se integraron manualmente. Los valores de las áreas a las tres longitudes de onda se promediaron y se utilizaron para determinar el contenido de los carotenos. Los tiempos de retención se obtuvieron con los estándares puros (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA): β -caroteno (C4582) y zeaxantina (14681), (CaroteNature, Lupsingen, Suiza): luteína (0133) y β -criptoxantina (0055). Los datos se analizaron con las funciones estadísticas de una hoja de cálculo Excel (Microsoft) para obtener un resultado final en microgramos de carotenos por gramo de peso de la materia seca (μg carotenos g^{-1} PMS). El contenido total de carotenos se calculó como la suma de luteína, zeaxantina, β -criptoxantina y β -caroteno. El contenido de provitamina A se calculó con la suma del valor de β -caroteno y la mitad del valor de β -criptoxantina.

Análisis de QTLs

Los valores fenotípicos fueron los datos obtenidos de contenido de carotenos en grano de cada una de las 250 RIL. Los datos genotípicos se basaron en 2,039 marcadores moleculares correspondientes a la población IBM-RIL 302, que pueden ser descargados en la base de datos de maizeGDB (www.maizegdb.org). La distancia genética promedio entre los marcadores

utilizados fue de 4.4 cM en los 10 cromosomas. Los resultados se obtuvieron con el paquete de qtl en R y *bioconductor* (Broman *et al.*, 2003) y se realizó un análisis de varianza en R versión 2.11.1; para localizar QTLs significativos se distinguieron picos con $P \leq 0.001$.

Análisis bioinformático

El análisis bioinformático consistió en la comparación de genes conocidos de la ruta de los carotenos en relación con los QTLs obtenidos en el análisis de este trabajo. La localización de los genes y mutantes se determinó con base en búsquedas en las bases de datos de Maizesequence (<http://www.maizesequence.org/>) y Maize GDB (<http://www.maizeGDB.org/>).

2.4. Resultados y discusión

Perfil de carotenos en granos de maíz

Se cuantificó β -criptoxantina, zeaxantina, luteína, β -caroteno y se calculó la suma total de carotenos y provitamina A. La Figura 2.2 muestra los resultados a manera de una gráfica de caja y ejes que exhibe las medias, las amplitudes intercuartiles y la desviación estándar del contenido de carotenos en las muestras evaluadas. Del contenido total de carotenos medido en los granos de los IBM-RILs, la luteína fue el metabolito que presentó mayor contenido (32.3%), seguida de zeaxantina (22.7%), β -criptoxantina (10.6%) y β -caroteno (10.6%) (Figura 2.2). Las IBM-RIL se comportaron en contenido de carotenos de manera similar a un grupo de RIL de maíz By804 \times B73 (Chander *et al.*, 2008), donde la luteína también representó la mayoría de los carotenos (72%), siguiendo la zeaxantina (15%), β -criptoxantina (3%) y β -caroteno (5%). Sin embargo, las RIL de maíz W64a \times A632 presentaron mayor contenido de zeaxantina (54%) que de luteína (27%) (Wong *et al.*, 2004).

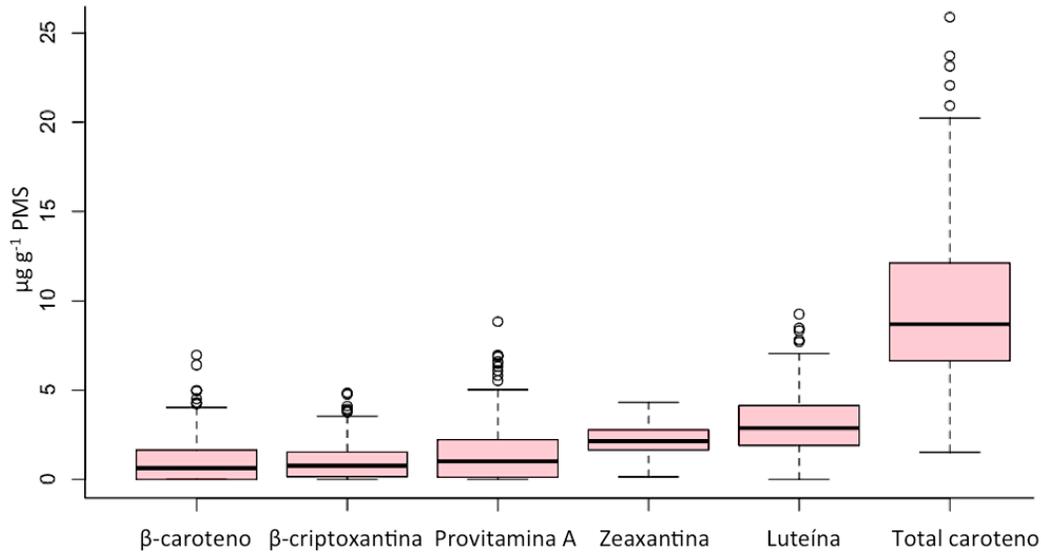


Figura 2. 2 Contenido de compuestos carotenoides en granos de maíz de IBM-RILs.

Con respecto al total de carotenos, se observó una gran variabilidad dentro de las IBM-RIL (Figura 2.2). Sin embargo, su contenido promedio fue semejante al promedio de las RIL By204 x B73 y al maíz B73 (Cuadro 2.2).

Cuadro 2. 2 Contenido de carotenos en grano maíz obtenidos en este estudio y comparación con otras fuentes.

RIL <i>Zea mays</i>	β -car [†]	Luteína [†]	Tot car [†]	β -car/lut	Referencia
IBM (B73 × Mo17)	1.02±1.3	3.11±1.7	9.68±4.3	0.33	Este estudio
Promedio 24 genotipos	0.88±0.7	13.1±7.2	37.93±16.2	0.067	(Berardo <i>et al.</i> , 2004)
W64a × A632 (1996)	1.05±0.1	4.95±0.1	16.22±0.4	0.212	(Wong <i>et al.</i> , 2004)
W64a × A632 (1997)	0.33±0.01	3.59±0.2	15.23±0.3	0.092	(Wong <i>et al.</i> , 2004)
By804 × B73(2004)	0.46±0.04	8.02±0.5	10.68±0.5	0.057	(Chander <i>et al.</i> , 2008)
By804 × B73(2005)	0.57±0.05	6.69±0.6	9.73±0.4	0.085	(Chander <i>et al.</i> , 2008)
B73	0.36±0.02	5.25±0.4	9.85±0.6	0.069	(Chander <i>et al.</i> , 2008)

[†] μg carotenos g^{-1} PMS β -car: β -caroteno Tot car: Total carotenos β -car/lut : β -caroteno/Luteína

En el Cuadro 2.2 se observa que los granos evaluados en las RIL de la cruza W64a × A632 (Wong *et al.*, 2004), RIL de By804 × B73 (Chander *et al.*, 2008), el promedio de 25 genotipos de maíz (Berardo *et al.*, 2004) y el maíz B73 (Chander *et al.*, 2008) tuvieron una baja proporción de β-caroteno, con porcentajes de 2.2 a 10% en relación al total de carotenos medidos.

Adicionalmente, se calculó la razón β-caroteno/luteína (β-car/lut) debido a que es indicativa de la repartición metabólica entre las dos ramas de la ruta, y refleja los niveles de actividad y afinidad por el sustrato de las enzimas LYC-E y LYC-B en estos tejidos (Figura 2.1). Se detectaron valores bajos en la razón β-car/lut en las IBM-RILs, en otras poblaciones de RIL, en diferentes genotipos de maíz y en el maíz B73 (Cuadro 2.2), lo que demuestra la baja actividad de la enzima LYC-B en relación con LYC-E.

Todas las variables correlacionadas significativamente fueron positivas (Cuadro 2.3), lo que sugiere una asociación entre β-caroteno, β-criptoxantina y zeaxantina. Esto se asemeja a lo obtenido en las RIL By804 × B73, con excepción de la correlación con luteína, β-caroteno y β-criptoxantina (Chander *et al.*, 2008).

Cuadro 2.3 Correlaciones de Pearson entre diferentes tipos de carotenos en grano.

Caroteno	Luteína	Zeaxantina	β-criptoxantina
Zeaxantina	0.19685		
β-criptoxantina	-0.3310	0.66356**	
β-caroteno	0.15337	0.68743**	0.80399**

*= Significancia $P \leq 0.05$, ** = Alta significancia $P \leq 0.01$.

La principal función de los carotenos en el grano es ser precursores del ABA en los mutantes *viviparous 2* y *5* de maíz (Li *et al.*, 1996; Hable *et al.*, 1998). Esta fitohormona además de conferir latencia a las semillas, es mediador de la muerte celular programada en el grano de maíz

(Young y Gallie, 2000). Es posible que el bajo contenido de β -caroteno en los granos esté relacionado con requerimientos reducidos de ABA, pues por tratarse de una hormona vegetal ésta funciona a muy bajas concentraciones en la planta, y el ABA proviene precisamente de dicha rama (Figura 2.1). No obstante, para fines alimenticios, sería de gran importancia incrementar este metabolito debido a sus amplios beneficios en la nutrición humana.

Análisis de QTLs de carotenos

Se identificaron QTLs en el mapeo de las regiones cromosómicas para identificar genes regulatorios. Los cuadros 2.4 a 2.9 muestran los marcadores que presentaron picos con $P \leq 0.001$ de las IBM-RIL para luteína, β -caroteno y β -criptoxantina, zeaxantina, provitamina A y total de carotenos, que se ubicaron en los cromosomas 6, 7, 8, 9 y 10 (Figura A 2 y Figura A 3).

Los resultados de los valores aditivos indican que los alelos favorables que poseen efecto aditivo para β -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina, provitamina A y total carotenos se debieron al parental Mo17; en contraste, para luteína fue el parental B73.

El marcador con el mayor efecto aditivo para luteína fue *umc1777* en el cromosoma 8. Para los otros compuestos, el mayor valor aditivo se encontró para los marcadores *umc1340* (β -caroteno y provitamina A), *bnlg1651* (β -criptoxantina y zeaxantina), y *AY110213* (total carotenos). Sobresalen los marcadores *umc12a* y *umc1777* en el bin 8.05, ya que fueron altamente significativos ($P \leq 0.0001$) con todos los carotenos evaluados. En estas regiones se ubicaron 15 genes que aún no están anotados en la base de datos de Maizesequence, que podrían ser genes regulatorios de las enzimas de la ruta de los carotenos o rutas próximas, ya que el marcador *umc1777* está asociado con el locus *gar3* de respuesta a giberelinas (Ogawa *et al.*, 1999).

Cuadro 2. 4 QTLs de luteína medidos en grano de maíz de IBM-RILs.

No.	Marcador	Bin	Pos (cM)	P-value	r ²	V. A. [†]
1	<i>mmp75</i>	7.02	155.2	0.001	0.053	-0.388
2	<i>psr371b</i>	7.02	160.7	0.000	0.062	-0.450
3	<i>bnlg1176</i>	8.04	330.4	0.000	0.081	0.531
4	<i>AY104566</i>	8.05	342	0.001	0.052	0.430
5	<i>mmp15</i>	8.05	305.6	0.000	0.155	0.732
6	<i>umc1263</i>	8.05	311.5	0.000	0.135	0.677
7	<i>mmp195b</i>	8.05	361.2	0.000	0.096	0.515
8	<i>umc1846</i>	8.05	357.9	0.000	0.092	0.549
9	<i>bnlg666</i>	8.05	324.5	0.000	0.167	0.757
10	<i>bnlg2181</i>	8.05	366.8	0.000	0.168	0.741
11	<i>bnlg162</i>	8.05	367	0.000	0.167	0.760
12	<i>rz390a</i>	8.05	373.5	0.000	0.139	0.714
13	<i>umc1889</i>	8.05	332.1	0.000	0.187	0.803
14	<i>umc12a</i>	8.05	329.9	0.000	0.145	0.731
15	<i>bnlg1651</i>	8.05	331.6	0.000	0.161	0.744
16	<i>csu292</i>	8.05	358.4	0.000	0.098	0.563
17	<i>umc1340</i>	8.05	334.9	0.000	0.134	0.657
18	<i>hda103</i>	8.05	336.4	0.000	0.160	0.712
19	<i>umc1316</i>	8.05	338.9	0.000	0.229	0.896
20	<i>isu114</i>	8.05	339.9	0.000	0.202	0.853
21	<i>umc1777</i>	8.05	382.9	0.000	0.247	0.918
22	<i>bnl12.30a</i>	8.05	342.8	0.000	0.169	0.801
23	<i>umc1960</i>	8.06	413.2	0.001	0.049	0.404
24	<i>umc1149</i>	8.06	371.2	0.001	0.046	0.384
25	<i>mmp32</i>	8.06	416	0.001	0.051	0.391
26	<i>bnlg1823</i>	8.07	440.7	0.001	0.047	0.375
27	<i>umc1005</i>	8.08	483	0.000	0.060	0.425
28	<i>umc1933</i>	8.08	496.3	0.000	0.094	0.544
29	<i>AY110053</i>	8.08	550.4	0.000	0.080	0.506

[†]V. A.: Valor aditivo en µg carotenos g⁻¹ MS (B73 = 1; Mo17 = -1).

Cuadro 2. 5 QTLs de β -caroteno medidos en grano de maíz de IBM-RILs.

No.	Marcador	Bin	Pos (cM)	P-value	r ²	V.A. [†]
30	<i>psr160a</i>	6.01	87.7	0.000	0.062	-0.306
31	<i>uck1</i>	6.01	75.5	0.001	0.050	-0.298
32	<i>rz242a</i>	6.01	106.7	0.000	0.065	-0.314
33	<i>umc1006</i>	6.02	103.9	0.000	0.059	-0.321
34	<i>rz444e</i>	6.05	123.7	0.000	0.067	-0.319
35	<i>AY104566</i>	8.05	342	0.000	0.067	-0.334
36	<i>mmp15</i>	8.05	305.6	0.000	0.055	-0.335
37	<i>psb107a</i>	8.05	314.1	0.001	0.055	-0.313
38	<i>ufg74</i>	8.05	320.9	0.001	0.051	-0.311
39	<i>umc12a</i>	8.05	329.9	0.000	0.075	-0.385
40	<i>csu292</i>	8.05	358.4	0.000	0.063	-0.337
41	<i>umc1340</i>	8.05	334.9	0.000	0.108	-0.429
42	<i>umc1777</i>	8.05	382.9	0.000	0.056	-0.329
43	<i>umc20</i>	9.03	233.1	0.001	0.049	-0.286
44	<i>ufg68</i>	9.04	290	0.001	0.053	-0.287
45	<i>AY110060</i>	10.01	22.3	0.001	0.057	-0.295

†V. A.: Valor aditivo en μg carotenos g^{-1} MS (B73 = 1; Mo17 = -1).

Cuadro 2. 6 QTLs de β -criptoxantina medidos en grano de maíz de IBM-RILs.

No.	Marcador	Bin	Pos (cM)	P-value	r ²	V.A. [†]
46	<i>umc1562</i>	8.05	310.9	0.000	0.117	-0.385
47	<i>umc1959</i>	8.05	309.7	0.000	0.105	-0.367
48	<i>ufg80</i>	8.05	317	0.000	0.067	-0.284
49	<i>umc1846</i>	8.05	357.9	0.000	0.120	-0.381
50	<i>bnlg666</i>	8.05	324.5	0.000	0.138	-0.410
51	<i>bnlg162</i>	8.05	367	0.000	0.133	-0.403
52	<i>umc12a</i>	8.05	329.9	0.000	0.144	-0.440
53	<i>bnlg1651</i>	8.05	331.6	0.000	0.165	-0.462
54	<i>umc1316</i>	8.05	338.9	0.000	0.159	-0.444
55	<i>umc1777</i>	8.05	382.9	0.000	0.158	-0.438

†V. A.: Valor aditivo en μg carotenos g^{-1} MS (B73 = 1; Mo17 = -1).

Cuadro 2. 7 QTLs de zeaxantina medidos en grano de maíz de IBM-RILs.

No.	Marcador	Bin	Pos (cM)	P-value	r ²	V.A. [†]
56	<i>bnlg666</i>	8.05	324.5	0.000	0.067	-0.234
57	<i>bnlg162</i>	8.05	367	0.000	0.069	-0.239
58	<i>umc12a</i>	8.05	329.9	0.000	0.084	-0.268
59	<i>bnlg1651</i>	8.05	331.6	0.000	0.103	-0.291
60	<i>isu114</i>	8.05	339.9	0.000	0.107	-0.291
61	<i>umc1777</i>	8.05	382.9	0.000	0.069	-0.235
62	<i>bnl12.30a</i>	8.05	342.8	0.000	0.072	-0.255
63	<i>asg2</i>	10.04	221.6	0.001	0.050	-0.191

[†]V. A.: Valor aditivo en µg carotenos g⁻¹ MS (B73 = 1; Mo17 = -1).

Cuadro 2. 8 QTLs de provitamina A medidos en grano de maíz de IBM-RILs.

No.	Marcador	Bin	Pos (cM)	P-value	r ²	V.A. [†]
64	<i>psr160a</i>	6.01	87.7	0.001	0.059	-0.399
65	<i>rz242a</i>	6.01	106.7	0.000	0.059	-0.399
66	<i>umc1006</i>	6.02	103.9	0.001	0.048	-0.378
67	<i>rz444e</i>	6.05	123.7	0.001	0.062	-0.414
68	<i>umc1562</i>	8.05	310.9	0.000	0.068	-0.484
69	<i>mmp15</i>	8.05	305.6	0.000	0.076	-0.515
70	<i>psb107a</i>	8.05	314.1	0.000	0.074	-0.488
71	<i>ufg74</i>	8.05	320.9	0.000	0.073	-0.500
72	<i>bnlg162</i>	8.05	367	0.000	0.066	-0.469
73	<i>umc12a</i>	8.05	329.9	0.000	0.102	-0.605
74	<i>csu292</i>	8.05	358.4	0.000	0.083	-0.523
75	<i>umc1340</i>	8.05	334.9	0.000	0.130	-0.631
76	<i>hda103</i>	8.05	336.4	0.000	0.118	-0.599
77	<i>isu114</i>	8.05	339.9	0.000	0.099	-0.550
78	<i>umc1777</i>	8.05	382.9	0.000	0.090	-0.548

[†]V. A.: Valor aditivo en µg carotenos g⁻¹ PMS (B73 = 1; Mo17 = -1).

Cuadro 2. 9 QTLs de total carotenos medidos en grano de maíz de IBM-RILs.

No.	Marcador	Bin	Pos (cM)	P-value	r ²	V.A. [†]
79	<i>umc1229</i>	6.01	65.8	0.000	0.066	-1.127
80	<i>uaz232b</i>	6.01	79.2	0.000	0.088	-1.274
81	<i>umc2056</i>	6.01	99	0.000	0.081	-1.248
82	<i>cdo545</i>	6.01	71.7	0.000	0.090	-1.356
83	<i>psr160a</i>	6.01	87.7	0.000	0.082	-1.273
84	<i>uck1</i>	6.01	75.5	0.000	0.084	-1.276
85	<i>mmp160</i>	6.01	80.8	0.000	0.082	-1.274
86	<i>AY110213</i>	6.01	98.4	0.000	0.112	-1.464
87	<i>mmp20</i>	6.01	84.8	0.000	0.075	-1.166
88	<i>mmp4</i>	6.01	95.1	0.000	0.077	-1.215
89	<i>isu085a</i>	6.02	53.6	0.000	0.065	-1.116
90	<i>umc1083</i>	6.02	127.8	0.000	0.092	-1.300
91	<i>mir1</i>	6.02	106	0.000	0.103	-1.390
92	<i>bnlg2191</i>	6.02	148.7	0.000	0.055	-1.016
93	<i>agrr189</i>	6.04	124.5	0.000	0.086	-1.286
94	<i>umc111b</i>	7.03	332.9	0.000	0.065	-1.144
95	<i>npi389</i>	7.03	308.3	0.000	0.068	-1.160
96	<i>umc110a</i>	7.03	318.7	0.000	0.071	-1.211
97	<i>umc2357</i>	8.08	514.2	0.001	0.053	0.987
98	<i>umc1673</i>	8.08	502.9	0.000	0.058	1.053
99	<i>AY103806</i>	8.08	569	0.000	0.059	1.043

[†]V. A.: Valor aditivo en µg carotenos g⁻¹ MS (B73 = 1; Mo17 = -1)

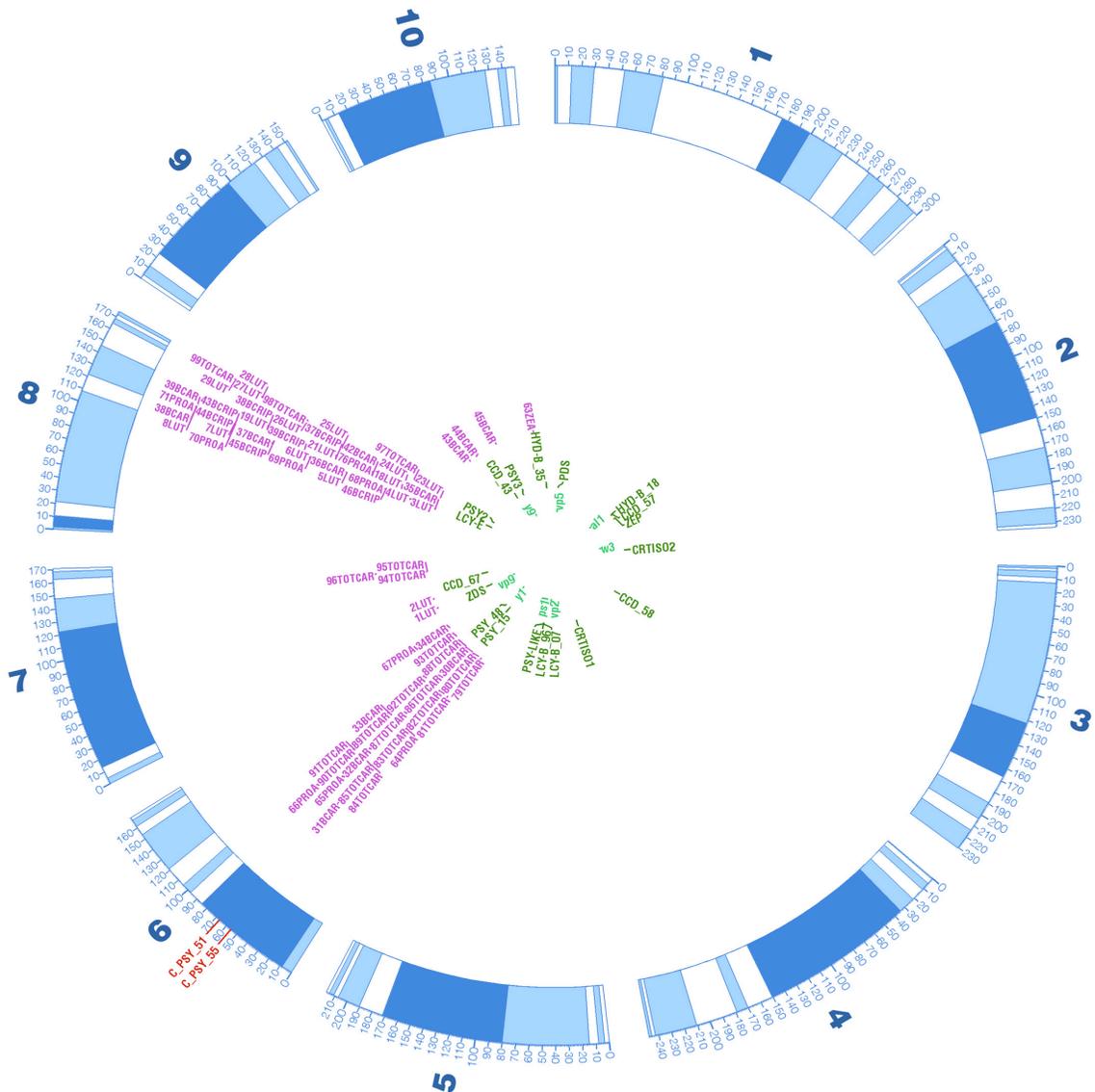
Correspondencia de QTLs con mutantes y genes conocidos

Se realizó una búsqueda de literatura sobre la ubicación de mutantes y genes de enzimas de la ruta de los carotenos identificados hasta ahora (Cuadro 2.1), para compararlos con los marcadores de los QTLs identificados (Figura 2.3). El marcador *psr160a* (total carotenos) se aproximó al gen *fitoeno sintasa* (*PSY*) por 970×10^3 pb en el bin 6.01 y al gen *fitoeno sintasa*, *precursor cloroplástico* en el bin 6.02 por 2.2×10^6 pb. El mutante respectivo *y1* se acercó con el marcador *mmp4* (total carotenos) por $\sim 1 \times 10^6$ pb en el bin 6.02.

De la misma forma, para el gen *PSY*, pero en el bin 8.08 los marcadores más próximos fueron: *AY103806* (Total carotenos) por 3.3×10^6 pb; *AY110053*, *umc1933* (luteína) y *umc1673* (Total carotenos) por $\sim 1.8 \times 10^6$ pb, *bnlg1823* (luteína) 1.4×10^6 pb, *umc1005* (luteína) 573×10^3 pb, *umc2357* (Total carotenos) 500×10^3 pb (Figura 2.3). El marcador *mmp75* (luteína) se aproximó al gen ζ -caroteno desaturasa por 2.6×10^6 pb y al mutante *vp9* relacionado a esta enzima, por $\sim 2.8 \times 10^6$ pb en el bin 7.02.

Existieron varios QTLs próximos al gen *licopeno ϵ -ciclase (LYC-E)* ubicados en el bin 8.05: los marcadores *hda103* (luteína y provitamina A) por 1.4×10^6 pb, *umc1316* (luteína y β -criptoxantina) e *isu114* (luteína, zeaxantina y provitamina A) por $\sim 1.2 \times 10^6$ pb, *bnl12.30a* (luteína) por 1×10^6 pb y el más cercano es *umc1777* (luteína, β -caroteno, zeaxantina y provitamina A) por 421×10^3 pb.

El resto de los marcadores identificados como QTLs se alejaron a más de 3.3×10^6 pb de la ubicación de algún mutante o gen de la ruta de los carotenos. Lo anterior refleja 26 QTLs relacionados a una enzima conocida de la ruta y 73 QTLs que podrían contener nuevas isoformas de la ruta, factores de transcripción o proteínas regulatorias que determinan la actividad de un conjunto de enzimas relacionadas al contenido de carotenos en el grano.



Mutantes

- y1: yellow 1
- vp2: viviparous 2
- vp5: viviparous 5
- w3: white seedling
- vp9: viviparous 9

Genes

- HYD-B: β-caroteno hidroxilasa
- CCD: Caroteno dioxigenasa
- CRTISO: Caroteno isomerasa
- PDS: Fitoeno dehidrogenasa
- LCY-B: β-licopeno ciclasa
- PSY: Fitoeno sintasa
- LCY-E: ε-Licopeno ciclasa
- ZDS: ζ-caroteno desaturasa

QTLs

- LUT: luteína
- BCAR: β-caroteno
- BCRIP: β-criptoxantina
- ZEA: zeaxantina
- PROA: provitamina A
- TOTCAR: total de carotenos

Genes candidatos

- GRMZM2G011655: C_PSY_55
- GRMZM2G386051: C_PSY_51

Figura 2. 3 QTLs de grano de las IMB-RILs en los 10 cromosomas del maíz.

Los QTLs más frecuentes en luteína, β -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina y provitamina A se encontraron en el bin 8.05, entre la posición 329 cM y 382 cM entre los marcadores *umc12a* y *umc1777*, lo cual no corresponde con los QTLs encontrados para grano en líneas de la cruza W64a \times A632 (Wong *et al.*, 2004), que abarca de 54 a 88 cM en el cromosoma 8. Tampoco existieron coincidencias con los QTLs del cromosoma 6 de 14 a 25 cM y el cromosoma 7 de 80 a 85 cM reportado por ese mismo grupo de investigadores.

En las RIL By804 \times B73 (Chander *et al.*, 2008) se identificaron 33 QTLs relacionados con carotenos. Debido a la amplia utilización del maíz B73 se esperaba una mayor coincidencia de QTLs con los obtenidos en este estudio. Sin embargo, sólo dos marcadores se aproximaron al QTL de α -caroteno ubicado a 112 cM (Chander *et al.*, 2008), el *umc1006*, asociado al fenotipo de provitamina A en el bin 6.02 en la posición 103.9 cM y el *mir1*, asociado a carotenos totales a 106 cM. Los resultados reflejan divergencia entre las poblaciones; además, en la cruza IBM, el maíz B73 es utilizado como progenitor femenino y no como progenitor masculino, como ocurrió en la cruza By804 \times B73, de manera que eventualmente los efectos maternos pudieran introducir alguna confusión, máxime que los carotenoides participan en organelos de herencia materna como cloroplastos en procesos tan importantes como las reacciones luminosas de la fotosíntesis.

En una población de RIL, la LHRF_F_{3:4}, se analizaron QTLs relacionados con la desecación y contenido de ABA (Capelle *et al.*, 2010). Dos QTLs de desecación coincidieron con los obtenidos en este experimento. El QTL %DW_60_5, afín al gen *Rab17*, se localizó en el bin 6.05 en la posición 148 cM, lo que coincidió con el QTL Total carotenos asociado con el marcador *bnlg2191* a los 148.7 cM. Otro QTL relacionado a la desecación, %DW_80_6, en el bin 9.07 a 291 cM, coincidió con el QTL β -caroteno (marcador *ufg68*) a 290 cM. Un QTL de contenido de

ABA, ABA_endosperm_80_2 afin al gen *caroteno dioxigenasa* ubicado en el bin 9.07 a 279 cM se aproximó al QTL para β -caroteno (marcador *ufg68*) por 11 cM.

Correspondencia de QTLs con genes candidatos de la ruta de los carotenos

Se realizó una búsqueda bioinformática de las secuencias reportadas de *Arabidopsis thaliana* y maíz para enzimas de la ruta de los carotenos con el fin de determinar si los QTLs identificados corresponden a enzimas previamente conocidas. La lista de genes candidatos obtenida por medios bioinformáticos amplía la limitada lista de mutantes que se conocen de carotenos en maíz. En este caso se agregaron dos genes candidatos sin función conocida en la base de datos pero que al realizar la comparación de secuencias usando BLAST aparecieron como fuertes candidatos para *fitoeno sintasa*.

El marcador *psr160a* se asoció a un QTL para β -caroteno, provitamina A y total de carotenos en el bin 6.01, coincidente con un gen candidato para *fitoeno sintasa* (GRMZM2G011655). Igualmente, los marcadores *AY110213* y *mmp20* relacionados con el QTL de Total carotenos en el bin 6.01 coincidieron con otro gen candidato para *fitoeno sintasa* (GRMZM2G386051) (Figura 2.3).

Finalmente, se localizaron QTLs involucrados en el contenido de carotenos en grano y se ubicaron genes candidatos, lo que refleja la utilidad del análisis estadístico cuantitativo, molecular y bioinformático para la ubicación de regiones genómicas y genes de interés.

2.5. Conclusiones

El contenido de β -caroteno se encontró en bajas concentraciones en el grano de maíz de la población IBM 302, mientras que luteína y zeaxantina representaron más de la mitad del contenido total de carotenos. Se identificaron 99 QTLs en el grano de maíz para carotenos, localizados en los cromosomas 6, 7, 8, 9 y 10, de los cuales 29 correspondieron a luteína, 16 a β -caroteno, 10 a β -criptoxantina, 8 a zeaxantina, 15 a provitamina A y 21 a total carotenos. Sobresalieron los QTLs asociados a los marcadores *umc12a* y *umc1777* por ser los más significativos ($P \leq 0.0001$) para luteína, β -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina y provitamina A. Existió correspondencia entre los QTLs detectados y genes asociados con mutantes principalmente de *fitoeno sintasa*, ζ -caroteno desaturasa y licopeno ϵ -ciclaza. Se identificaron dos genes candidatos para *fitoeno sintasa* en el bin 6.01 (GRMZM2G011655 y GRMZM2G386051) de los QTLs localizados en este estudio.

2.6. Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo y la facilidad brindada por las Líneas Prioritarias de Investigación 5 y 6 del Colegio de Postgraduados y al Fideicomiso Institucional. De la misma manera, se agradece el apoyo económico previo del fondo sectorial SAGARPA-COFUPRO y CONACYT. Se agradece al Dr. Paulino Rodríguez Pérez y Dr. Burgueño Ferreira por su apoyo en el análisis de los resultados. Este proyecto fue posible gracias a una colaboración interinstitucional entre investigadores del CINVESTAV y el Colegio de Postgraduados.

2.7. Literatura citada

Andorf, C. M., C. J. Lawrence, L. C. Harper, M. L. Schaeffer, D. A. Campbell, and T. Z. Sen. 2010. The locus lookup tool at MaizeGDB: identification of genomic regions in maize by

- integrating sequence information with physical and genetic maps. *Bioinformatics* 26: 434-436.
- Berardo, N., O. V. Brenna, A. Amato, P. Valoti, V. Pisacane, and M. Motto. 2004. Carotenoids concentration among maize genotypes measured by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5: 393-398.
- Britton, G. 2009. Vitamin A and vitamin A deficiency. *In*: Britton, G., S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (eds). *Carotenoids*. B. Verlag, Basel. pp: 173 - 190.
- Broman, K. W., H. Wu, S. Sen, and G. A. Churchill. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19: 889-890.
- Buckner, B., T. L. Kelson, and D. S. Robertson. 1990. Cloning of the *yl* locus of maize, a gene involved in the biosynthesis of carotenoids. *Plant Cell* 2: 867-876.
- Capelle, V., C. Remoué, L. Moreau, A. Reyss, A. Mahé, A. Massonneau, M. Falque, A. Charcosset, C. Thévenot, P. Rogowsky, S. Coursol, and J. L. Prioul. 2010. QTLs and candidate genes for desiccation and abscisic acid content in maize kernels. *BMC Plant Biology* 10: 2.
- Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer, and E. C. K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.

- Chander, S., Y. Q. Guo, X. H. Yang, J. Zhang, X. Q. Lu, J. B. Yan, T. M. Song, T. R. Rocheford, and J. S. Li. 2008. Using molecular markers to identify two major loci controlling carotenoid contents in maize grain. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 223-233.
- FAO. 2003. *Perfiles Nutricionales por Países-México*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Rome. 45 p.
- FAO. 2010. *The state of food insecurity in the world*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 58 p.
- Fraser, P. D., and P. M. Bramley. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* 43: 228-265.
- Gallagher, C. E., P. D. Matthews, F. Li, and E. T. Wurtzel. 2004. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. *Plant Physiology* 135: 1776-1783.
- Hable, W. E., K. K. Oishi, and K. S. Schumaker. 1998. *Viviparous-5* encodes phytoene desaturase, an enzyme essential for abscisic acid (ABA) accumulation and seed development in maize. *Molecular & General Genetics* 257: 167-176.
- Kurilich, A. C., and J. A. Juvik. 1999. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1948-1955.
- Lee, M., N. Sharopova, W. D. Beavis, D. Grant, M. Katt, D. Blair, and A. Hallauer. 2002. Expanding the genetic map of maize with the intermated B73 x Mo17 (IBM) population. *Plant Molecular Biology* 48: 453-461.

- Li, F., C. Murillo, and E. T. Wurtzel. 2007. Maize *Y9* encodes a product essential for 15-cis- ζ -carotene isomerization. *Plant Physiology* 144: 1181-1189.
- Li, Z. H., P. D. Matthews, B. Burr, and E. T. Wurtzel. 1996. Cloning and characterization of a maize cDNA encoding phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Molecular Biology* 30: 269-279.
- Matthews, P. D., R. Luo, and E. T. Wurtzel. 2003. Maize phytoene desaturase and ζ -carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *Journal of Experimental Botany* 54: 2215-2230.
- Ogawa, M., T. Kusano, N. Koizumi, M. Katsumi, and H. Sano. 1999. Gibberellin-responsive genes: high level of transcript accumulation in leaf sheath meristematic tissue from *Zea mays* L. 645-657 p.
- Villalpando-Hernández, S., J. Rivera Dommarco, T. Shamah-Levy, F. Mejía-Rodríguez, L. M. Barragán-Heredia, M. Camacho-Cisneros, and M. C. Morales-Ruán. 2001. Micronutrientos. *In*: Rivera-Dommarco, J., T. Shamah-Levy, S. Villalpando-Hernández, T. González-de Cossío, B. Hernández-Prado and J. Sepúlveda (eds.) Encuesta Nacional de Nutrición 1999: Estado Nutricio de Niños y Mujeres en México. Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mexico. pp: 179-237.
- WHO. 2009. Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005. WHO Global Database on Vitamin A Deficiency. World Health Organization. Geneva. 55 p

http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598019_eng.pdf

(Accessed

09/12/2010).

Wong, J. C., R. J. Lambert, E. T. Wurtzel, and T. R. Rocheford. 2004. QTL and candidate genes phytoene synthase and ζ -carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 349-359.

Young, T. E., and D. R. Gallie. 2000. Programmed cell death during endosperm development. *Plant Molecular Biology* 44: 283-301.

CONCLUSIONES GENERALES

1. El análisis de los resultados mostró que β -caroteno es el caroteno mayoritario en las hojas de maíz, pues representó el 80% del total de carotenos.
2. Las hojas de maíz contienen al menos 8 veces más β -caroteno que el grano, lo que indica que las hojas pueden ser una alternativa de estudio de la ruta de los carotenos para incrementar β -caroteno en grano.
3. Los QTLs en hoja fueron diferentes a los localizados en grano, se localizaron en diferentes cromosomas o en diferentes regiones dentro del mismo cromosoma. En hoja se localizaron en los cromosomas 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8, mientras que en grano en los cromosomas 6, 7, 8, 9 y 10.
4. El contenido de luteína en grano representó el 32.3% del contenido de carotenos y zeaxantina 22.7%, mientras que el contenido de β -caroteno sólo fue del 10%.
5. Se encontraron regiones de QTLs ubicadas anteriormente para carotenoides en grano, se agregaron nuevas regiones a las ya identificadas y se localizaron genes candidatos que pudieran estar involucrados en la biosíntesis de carotenos.
6. Se encontró una mayor cantidad de QTLs (99) en grano que en hoja (25), lo que puede significar que el contenido de carotenos está regulado por un número mayor de genes en grano que en tejido fotosintético.

PERSPECTIVAS

Los nuevos QTLs identificados en este trabajo serán importantes para la localización de nuevos genes o factores que determinen el contenido de carotenos en maíz. Una manera de corroborarlo sería mediante la evaluación de los genes existentes en el QTL asociado con el marcador *umc2239* en hoja ubicado en el bin 1.07 y los genes candidatos en grano (GRMZM2G011655 y GRMZM2G386051) asociados con los marcadores *AY110213* y *mmp20*, localizados en el bin 6.01, para determinar si su función está relacionada con el contenido de carotenos.

ANEXO

Cuadro A 1. Posición física de los marcadores significativos para los QTLs de grano.

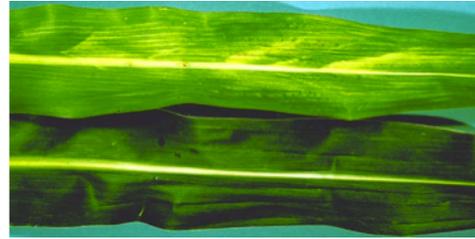
Marcador	Bin	Posición (cM)	Inicio (pb)	Final (pb)
<i>umc1229</i>	6.01	65.8	22,080,015	22,580,014
<i>uaz232b</i>	6.01	79.2	31,455,997	31,955,996
<i>cdo545</i>	6.01	71.7	42,235,704	42,735,703
<i>psr160a</i>	6.01	87.7	54,200,299	54,700,298
<i>uck1</i>	6.01	75.5	57,389,240	57,889,239
<i>mmp160</i>	6.01	80.8	65,063,598	65,563,597
<i>AY110213</i>	6.01	98.4	67,389,636	67,889,635
<i>mmp20</i>	6.01	84.8	70,569,176	71,069,175
<i>rz242a</i>	6.01	106.7	72,846,796	73,346,795
<i>mmp4</i>	6.01	95.1	79,237,574	79,737,573
<i>isu085a</i>	6.02	53.6	86,888,666	87,388,665
<i>umc1006</i>	6.02	103.9	87,211,702	87,711,701
<i>umc1083</i>	6.02	127.8	87,396,593	87,896,592
<i>mir1</i>	6.02	106	87,538,246	88,038,245
<i>bnlg2191</i>	6.02	148.7	91,944,378	92,444,377
<i>agrr189</i>	6.04	124.5	119,605,709	120,105,708
<i>rz444e</i>	6.05	123.7	152,026,210	152,526,209
<i>mmp75</i>	7.02	155.2	20,135,523	20,635,522
<i>psr371b</i>	7.02	160.7	49,456,487	49,956,486
<i>umc111b</i>	7.03	332.9	132,643,750	133,143,749
<i>npi389</i>	7.03	308.3	136,948,518	137,448,517
<i>umc110a</i>	7.03	318.7	140,860,239	141,360,238
<i>bnlg1176</i>	8.04	330.4	120,745,223	121,245,222
<i>AY104566</i>	8.05	342	123,302,835	123,802,834
<i>umc1562</i>	8.05	310.9	124,268,998	124,768,997
<i>mmp15</i>	8.05	305.6	124,271,184	124,771,183
<i>umc1959</i>	8.05	309.7	125,782,989	126,282,988
<i>umc1263</i>	8.05	311.5	126,374,691	126,874,690
<i>psb107a</i>	8.05	314.1	127,611,329	128,111,328
<i>mmp195b</i>	8.05	361.2	128,810,029	129,310,028
<i>ufg80</i>	8.05	317	129,130,950	129,630,949
<i>umc1846</i>	8.05	357.9	129,144,194	129,644,193
<i>ufg74</i>	8.05	320.9	130,610,543	131,110,542
<i>bnlg666</i>	8.05	324.5	132,239,980	132,739,979
<i>bnlg2181</i>	8.05	366.8	132,239,980	132,739,979
<i>bnlg162</i>	8.05	367	132,239,980	132,739,979

Marcador	Bin	Posición (cM)	Inicio (pb)	Final (pb)
<i>rz390a</i>	8.05	373.5	132,900,895	133,400,894
<i>umc1889</i>	8.05	332.1	133,102,106	133,602,105
<i>umc12a</i>	8.05	329.9	133,175,804	133,675,803
<i>bnlg1651</i>	8.05	331.6	133,234,118	133,734,117
<i>csu292</i>	8.05	358.4	134,220,347	134,720,346
<i>umc1340</i>	8.05	334.9	134,483,218	134,983,217
<i>hda103</i>	8.05	336.4	136,957,248	137,457,247
<i>umc1316</i>	8.05	338.9	137,230,888	137,730,887
<i>isu114</i>	8.05	339.9	137,439,761	137,706,774
<i>umc1777</i>	8.05	382.9	137,960,988	138,460,987
<i>bnl12.30a</i>	8.05	342.8	139,961,960	140,461,959
<i>umc1960</i>	8.06	413.2	158,695,027	159,195,026
<i>umc1149</i>	8.06	371.2	158,747,061	159,247,060
<i>mmp32</i>	8.06	416	158,885,981	159,385,980
<i>bnlg1823</i>	8.07	440.7	166,341,155	166,841,154
<i>umc2357</i>	8.08	514.2	168,776,121	168,776,685
<i>umc1005</i>	8.08	483	168,849,391	169,349,390
<i>umc1933</i>	8.08	496.3	170,105,324	170,605,323
<i>umc1673</i>	8.08	502.9	170,295,989	170,795,988
<i>AY110053</i>	8.08	550.4	170,512,840	170,513,273
<i>AY103806</i>	8.08	569	171,577,856	172,077,855
<i>umc20</i>	9.03	233.1	93,149,678	93,649,677
<i>ufg68</i>	9.04	290	115,684,900	116,184,899
<i>AY110060</i>	10.01	22.3	1,697,903	2,197,902
<i>asg2</i>	10.04	221.6	116,562,564	117,062,564

Fuente: Andorf *et al.*, 2010.



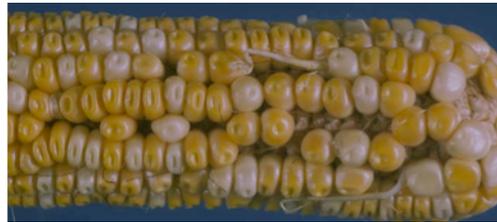
Mazorca autopolinizada segregando para *y1* (grano blanco)



Hojas de maíz *y1* (arriba) y plantas normales (abajo)



Mazorca autopolinizada que segrega grano blanco vivíparo (*vp2*) con embriones secos germinando parcialmente.



Mazorca segregando para *vp5* (granos incoloros germinando prematuramente con coleoptilos blancos).



Mutante *whiteseedling 3 (w3)* y plántula normal



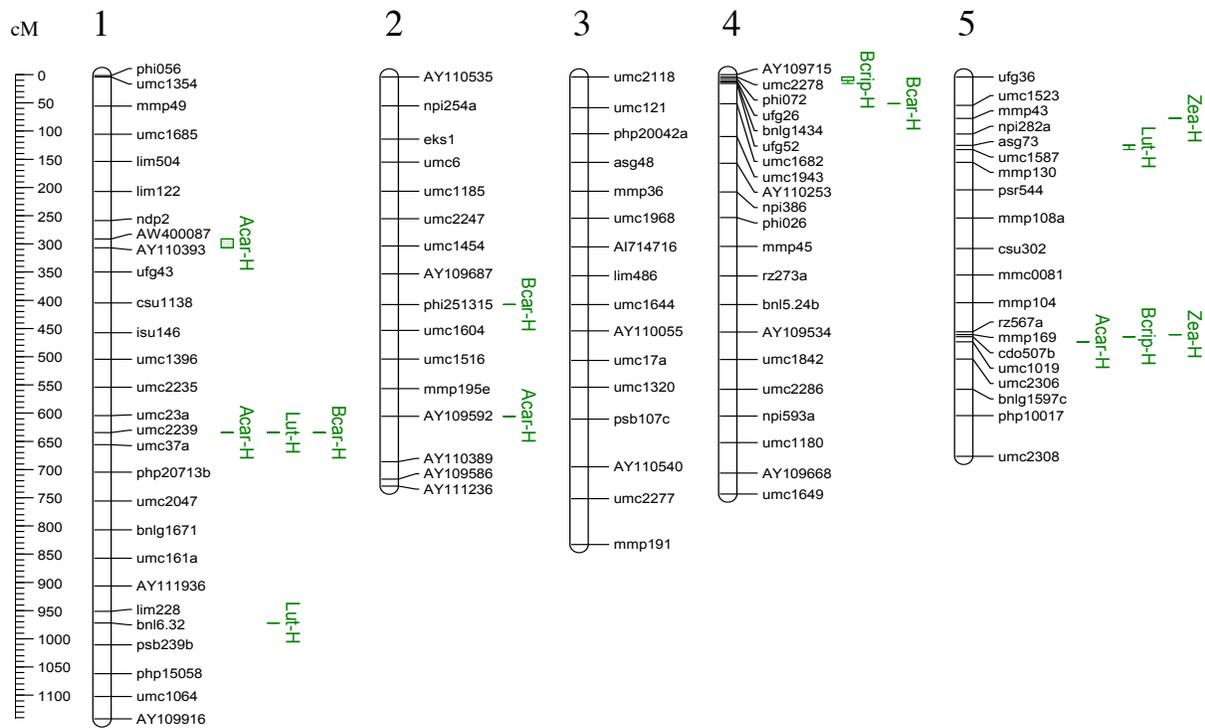
Mazorca autopolinizada segregando *vp9*, grano blanco, ocasionalmente con germinación prematura



Planta mutante albina (*al1*)

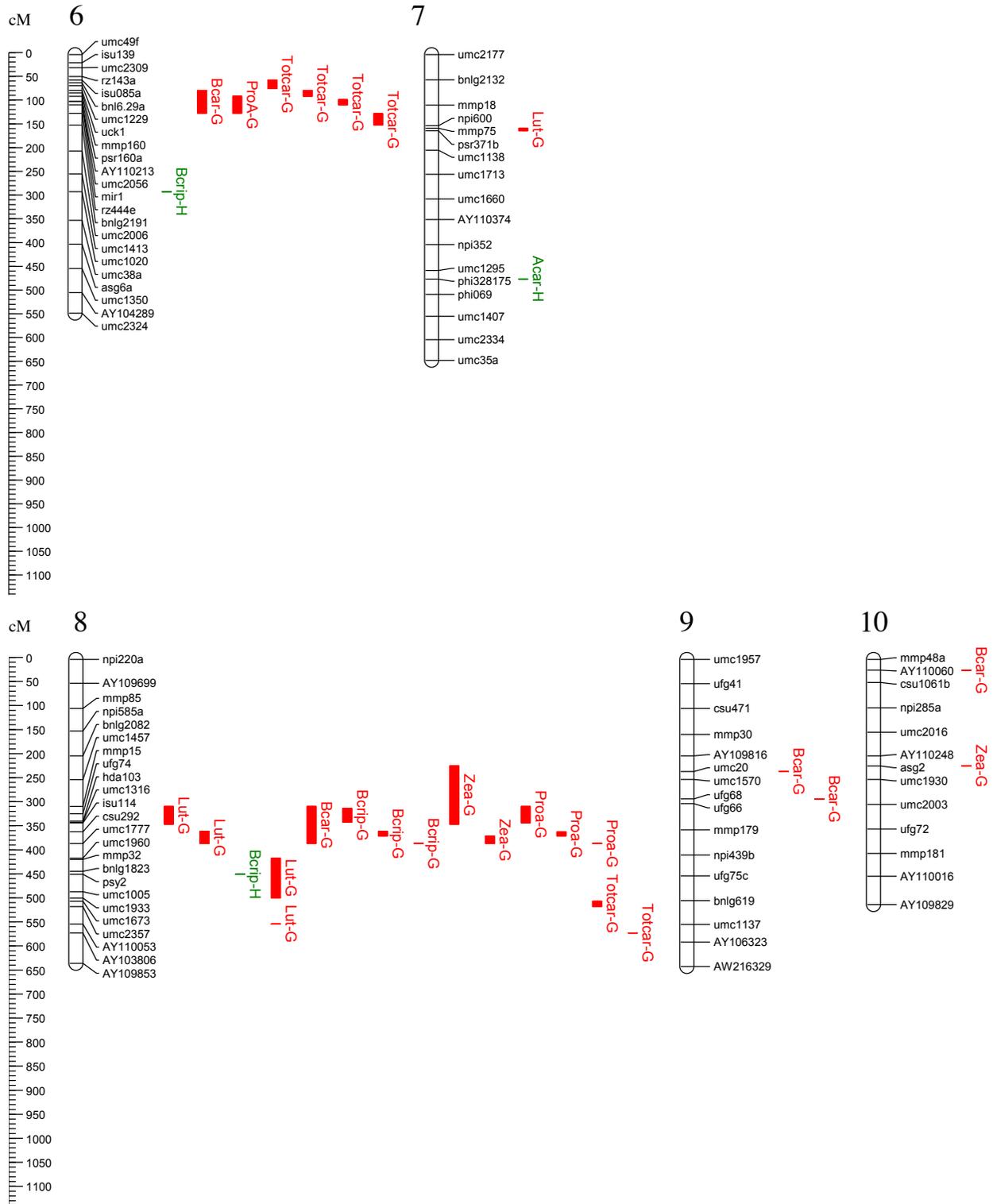
Fuente: <http://www.maizegdb.org/cgi-bin/phenovarimages.cgi?id=113268> (Consulta: 21/10/2010)

Figura A 1 Fenotipos deficientes en carotenos en maíz.



Lut: Luteína, Bcar: β -caroteno, Bcrip: β -criptoxantina, Proa: Provitamina A y Totcar: Total Carotenos.
G: grano (en rojo), H: hoja (en verde).

Figura A 2. Representación de cromosomas 1 al 5 con marcadores y QTLs de IBM-RILs.



Lut: Luteína, Bcar: β -caroteno, Bcrip: β -criptoxantina, Proa: Provitamina A y Totcar: Total Carotenos. G: grano (en rojo), H: hoja (en verde).

Figura A 3. Representación de cromosomas 6 al 8 con marcadores y QTLs de IBM-RILs.