

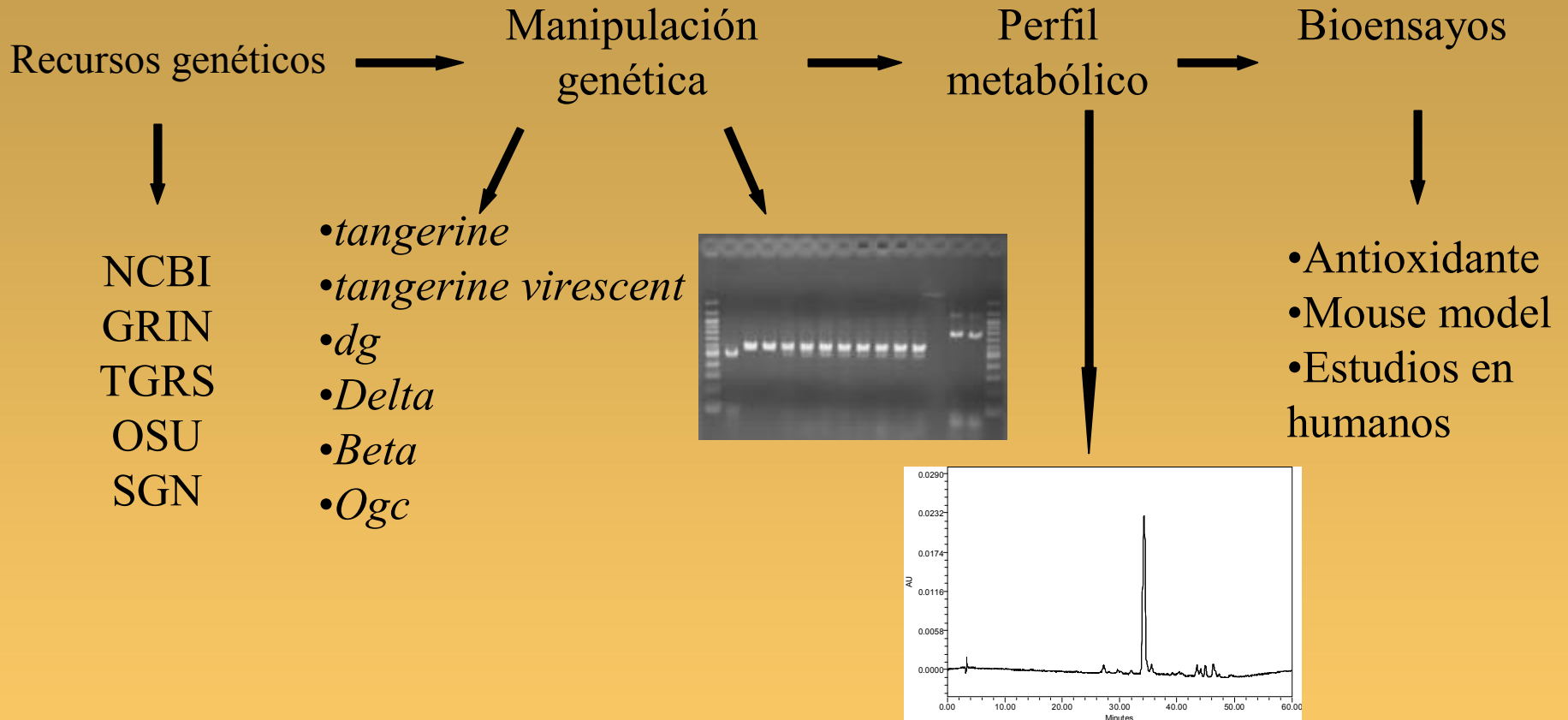
“Recursos fitogenéticos para probar efectos fisiológicos de carotenoides presentes en la dieta”

Susana De Jesús

Comite acesor:
David Francis
Mathew Kleinhenz
Steven Schwartz

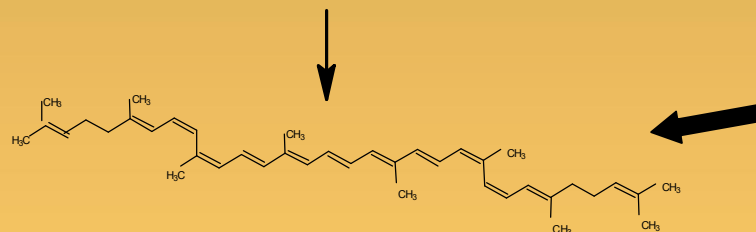
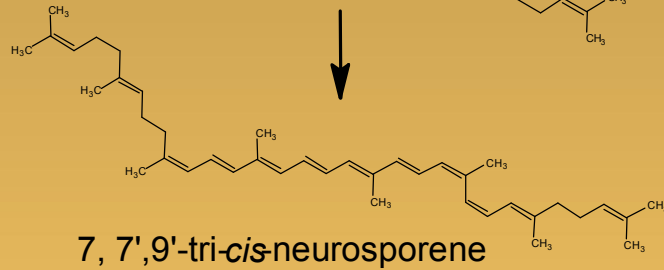
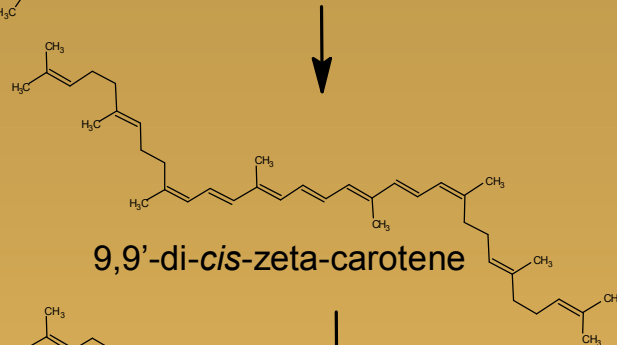
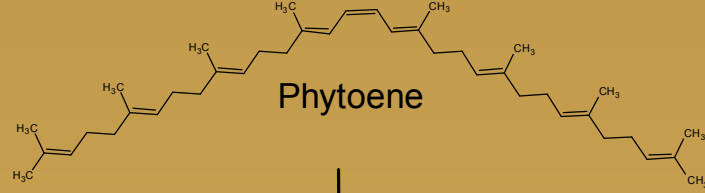


Tomate como modelo

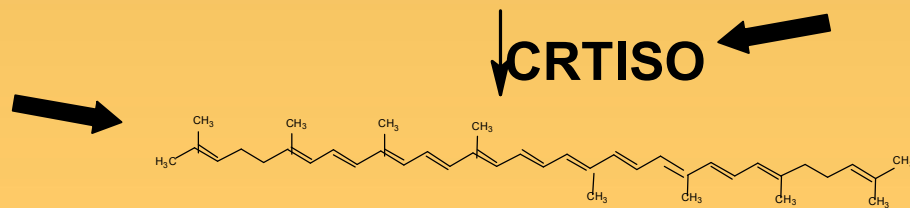


Introducción

- Estudios epidemiológicos sugieren una correlación entre el consumo de productos a base de tomate y un decrecimiento en ciertos tipos de cánceres.
- El efecto antioxidante del pigmento predominante, licopeno, sugiere que este podría ser un pigmento importante para la salud.
- Otros pigmentos en tomate pueden ser de interés nutricional o medicinal.
- Existen limitaciones en el uso de estos compuestos.
- Hay necesidad de recursos fitogenéticos para probar los efectos fisiológicos de compuestos que se cree tienen efectos nutricionales o medicinales.
- Licopeno existe en formas alternativas.



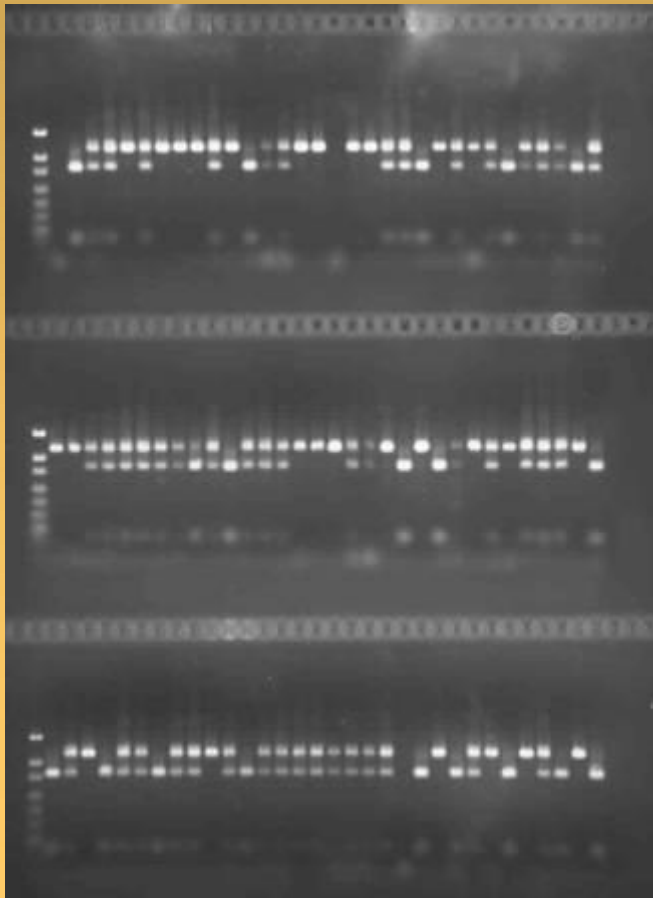
7,9,7'9'-tetra-*cis*-lycopene (polycopene)



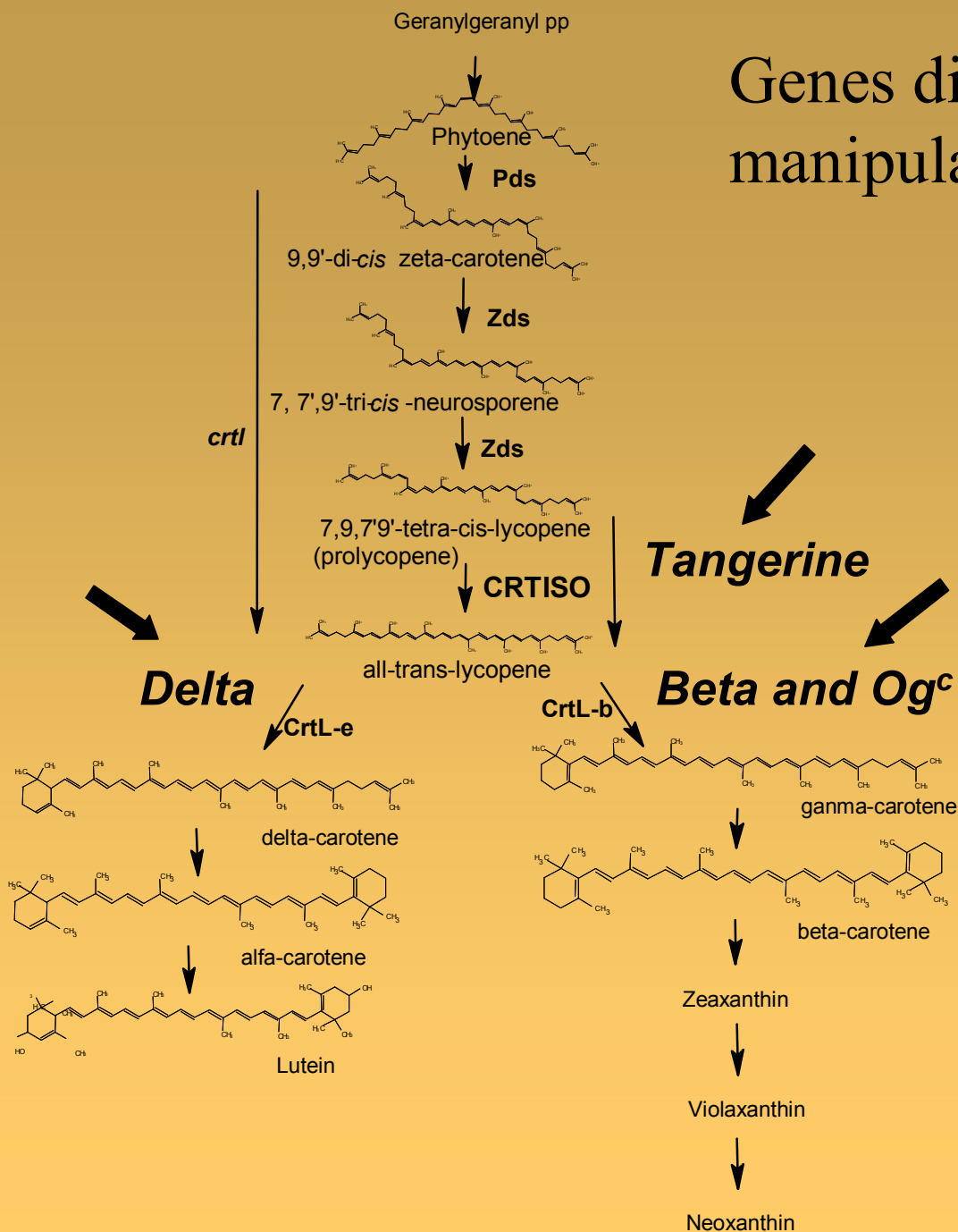
all-*trans*-lycopene

La enzima **CRTISO**
cataliza la formación de
all-*trans*-licopeno de
poly-*cis*-licopeno.

Métodos clásicos y molecular-assisted
proveen las herramientas necesarias para
manipular pigmentos en tomate.



Genes disponibles para la manipulación de carotenoides

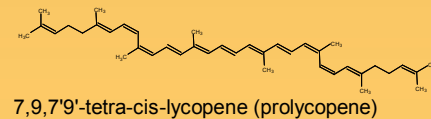
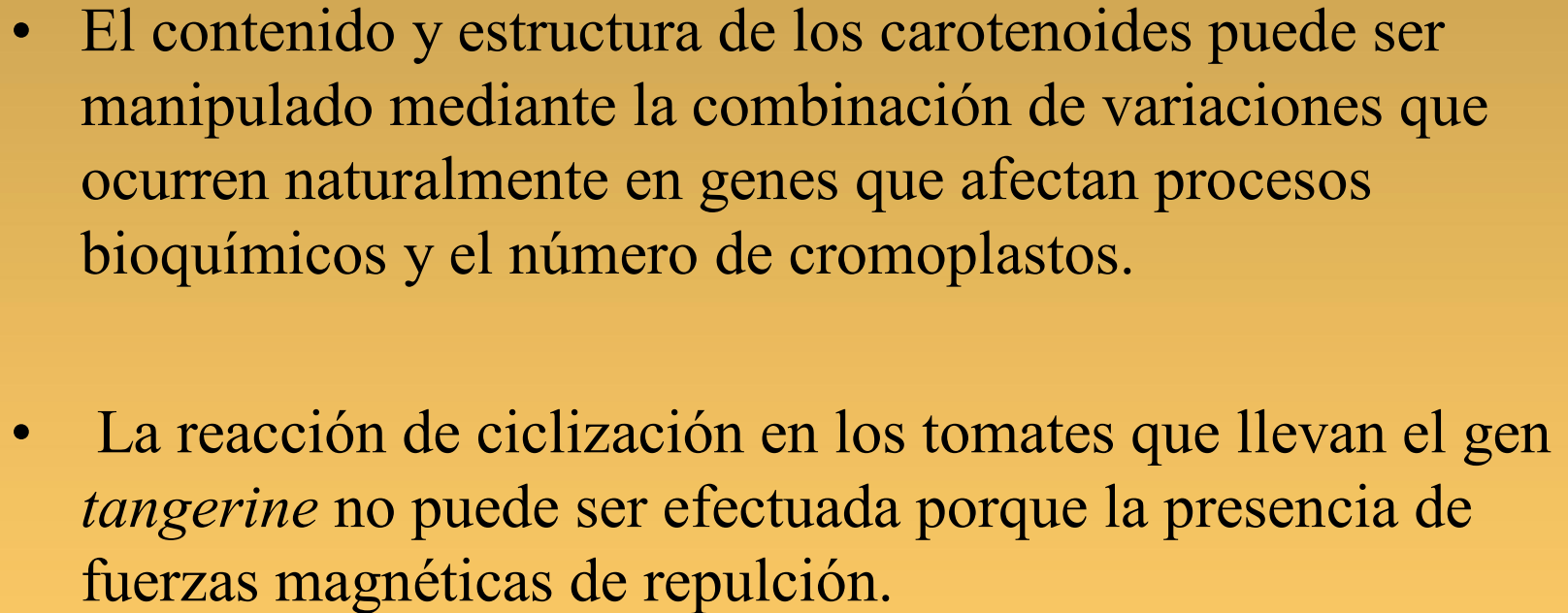


Ruta metabólica de la biosíntesis de carotenoides

Phytoeno desaturasa (Pds)
 Z-caroteno desaturasa (Zds)
 Carotenoid isomerasa (CRTISO)
 Licopeno β -ciclaza (CrtL-b)
 Licopeno ϵ -ciclaza (*CrtL-e*)

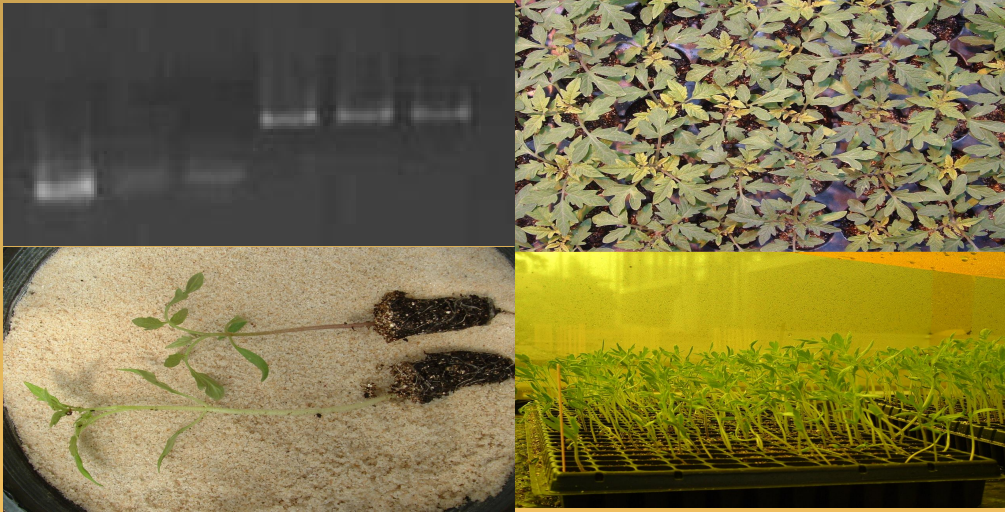
Objetivos

- 1) Desarrollar líneas de tomate con contenido de carotenoides aumentados y alterados.
- 2) Determinar la importancia de la estructura isomérica en la reacción de ciclización en la biosíntesis de carotenoides.
- 3) Aplicar perfil metabólico con HPLC para evaluar los metabolitos secundarios de los tomates desarrollados bajo el objetivo 1.

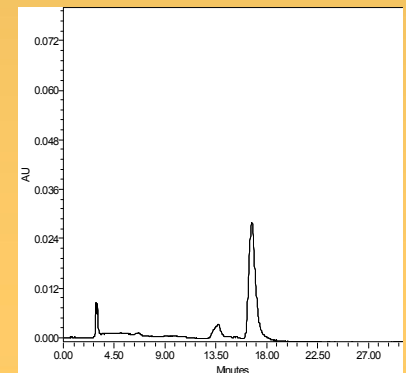


Diseño experimental

- Fase de selección
 - » Selección asistida con marcadores moleculares y clasica



- Fase de prueba
 - » Cuantificación de carotenoides
 - » Colección de datos para ANOVA



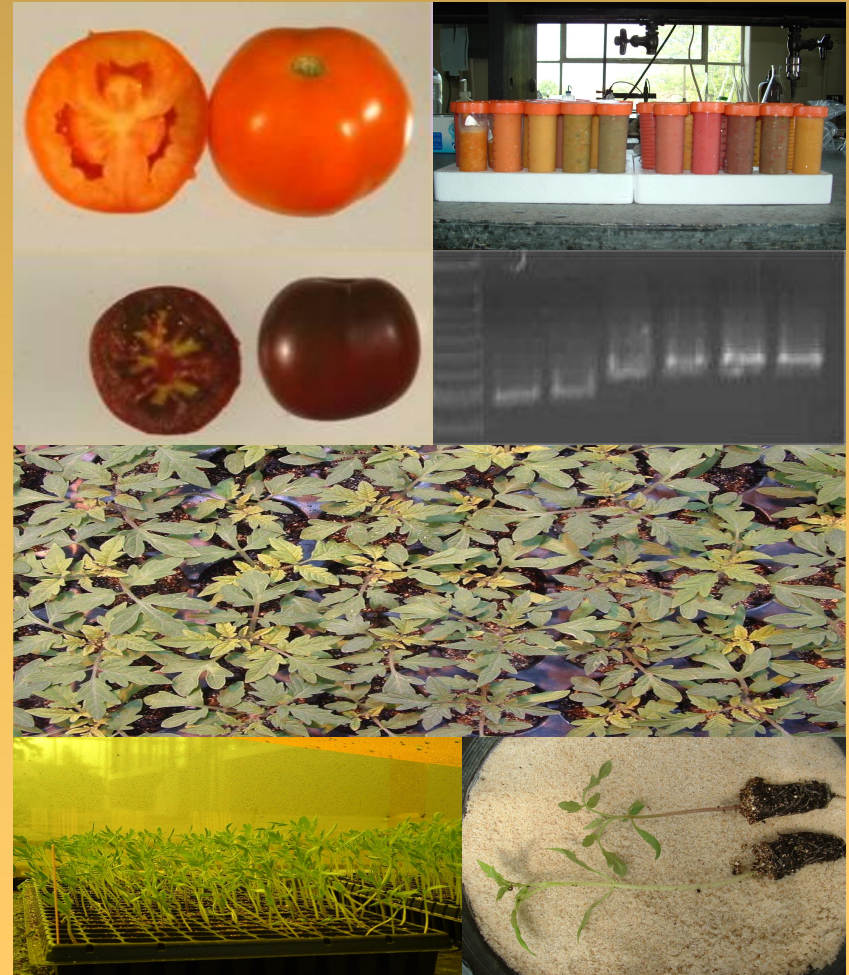
Objetivos 1 y 2

Cruces

- $dg/ogc \times t$ and t^v/ogc
- $dg/ogc \times Beta$
- $dg/ogc \times Delta$
- $Beta \times t$ and t^v/ogc
- $Delta \times t$ and t^v/ogc

Selección

- Selección alternativa
- Selección asistida con marcadores moleculares



Resultados



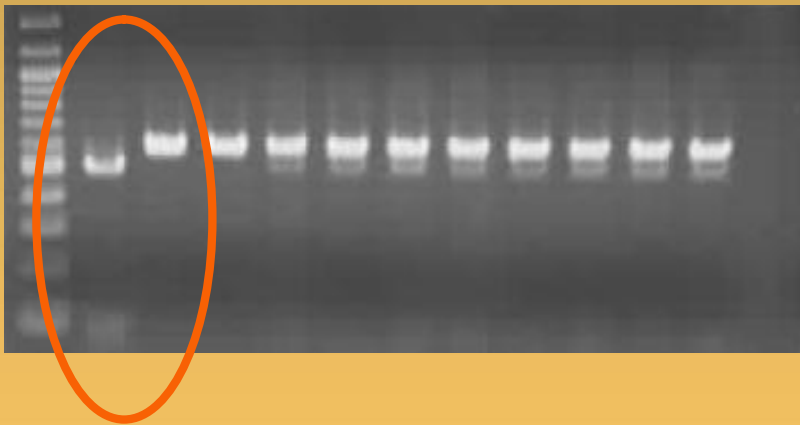
Selección asistida con marcadores moleculares

Lista de primers usado como marcadores para detectar la presencia de los genes que afectan el contenido y estructura de los carotenoides.

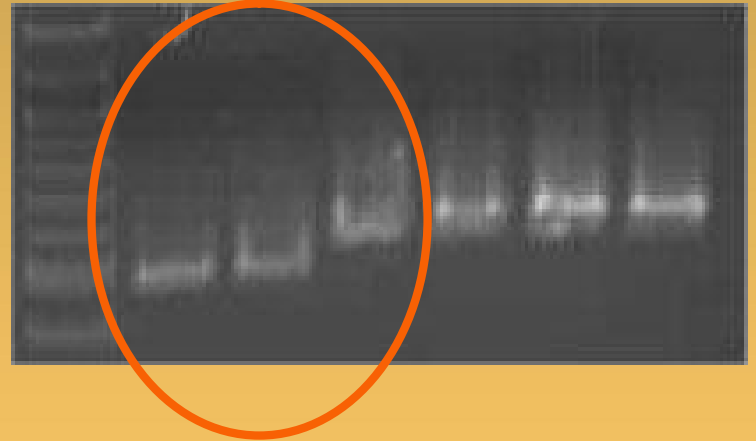
Marker	Sequence	Gen	Typo de Marcador	Temp (°C)	Ciclos	Enzima
*TD-M2 F1	5'-ttcttcggattgtccatggt-3'	<i>dg</i>	CAP	55	36	<i>Acl</i>
*T D-M2 R1	5'-caccaatgctatgtgccaaa-3'	<i>dg</i>	CAP	55	36	<i>Acl</i>
DlpF1	5'-tgcgaaaggtgatgttgtgat- 3'	<i>Delta</i>	CAP	55	38	<i>Hind III</i>
DlpR1	5'-ctcgggtcaaattggattgtt- 3'	<i>Delta</i>	CAP	55	38	<i>Hind III</i>
TangF2	5'-cgggcctaacaatgatattgaa-3'	<i>t</i>	Size pm	55	40	
Tang R1	5'-gccacaaagctgctgctgac-3'	<i>t</i>	Size pm	55	40	
TangF2	5'- cgggcctaacaatgatattgaa -3'	<i>t</i>	Size pm	55	44	
TangedelR	5'-ttgtcaaattccaagattacaga-3'	<i>t</i>	Size pm	55	44	

Marcadores moleculares

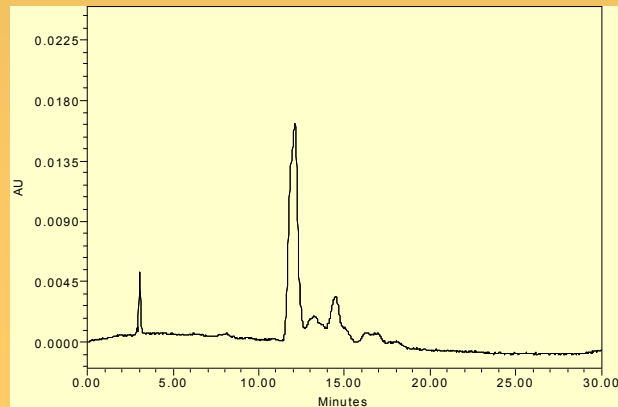
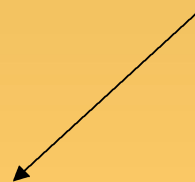
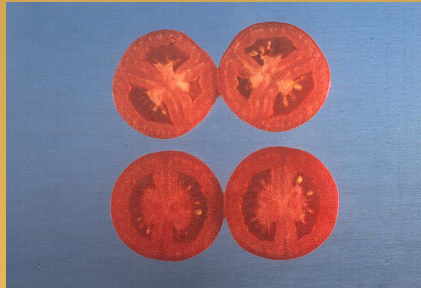
Delta



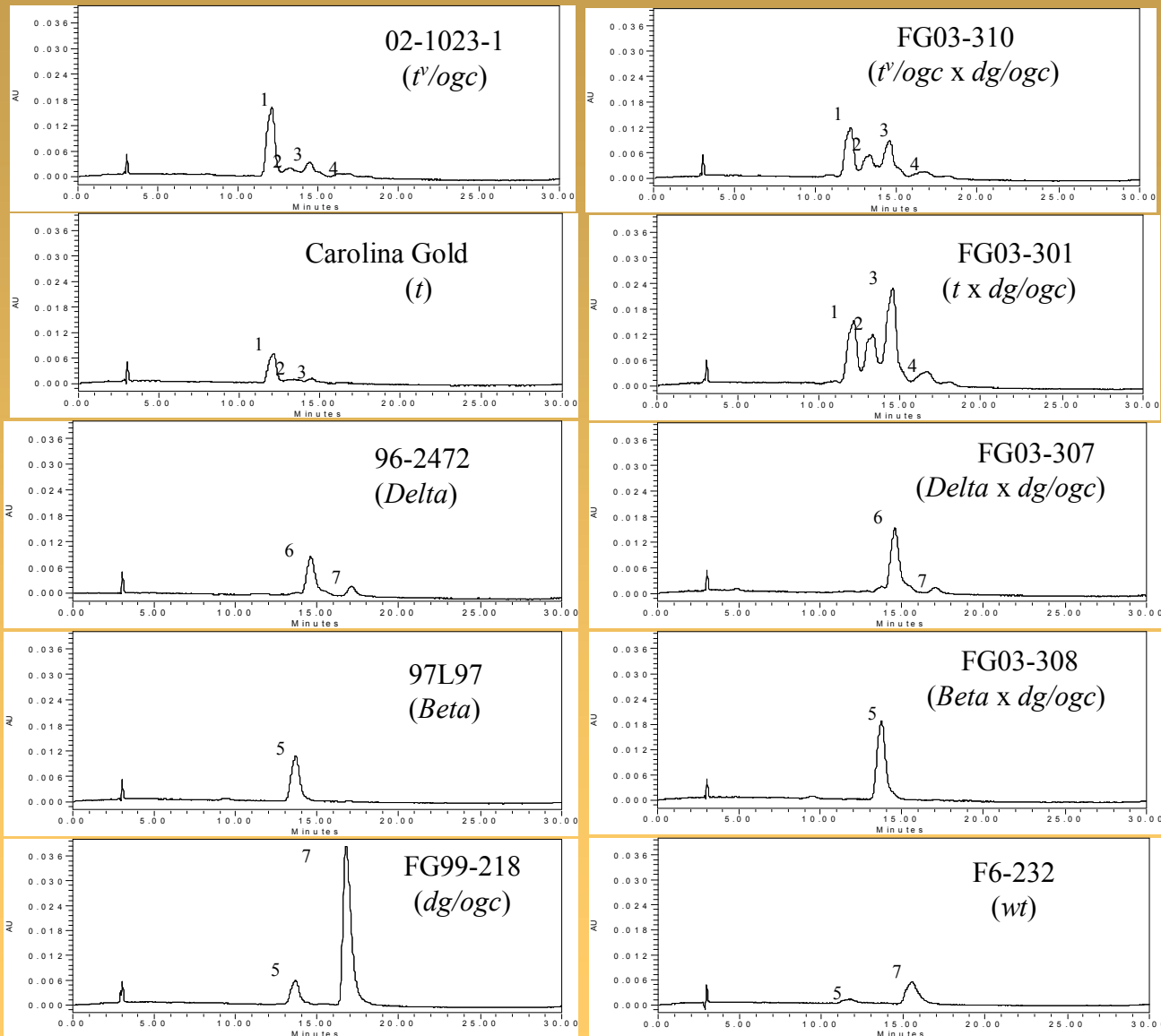
tangerine



HPLC metabolic profiling



Objetivo 1: Desarrollar líneas de tomates con la concentración de carotenoides aumentado y alterado.



La comparación de la concentración de carotenoides de las selecciones FG03-310, FG03-311 y FG03-301 contra los padres* sugiere que los cruces entre *t* y *dg* altera el contenido de carotenoides.

Linea/Variedad	Genotipo			ug/g peso fresco						
	<i>t</i>	<i>dg</i>	<i>ogc</i>	licopeno	β-caroteno	tetra- <i>cis</i> licopeno	ζ-caroteno	fitoeno	neurosporeno	isomero de licopeno <i>cis</i> -
02-1007-3	<i>t^v</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	0.0	0.0	30.6	14.6	13.6	4.1	2.9
02-1023-1*	<i>t^v</i>	<i>wt</i>	<i>ogc</i>	0.0	0.0	52.8	12.7	15.5	4.6	4.4
02-1025-1	<i>t^v</i>	<i>wt</i>	<i>ogc</i>	0.0	0.0	52.1	11.1	12.0	3.5	2.7
FG99-218*	<i>wt</i>	<i>dg</i>	<i>ogc</i>	132.7	21.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Carolina gold*	<i>t</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	0.0	0.0	24.6	5.1	7.1	2.3	2.0
FG03-310	<i>t^v</i>	<i>dg</i>	<i>ogc</i>	0.0	0.0	43.4	40.3	29.1	12.8	7.0
FG03-311	<i>t^v</i>	<i>dg</i>	<i>ogc</i>	0.0	0.0	29.6	35.1	29.1	8.0	4.2
FG03-301	<i>t</i>	<i>dg</i>	-	0.0	0.0	49.1	62.8	45.8	15.8	6.8
LSD 0.05				6.2	0.9	18.7	23.5	14.4	2.6	1.9
P-value				<0.0001	<0.0001	0.0038	0.0097	0.0060	<0.0001	0.0013

Comparación de la concentración de licopeno y β -caroteno de la selección FG03-308 y los padres* sugiere que los cruces entre *dg* y *Beta* altera la concentración del carotenoide

Line	Genotipo		$\mu\text{g/g}$ peso fresco	
	<i>Beta</i>	<i>dg</i>	licopeno	β -caroteno
97L97*	<i>Beta</i>	<i>wt</i>	0.0	42.3
FG99-218*	<i>ogc</i>	<i>dg</i>	132.7	21.7
FG03-308	<i>Beta</i>	<i>dg</i>	1.2	52.7
LSD 0.05			15.7	5.0
P-value			0.0011	0.0027

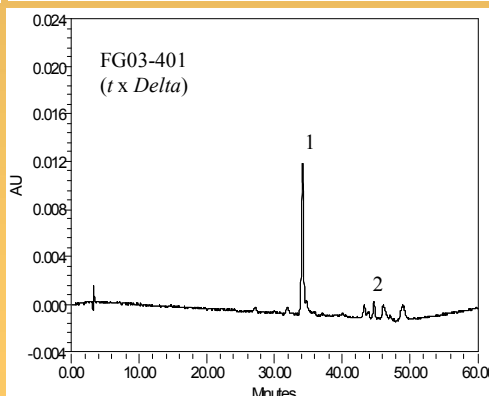
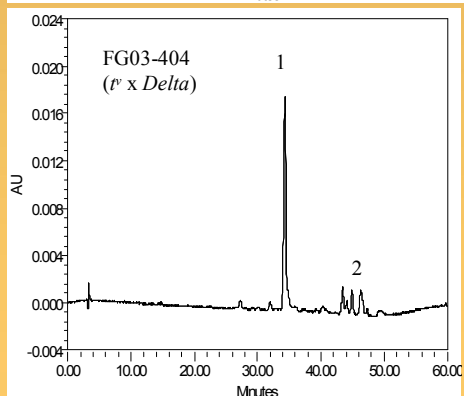
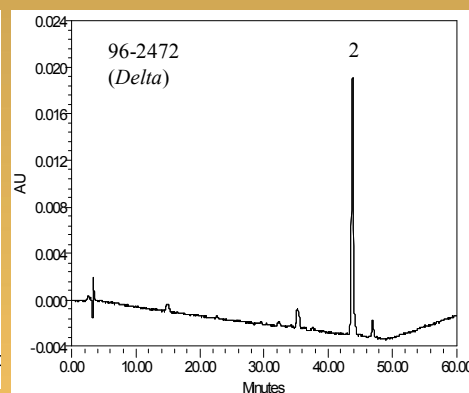
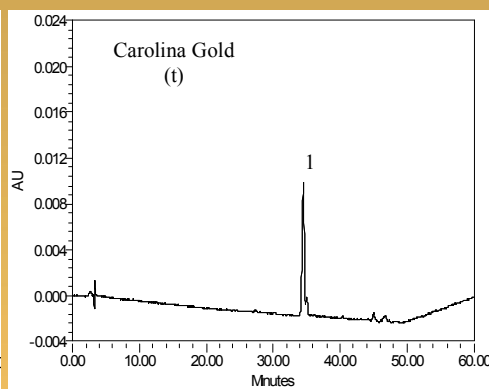
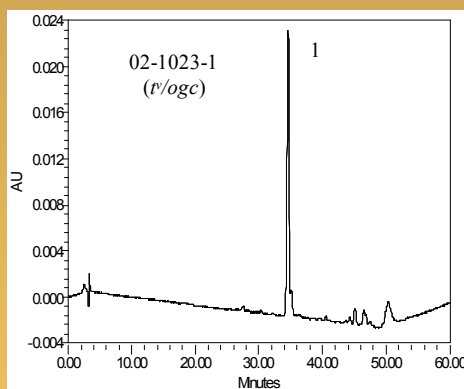
La comparación del contenido de carotenoides de la selección FG03-307 y los padres* sugiere que cuando *dg* es cruzado con *Delta*, la producción de δ -caroteno no es significativamente diferente del padre *Delta*.

Line	Genotipo			$\mu\text{g/g}$ peso fresco		
	<i>Delta</i>	<i>dg</i>	<i>ogc</i>	licopeno	β -caroteno	δ -caroteno
96-2472*	<i>Delta</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	15.2	0.0	43.5
FG99-218*	<i>wt</i>	<i>dg</i>	<i>ogc</i>	132.7	21.7	0.0
FG03-307	<i>Delta</i>	<i>dg</i>	-	5.1	0.0	45.8
LSD 0.05				20.8	2.3	11.0
P-value				0.0023	0.0009	0.0049

Conclusiones

- Cruces con genes que afectan la cantidad de cromoplastos (*dg*) aumenta los niveles de carotenoides
- Cuando *dg* es combinado con genes que afectan la conversión de tetra-*cis* licopeno (*t* and *tv*) a licopeno, ambos contenidos de tetra-*cis* licopeno y ζ -caroteno son alterados

Objetivo 2: Determinar la importancia de la estructura isomérica en las reacciones de ciclización en la biosíntesis de carotenoides.



La comparación de la concentración de carotenoides de las selecciones FG03-401 y FG03-404 con sus padres* sugiere que ciclización del tetra-*cis* licopeno es ineficiente.

Genotipo				µg/g peso fresco						
Line/Varietie	<i>t</i>	<i>Delta</i>	<i>ogc</i>	licopeno	δ-caroteno	tetra- <i>cis</i> licopeno	ζ-caroteno	fitoeno	neurosporeno	isomero de licope no <i>cis</i> -
02-1007-3	<i>t^v</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	0.0	0.0	30.6	14.6	13.6	4.1	2.9
02-1023-1*	<i>t^v</i>	<i>wt</i>	<i>ogc</i>	0.0	0.0	52.8	12.7	15.5	4.6	4.4
02-1025-1	<i>t^v</i>	<i>wt</i>	<i>ogc</i>	0.0	0.0	52.1	11.1	12.0	3.5	2.7
Carolina gold*	<i>t</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	0.0	0.0	24.6	5.8	7.1	2.3	2.0
96-2472*	<i>wt</i>	<i>Delta</i>	<i>wt</i>	15.2	43.5	0.0	0.0	3.1	0.0	0.0
FG03-401	<i>t</i>	<i>Delta</i>	<i>wt</i>	0.0	11.9	34.6	5.0	15.4	4.9	4.5
FG03-404	<i>t^v</i>	<i>Delta</i>	-	0.0	5.2	46.6	5.4	20.7	5.1	9.2
LSD 0.05				2.8	9.3	10.1	5.7	4.8	6.4	5.8
P-value				<0.0001	0.0002	0.0001	0.0067	0.0013	0.5142	0.1090

Conclusiones

- La combinación del gen *Delta* con genes que afectan la isimerización de los carotenoides (*t* and *tv*) sugiere que la licopeno ϵ -ciclase no usa eficientemente tetra-*cis* licopeno como substrato para convertirlo en δ -caroteno

Agradecimientos

- CEDAF and IDIAF
- Comite de acesores
Dr. Francis
Dr. Schwartz
Dr. Kleinhenz
- Mustafa Ozgen
- Marjory Renita
- Bert Bishop, OSU/OARDC
- Dr. Hansen, international programs in agriculture, OSU

Personal del lab del Dr.
Francis:

- Wencai Yang
- Audrey Darrigues
- Alba McIntyre
- Troy Aldrich
- Aparna Gazula
- Joyce Pennycooke



Gracias