

BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES: CONSIDERACIONES GENERALES

M. Águila Ruiz-Sola y Manuel Rodríguez-Concepción



INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos (incluidas las plantas) y algunas bacterias y hongos no fotosintéticos. Con algunas pocas excepciones (Moran y Jarvik, 2010), los animales no pueden sintetizarlos sino que los obtienen a través de la dieta. Los carotenoides desempeñan numerosas y diversas funciones en el mundo vegetal dentro del metabolismo primario y secundario de las plantas. La síntesis de carotenoides en las plantas es ubicua y ocurre en todos los tipos de plastos.

Entre sus funciones, los carotenoides son pigmentos que proporcionan color entre el amarillo y el rojo a flores, frutos y semillas de numerosas especies vegetales, y actúan como señales visibles para los animales que contribuyen a la polinización o la dispersión de las semillas. En estos órganos, los carotenoides se acumulan en plastos especializados en su almacenamiento elevado que se denominan cromoplastos

(Deruère *et al.*, 1994; Simkin *et al.*, 2007). En los cloroplastos de los tejidos verdes (fotosintéticos), la biosíntesis de carotenoides también es elevada pero, a diferencia de los anteriores, el perfil de carotenoides no varía entre distintas especies vegetales sino que se mantiene constante (45% de luteína, 25-30% de β -caroteno y 10-15% de las β,β -xantofilas violaxantina y neoxantina) (Britton, 1993), con escasas excepciones. En los cloroplastos, los carotenoides se asocian con las clorofilas y las proteínas que forman los complejos fotosintéticos en las membranas tilacoidales, donde colaboran en la captación de luz y desempeñan un papel fundamental en la fotoprotección contra el exceso lumínico (Demmig-Adams, Gilmore y Adams, 1996). Como consecuencia de la gran acumulación de clorofilas en las hojas, los colores de los carotenoides sólo se hacen visibles cuando éstas se degradan y resultan en los colores otoñales característicos de muchos bosques de las áreas templadas del planeta. Aunque en niveles mucho más reducidos, los carotenoides también se producen en los etioplastos de las plántulas germinadas y crecidas en la oscuridad, donde facilitan la transición al desarrollo fotosintético una vez que emergen a la luz (Park *et al.*, 2002; Rodríguez-Villalón, Gas y Rodríguez-Concepción, 2009). La síntesis de carotenoides también tiene lugar en leucoplastos, como los que se encuentran en las raíces. En la mayoría de las especies vegetales, la presencia de carotenoides es tan baja que las raíces permanecen incoloras al ojo humano (Howitt y Pogson, 2006). Sin embargo, algunas especies vegetales, como la zanahoria y la yuca, presentan variedades que acumulan grandes cantidades de carotenoides en cromoplastos que se diferencian en estos órganos. En todos los tipos de plastos, los carotenoides son precursores de importantes hormonas, como el ácido abscísico (ABA) y las estrigolactonas (SL), responsables de la regulación de numerosos aspectos del desarrollo vegetal y de la interacción

de las plantas con su medio (Nambara y Marion-Poll, 2005; Ruyter-Spira *et al.*, 2013).

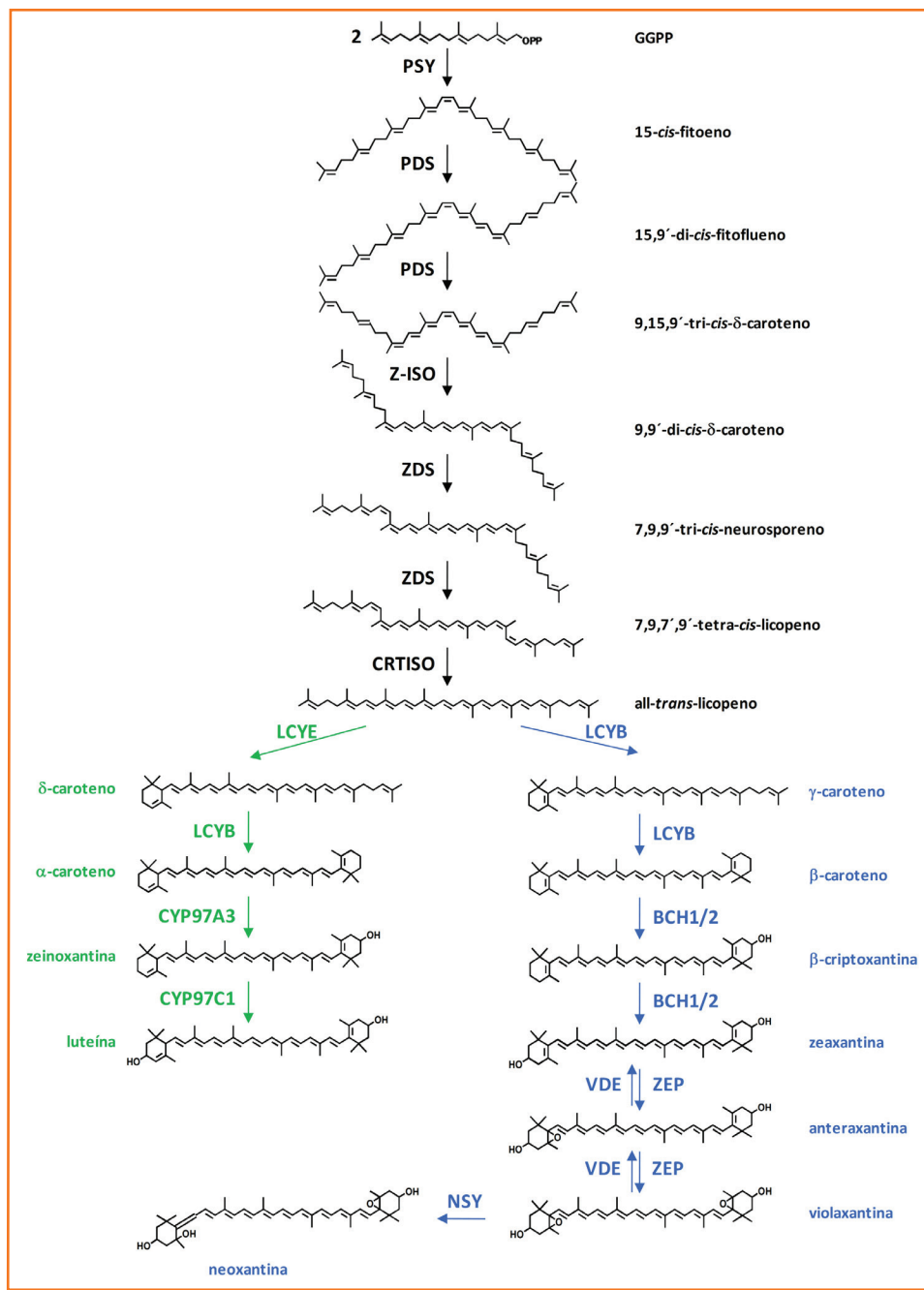
BIOSÍNTESIS

Los carotenoides son isoprenoides plastídicos derivados del geranylgeranyl difosfato (GGPP). En los plastos vegetales, el GGPP se produce fundamentalmente en la ruta del metileritritol 4-fosfato o vía del MEP (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). En este capítulo nos centramos en detallar las etapas biosintéticas de la ruta general de carotenoides en sí, es decir, a partir del GGPP. Algunas variantes y ramificaciones de esta vía troncal se tratarán en otros capítulos de este volumen.

Del GGPP al fitoeno: fitoeno sintasa.

El primer paso en la biosíntesis de carotenoides es la producción de la molécula de 40C fitoeno a partir de la condensación de dos moléculas de GGPP, reacción catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY) (figura 1). PSY es la enzima probablemente más estudiada de toda la ruta. Cataliza una reacción de dos pasos: la condensación cabeza-cabeza de dos moléculas de GGPP para formar el intermediario de reacción pre-fitoeno difosfato, seguida de la eliminación del grupo fosfato mediante un reordenamiento complejo vía la neutralización de un carbocatión para formar el fitoeno (7,8,11,12,7',8',11',12'-octahidro- Ψ,Ψ -caroteno) (Dogbo *et al.*, 1988). Las enzimas PSY de plantas utilizan normalmente *trans*-GGPP como sustrato para generar 15-*cis*-fitoeno.

En numerosas especies la actividad PSY está codificada por pequeñas familias génicas, como es el caso del tomate, el maíz, el arroz y la zanahoria entre otras (Giorio, Stigliani y



D'Ambrosio, 2008; Fantini *et al.*, 2013; Welsch *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008a, Li, Vallabhaneni y Wurtzel, 2008; Rodríguez-Concepción y Stange, 2013). Por el contrario, la planta modelo *Arabidopsis thaliana* sólo presenta un único gen codificante para PSY (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). En los casos donde existen varias isoformas, se ha observado una especialización funcional entre ellas. Algunas están involucradas en la producción de carotenoides en tejido fotosintético rico en cloroplastos mientras que otras participan en la síntesis de estos compuestos en tejidos no fotosintéticos del fruto (PSY1 de tomate), el endospermo de la semilla (PSY1 de maíz) o la raíz (PSY3 de tomate, maíz y arroz). Además de esta expresión diferencial, fenómenos de *splicing* alternativo, así como variaciones alélicas sobre algunas isoformas de PSY en trigo, cebada, maíz y yuca constituyen mecanismos responsables de la síntesis de carotenoides, característica acentuada de algunas variedades de estas especies (Howitt *et al.*, 2009; Rodríguez-Suárez, Atiensa y Pistón, 2011; Shumskaya *et al.*, 2012;

FIGURA 1. Biosíntesis de carotenoides en *Arabidopsis*. Los nombres de enzimas e intermediarios de la rama β,ε están señalados en verde y los de la rama β,β en azul. GGPP, geranylgeranyl difosfato; PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; Z-ISO, 15-*cis*-δ-caroteno isomerasa; ZDS, ζ-caroteno desaturasa; CRTISO, carotenoide isomerasa; LCYB, licopeno β-ciclasa; LCYE, licopeno ε-ciclasa; BCH1/2, β-caroteno hidroxilasa 1/2; VDE, violaxantina de-epoxidasa; ZEP, zeaxantina epoxidasa; NSY, neoxantina sintasa.

Welsch *et al.*, 2010). En *Arabidopsis*, el único gen que codifica para PSY presenta una expresión ubicua incluyendo tejido fotosintético y no fotosintético (Welsch *et al.*, 2003; Ruiz-Sola *et al.*, 2014) y se coexpresa con la mayoría de los genes de la ruta carotenogénica y de la vía del MEP y el metabolismo fotosintético (Meier *et al.*, 2011).

La actividad PSY se encuentra asociada con membranas en todos los tipos de plastos, como por ejemplo en amiloplastos de maíz (Li *et al.*, 2008b). En un estudio detallado sobre *Sinapis alba*, se estimaron los niveles de proteína y actividad PSY en distintas fracciones plastídicas (membrana externa, estroma y pellet membranoso que incluía los tilacoides) de plántulas en desetiología, donde la producción de carotenoides está activada (Welsch *et al.*, 2000). En este estudio se detectó la proteína PSY en estroma y pellet membranoso mientras que la actividad PSY sólo se detectó en esta última fracción, siendo mucho más alta en cloroplastos que en etioplastos, lo que confirma que la asociación con membranas es esencial para la actividad de esta enzima (Welsch *et al.*, 2000). Shumskaya *et al.* (2012) han demostrado recientemente que las proteínas de *Arabidopsis*, arroz y maíz (excepto la isoforma PSY1 de maíz) se localizan en plastoglóbulos, estructuras lipoproteicas que se asocian con los tilacoides y que participan en la biosíntesis y el almacenaje de isoprenoides, entre ellos los carotenoides y otros lípidos (Bréhélin, Kessler y Van Wijk, 2007; Austin *et al.*, 2006). En otros trabajos se ha demostrado que PSY se encuentra integrada en un complejo multiproteico de unos 200 kDa que alberga otras enzimas para la síntesis de GGPP en el cromoplasto de pimiento y tomate (Camara, 1993; Fraser, Schuch y Bramley, 2000). La función de este complejo asociado con membrana podría ser la de canalizar los precursores isoprenoides producidos por la vía del MEP en el estroma hacia la biosíntesis de carotenoides en las membranas plastídicas.

Del fitoeno al licopeno: desaturasas e isomerasas

En los siguientes pasos de la ruta biosintética el isómero 15-*cis*-fitoeno se transforma en *trans*-licopeno mediante una serie de cuatro desaturaciones y dos isomerizaciones. Estas reacciones van aumentando el número de dobles enlaces conjugados de la cadena hidrocarbonada que se traduce en un cambio de la absorción de luz hacia longitudes de onda mayores y, por lo tanto, en la aparición del color rojo característico del licopeno. Para la desaturación del fitoeno se han descrito dos tipos de enzimas desaturasas totalmente diferentes. En bacterias (excepto cianobacterias) y hongos, una sola enzima CrtI cataliza el proceso completo de desaturación (Sandmann, 2009). Sin embargo, en plantas y cianobacterias, las cuatro desaturaciones se realizan en dos pasos catalizados por dos enzimas filogenéticamente relacionadas: la fitoeno desaturasa (PDS) que reduce el fitoeno a ζ -caroteno pasando por el intermediario fitoflueno y la enzima ζ -caroteno desaturasa (ZDS) que produce *cis*-licopeno vía neurosporeno (figura 1). Cada una de estas desaturasas están codificadas por un único gen en *Arabidopsis* y en la mayoría de plantas (Dong *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2007; Chaudhary *et al.*, 2010); al igual que PSY, son activas en asociación con membranas. En *Arabidopsis* se han identificado en la membrana externa del cloroplasto, si bien PDS se ha detectado también en fracciones tilacoides y ZDS en el estroma (Joyard *et al.*, 2009; Mann *et al.*, 2000; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Formas inactivas de PDS también se han encontrado asociadas con chaperonas moleculares en fracciones solubles de diferentes tipos de plastos (Al-Babili *et al.*, 1996; Bonk *et al.*, 1997), lo que sugiere que la formación de estos complejos es necesaria para anclarla a las membranas plastídicas y por lo tanto para su actividad. La PDS se ha encontrado asociada con un gran

complejo molecular de unos 350 KDa, lo que es consistente con la existencia de un hipotético complejo multienzimático asociado con membrana que contiene las enzimas PDS, ZDS y otras necesarias para la formación de carotenoides cíclicos a partir de fitoeno (López *et al.*, 2008).

Además de la asociación con membranas, estas desaturasas necesitan diferentes cofactores para ejercer su actividad en el plasto. Entre ellos, las plastoquinonas se han descrito como las moléculas responsables de aceptar los electrones generados durante las reacciones de oxidación catalizadas por las enzimas PDS y ZDS (Norris, Barrette y DellaPenna, 1995). La reoxidación de estas quinonas está controlada por la enzima oxidasa plastídica terminal PTOX, que utiliza el oxígeno como aceptor final de electrones con la consecuente formación de agua (Carol y Kuntz, 2001). La falta de función PTOX en el mutante de tomate ghost genera defectos en la acumulación de carotenoides en hojas (cloroplastos) y frutos (cromoplastos), lo que indica la importancia de PTOX en la desaturación del fitoeno en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos. Sin embargo, estudios más recientes demuestran que la actividad PTOX no es indispensable en tejido verde y por lo tanto deben existir otros mecanismos independientes de PTOX responsables de la reoxidación del plastoquinol (Shahbazi *et al.*, 2007). Entre ellos, el complejo NADH deshidrogenasa también puede catalizar esta oxidación (Endo *et al.*, 2008; Nashlevitz *et al.*, 2010).

Si bien la enzima bacteriana CrtI es capaz de catalizar la conversión de 15-*cis*-fitoeno en *trans*-licopeno, en las plantas son necesarias dos actividades isomerasas extra para conseguir el mismo resultado. Como se observa en la figura 1, la actividad PDS produce el isómero 9,15,9'-*tri-cis*- ζ -caroteno pero el sustrato de la ZDS presenta una configuración del doble enlace 15-*trans*. La enzima responsable de esta

conversión se denomina 15-*cis*- δ -caroteno isomerasa (Z-ISO), una proteína de membrana cuya actividad se requiere incluso en presencia de luz (Chen, Li y Wurtzel, 2010). Por otro lado, la enzima responsable de la isomerización del producto de ZDS (7,9,7',9'-*tetra-cis*- ζ -licopeno o pro-licopeno) al *trans*-licopeno se denomina carotenoide isomerasa (CRTISO) (Isacson *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002). Esta actividad también necesita la presencia de membranas y, de hecho, se ha identificado en la membrana externa del cloroplasto en *Arabidopsis* (Joyard *et al.*, 2009). También requiere un cofactor de flavina adenina (FAD) aunque la reacción no parece implicar cambios redox (Yu *et al.*, 2011).

Del licopeno a los carotenoides cíclicos: ciclasas

El primer punto de ramificación de la ruta de biosíntesis de carotenoides consiste en la ciclación de uno o ambos extremos de la cadena de C40 del todo-*trans*-licopeno. Una rama da lugar a carotenoides con dos anillos β (β -caroteno y sus xantofilas derivadas zeaxantina, violaxantina y neoxantina) mientras que en la otra se producen carotenoides con un anillo β y otro ϵ (α -caroteno y la xantofila luteína) (figura 42). La producción de carotenoides con dos anillos ϵ no es común en plantas con la excepción de la lactucaxantina, una ϵ,ϵ -xantofila que se acumula en la lechuga (Phillip y Young, 1995). Los anillos β y ϵ se diferencian únicamente en la posición del doble enlace. En el anillo β el doble enlace está conjugado con la cadena de polieno lo que resulta en una estructura rígida y una sola conformación posible. En el anillo ϵ por el contrario, el doble enlace no está conjugado y permite cierta rotación del anillo (figura 2). Mientras que los anillos β se encuentran en todos los organismos capaces de sintetizar carotenoides, la distribución de los anillos ϵ está mucho más restringida

a plantas, algas y cianobacterias, lo que sugiere que su formación ha evolucionado de forma independiente en estos organismos (Kim y DellaPenna, 2006).

Las plantas presentan dos enzimas licopeno ciclasa diferentes que catalizan la producción de los anillos terminales β y ϵ , la β ciclasa (LCYB/CRTL-B) (Pecker *et al.*, 1996) y la ϵ -ciclasa (LCYE/CRTL-E) (Cunningham y Gantt, 2001) respectivamente. Al igual que CRTISO, estas enzimas necesitan un cofactor de flavina adenina (FAD) aunque la reacción no parece requerir cambios redox (Mialoundama *et al.*, 2010; Chen, Li y Wurtzel, 2010). En la mayoría de las plantas, la actividad LCYE viene codificada normalmente por un solo gen mientras que LCYB se codifica por un solo gen en algunas plantas, incluidas *Arabidopsis*, arroz y maíz o por pequeñas familias génicas en otras (Cunningham *et al.*, 1996). Por ejemplo, en tomate se distinguen dos isoformas LCYB, mientras que la isoforma LCYB1 es activa en tejido verde, LCYB2 sólo funciona en tejido rico en cromoplastos como el fruto (Ronen *et al.*, 2000).

En *Arabidopsis*, la actividad LCYB cataliza una reacción en dos pasos que introduce un anillo β en cada extremo de la molécula de licopeno (Ψ , Ψ -caroteno) para producir β -caroteno (β , β -caroteno) vía γ -caroteno (Ψ , β -caroteno). En la otra rama de la ruta, LCYE añade sólo un anillo ϵ en un extremo de la molécula de licopeno formando δ -caroteno (Ψ , ϵ -caroteno) y a continuación δ -caroteno se transforma en α -caroteno (β , ϵ -caroteno) mediante la actividad LCYB (figura 3). A diferencia de la proteína de *Arabidopsis*, la actividad LCYE de lechuga es capaz de crear dos anillos ϵ dando lugar al ϵ -caroteno (ϵ , ϵ -caroteno), el precursor de la lactucaxantina (figura 4). De la misma manera, cuando no hay actividad LCYB, la enzima de maíz LCYE es capaz de catalizar la síntesis de ϵ -caroteno a partir de licopeno (Bai *et al.*, 2009). En las plantas parece

que la proporción de β , β -carotenoides y β , ϵ -carotenoides depende de la cantidad relativa y la actividad de las enzimas LCYB y LCYE (Ronen *et al.*, 1999; Bai *et al.*, 2009). Se ha postulado la existencia de complejos con LCYB sola o con ambas actividades LCYB y LCYE para justificar la ausencia de ϵ , ϵ -carotenoides en la mayoría de las plantas (Cunningham y Gantt, 1998; Bai *et al.*, 2009). Aunque aún no hay evidencias experimentales de la existencia de estos complejos, en *Arabidopsis*, la proteína LCYB se ha encontrado en la membrana externa del cloroplasto donde también se localizan las enzimas anteriores y posteriores en la ruta (Joyard *et al.*, 2009).

De los carotenos a las xantofilas: hidroxilasas, epoxidadas y más

Los carotenos cíclicos pueden modificarse posteriormente mediante reacciones de hidroxilación para generar las xantofilas, el nombre genérico que reciben los derivados oxigenados de los carotenos. La hidroxilación en las posiciones C-3 y C-3' de cada anillo de las moléculas de α -caroteno y β -caroteno da origen a las xantofilas luteína y zeaxantina respectivamente. Consecutivas epoxidaciones en las posiciones C-5,6 y C-5'6' de los anillos 3-hidroxi β de la zeaxantina producen la violaxantina vía el intermediario monoepoxidado anteraxantina. La violaxantina puede ser de-epoxidada para volver a la zeaxantina, lo que se conoce como el ciclo de las xantofilas, o por el contrario sufrir una abertura de uno de los epóxidos cíclicos y formar neoxantina (figura 3).

Las enzimas encargadas de los primeros pasos oxidativos reciben el nombre de hidroxilasas. Se han encontrado dos tipos diferentes en plantas: las enzimas no-hemo di-hierro (BCH) que catalizan la hidroxilación de los anillos β y las enzimas

citocromo P450 (CYP97) que catalizan fundamentalmente la hidroxilación de ambos anillos β y ϵ . La especificidad y grado de solapamiento funcional de estas enzimas se ha estudiado ampliamente en *Arabidopsis*. Al menos existen cuatro genes codificantes para estas actividades en esta planta modelo: BCH1/CHYB1/CHY1 (Sun, Gantt y Cunningham, 1996), BCH2/CHYB2/CHY2 (Tian y DellaPenna, 2001), CYP97A3/LUT5 (Kim y DellaPenna, 2006) y CYP97C1/CHYE/LUT1 (Tian *et al.*, 2004). Las enzimas BCH son más activas hacia la hidroxilación de los anillos β del β -caroteno (aunque también pueden actuar sobre el del α -caroteno) y presentan una actividad muy reducida hacia los anillos ϵ . Las CYP97, por el contrario, prefieren el α -caroteno como sustrato. CYP97A3 es más activa hacia los anillos β que hacia los ϵ del α -caroteno mientras que CYP97C1 puede hidroxilar de manera eficiente ambos tipos de anillos (Kim *et al.*, 2009; 2010). Además de esta especialización funcional, las enzimas BCH están codificadas por pequeñas familias génicas en la mayoría de las especies vegetales. Las isoformas BCH muestran normalmente patrones de expresión específicos y en plantas ricas en xantofilas al menos un parólogo se expresa con preferencia en los tejidos cromoplastídicos donde estos compuestos se acumulan (Bouvier *et al.*, 1998; Du *et al.*, 2010).

En *Arabidopsis*, todas las enzimas CYP97 involucradas en la hidroxilación de carotenoides se han identificado en las membranas externas del cloroplasto (Joyard *et al.*, 2009); sin embargo, no se conoce la localización de las proteínas BCH aunque la presencia de cuatro hélices transmembrana en su secuencia proteica sugiere que podrían encontrarse en las membranas externas o tilacoidales (Cunningham y Gantt, 1998). Recientemente se ha descrito la interacción entre las enzimas CYP97A y CYP97C en maíz, para convertir de forma sinérgica α -caroteno en luteína (Quinlan *et al.*, 2012).

AL bajar en la ruta, en el ciclo de las xantofilas están involucradas las enzimas zeaxantina epoxidasa (ZEP) que controla una reacción en dos pasos para producir violaxantina y la violaxantina de-epoxidasa (VDE) que la convierte de vuelta en zeaxantina (figura 3) (Demmig-Adams, Gilmore y Adams, 1996; Cunningham y Gantt, 1998). Según se han descrito, en *Arabidopsis* estas dos actividades funcionan separadas por la membrana tilacoidal. En concordancia, la enzima ZEP se ha identificado en las membranas tilacoidales y externas del cloroplasto mientras que la enzima VDE sólo se ha encontrado en los tilacoides (Joyard *et al.*, 2009). Por último, la violaxantina se convierte en neoxantina mediante la acción de la neoxantina sintasa (NSY) (figura 3) (North *et al.*, 2007) que al igual que las anteriores se ha identificado en las membranas externas del cloroplasto (Joyard *et al.*, 2009). En un trabajo reciente se ha identificado otro gen que es absolutamente necesario para la síntesis de neoxantina en *Arabidopsis* y tomate, aunque su función específica no está aún determinada (Neuman *et al.*, 2014).

Apocarotenoides y otros derivados formados por rotura oxidativa

Mediante rotura oxidativa de carotenoides pueden obtenerse apocarotenoides (que también son carotenoides, aunque con menos de 40 átomos de carbono, como ya se ha indicado en el capítulo 1) y otros derivados. Estos compuestos pueden actuar como hormonas, pigmentos, aromas y sabores, compuestos de defensa y moléculas señalizadoras. Su síntesis está principalmente controlada por una familia de enzimas oxidativas que cortan específicamente dobles enlaces y tienen en común el requerimiento de un cofactor de hierro no hemo (Kloer y Schulz, 2006). En las plantas estas enzimas actúan como dioxigenasas y por lo tanto reciben el nombre en inglés de *carotenoid cleavage dioxygenases* (CCD).

Las hormonas ácido abscísico ABA y SL son quizá los derivados resultantes de la rotura oxidativa de carotenoides vegetales más estudiados. El ABA se produce a partir de las xantofilas violaxantina y neoxantina. Las enzimas encargadas de esta reacción se denominan *cis*-epoxicarotenoide dioxigenasas (NCED), las cuales son capaces de romper los isómeros *cis* de la violaxantina y la neoxantina. Hasta el momento, se desconocen las enzimas encargadas de la isomerización de estas xantofilas para generar los sustratos con configuración *cis* de las enzimas NCED. Los genomas vegetales contienen familias génicas codificantes para estas proteínas. En *Arabidopsis*, se ha descrito una familia de nueve miembros de los cuales cinco (NCED2, 3, 5, 6 y 9) parecen estar relacionados con la biosíntesis de ABA (Schwartz, Qin y Zeevaart, 2003; Iuchi *et al.*, 2001). Entre ellas, NCED3 juega un papel esencial en la biosíntesis de la hormona bajo condiciones de estrés abiótico (Jia, 2002; Nambara y Marion-Poll, 2005). La síntesis de las SL ocurre a partir del isómero 9-*cis*- β -caroteno por la acción de las dioxigenasas CCD7 y CCD8 y otros pasos de isomerización, oxidación y reordenamiento todavía por determinar (Alder *et al.*, 2012; Ruyter-Spira *et al.*, 2013).

Recientemente, la investigación en *Arabidopsis* está permitiendo descubrir otras moléculas derivadas de la rotura oxidativa de los carotenoides con funciones de señalización muy importantes. Se ha demostrado que la falta de función del gen BYPASS1 genera una señal en la raíz que se transmite al tejido aéreo provocando graves defectos en el desarrollo de la raíz y la parte aérea (Van Norman, Frederick y Sieburth, 2004). Aunque la identidad de esta señal no se ha determinado, se ha demostrado que tiene origen carotenoide y que su producción requiere la síntesis de β -caroteno y sus derivados, pero no está relacionada con las hormonas ABA ni SL (Van Norman y Sieburth, 2007). El β -ciclocitral, un derivado también del

β -caroteno, es capaz de inducir cambios en la expresión de genes nucleares bajo situaciones de estrés oxidativo (Ramel *et al.*, 2012). Otros derivados de carotenoides aún por identificar se han descrito como esenciales para la formación de raíces laterales en *Arabidopsis* (Van Norman *et al.*, 2014).

La síntesis de otros derivados de carotenoides, como el pigmento amarillo microrradicina y la blumenina, con propiedades antifúngicas que secretan las raíces de numerosas plantas, el aroma β -ionona que favorece la atracción de animales polinizadores y los apocarotenoides colorantes bixina y crocina de las especias annatto y azafrán también está controlada por enzimas de la familia CCD y ampliamente revisada en (Walter y Strack, 2011).

REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE LOS CAROTENOIDES

En las plantas existen múltiples niveles de regulación de la síntesis de carotenoides, desde el control de la expresión de los genes que codifican enzimas biosintéticas hasta la regulación de la actividad de dichas enzimas, la capacidad de los plastos para almacenar carotenoides, o la presencia de procesos de degradación de estos metabolitos. En esta sección revisaremos brevemente algunos ejemplos ilustrativos de estos distintos niveles de regulación.

Control de la expresión génica

La expresión de los genes codificantes para enzimas implicadas en la biosíntesis de carotenoides responde en gran medida al estado de desarrollo de las plantas, que a su vez establece un estrecho vínculo con las condiciones

ambientales a las que se ven sometidas. Uno de los mejores ejemplos de este tipo de regulación y de la dificultad de separar los distintos factores que regulan la carotenogénesis es la maduración del fruto de tomate. Durante la maduración del fruto, la acumulación de carotenoides está determinada por un programa de desarrollo que controla la expresión de los genes responsables de la síntesis de estos compuestos, pero también de la diferenciación plastídica (y, por lo tanto, la actividad de las enzimas y la capacidad de almacenamiento). Además, este programa se puede alterar en función de estímulos ambientales como la luz y la temperatura (Alba, Cordonnier-Pratt y Pratt, 2000; Neta-Sharir *et al.*, 2005). En este apartado nos centraremos en revisar el control transcripcional de la carotenogénesis en tomate y en otros sistemas en respuesta a señales de desarrollo y estímulos ambientales.

Señales de desarrollo

La maduración del fruto de tomate implica la degradación de las clorofilas en el fruto verde a la vez que una acumulación masiva de carotenoides (sobre todo licopeno) que lo tornan de color rojo. Este proceso está asociado con la diferenciación de cloroplastos a cromoplastos (Giovannoni, 2001). El aumento desmesurado de carotenoides está precedido por una acumulación de transcritos codificantes para la isoforma de fruto PSY1 (Lois *et al.*, 2000; Fraser *et al.*, 1994). A esta inducción le sigue inmediatamente después un aumento de la expresión de los genes que codifican las enzimas desaturasas e isomerasas y una fuerte represión de la expresión de las ciclasas, lo que en conjunto resulta en una acumulación de licopeno en el fruto maduro (Ronen *et al.*, 1999). Los mecanismos que controlan esta compleja regulación génica son objeto de una activa investigación. Recientemente se ha descubierto que el factor de transcripción RIN (inhibidor de la maduración, del inglés *Ripening INhibitor*) de la familia de

factores de transcripción MADS-box es capaz de regular la carotenogénesis mediante la unión directa del promotor de PSY1 y otros genes de la ruta en el fruto. Además, RIN también controla la expresión de genes involucrados en otros procesos asociados con la maduración, como la producción de etileno y la degradación de clorofilas (Fujisawa *et al.*, 2013; Martel *et al.*, 2011). En otro trabajo se ha demostrado la interacción entre RIN y otro factor de la familia, MADS1, que también tiene un papel importante en la maduración del fruto como modulador represivo (Dong *et al.*, 2013). La regulación transcripcional de la carotenogénesis a lo largo de la maduración del fruto también se ha observado en otras especies como el pimiento y el naranjo (Hugueney *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 2004; Rodrigo, Marcos y Zacarías, 2004).

En *Arabidopsis*, el conocimiento de la importancia de las señales de desarrollo en el control de la carotenogénesis es muy limitado. Sin embargo, a partir de información publicada en bases de datos de expresión génica se ha establecido una correlación entre los niveles de expresión de los genes biosintéticos con el perfil de carotenoides observados en diversos órganos y estadios de desarrollo de esta planta (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012).

Señales ambientales

La biosíntesis de carotenoides está controlada por factores ambientales, entre los cuales la luz constituye uno de los más importantes. Tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos la luz es esencial en el ajuste del reloj circadiano de las plantas, un mecanismo que permite anticipar los cambios asociados con los periodos de luz y oscuridad (Millar, 2004). En *Arabidopsis*, muchos de los genes de la síntesis de carotenoides y de la vía del MEP muestran una oscilación diurna y una posible regulación circadiana, lo que sugiere que

la producción de carotenoides podría estar también controlada por el reloj (Covington *et al.*, 2008).

Uno de los mejores ejemplos de regulación transcripcional de la biosíntesis de carotenoides mediado por luz ocurre durante la desetiología, momento en el cual las plántulas germinadas bajo tierra y en la oscuridad perciben la luz y activan su desarrollo fotomorfogénico. Este proceso trae consigo un aumento masivo en la producción de carotenoides para proteger el emergente aparato fotosintético (Park *et al.*, 2002; Rodríguez-Villalón, Gas y Rodríguez Concepción, 2009; Toledo-Ortiz, Huq y Rodríguez Concepción, 2010). En *Arabidopsis*, los cambios cuantitativos (niveles totales) y cualitativos (abundancia relativa) en el patrón de carotenoides durante la desetiología están asociados con una inducción de la mayoría de los genes que codifican enzimas biosintéticas, incluidas las del MEP (Ghassemian *et al.*, 2006; Meier *et al.*, 2011). Además, estos cambios son dependientes de la diferenciación de los etioplastos en cloroplastos, proceso mediado también por un efecto de la luz en la expresión génica. Para facilitar la transición al metabolismo fotosintético y minimizar el deterioro del aparato fotosintético durante la desetiología, la producción de carotenoides también se coordina con la producción de clorofilas y de complejos ricos en carotenoides en un proceso controlado por la familia de fotorreceptores fitocromo y los factores de transcripción tipo *basic-helix-loop-helix* (bHLH) de la familia *Phytochrome-Interacting Factors* (PIF). Los PIF se acumulan en la oscuridad y frenan el desarrollo del cloroplasto y la síntesis de clorofilas y carotenoides reprimiendo la expresión de muchos genes mediante la unión directa con su promotor (Castillon, Shen y Huq, 2007; Leivar y Quail, 2011). PIF1 es el principal responsable de la regulación de la carotenogénesis durante la desetiología. Se ha demostrado que es capaz de unirse a una caja G (CACGTG) del promotor

de PSY para reprimir directamente su expresión (Toledo-Ortiz, Huq y Rodríguez-Concepción, 2010). La degradación mediada por luz de los PIF des-reprime el desarrollo del cloroplasto y la expresión de PSY, y promueve por lo tanto la producción y acumulación de carotenoides de forma coordinada con la de las clorofilas y en conjunto la transición al metabolismo fotosintético. Además de en *Arabidopsis*, se ha encontrado que la expresión de las isoformas de PSY específicas de tejido fotosintético en maíz y arroz están también reguladas por la luz (Li, Tsfadia y Wurtzel, 2009; Welsch *et al.*, 2008) pero los mecanismos moleculares que controlan esta regulación no se han elucidado todavía.

Aparte de la luz, algunos estreses abióticos, como la sequía o el estrés salino son factores ambientales capaces de regular la biosíntesis de carotenoides. Para hacer frente al estrés abiótico, las plantas han desarrollado varias respuestas adaptativas entre las cuales las mediadas por la hormona ABA son las mejor caracterizadas. En particular, los estreses hídrico y salino desencadenan una síntesis y acumulación acentuada de la hormona que se produce a partir de la rotura oxidativa de las β,β -xantofilas (Nambara y Marion-Poll, 2005). Mientras que los tejidos fotosintéticos son ricos en carotenoides, la producción de carotenoides en órganos no fotosintéticos como la raíz es mucho menor (Howitt y Pogson, 2006) y por tanto el aporte de β,β -xantofilas para la síntesis de la hormona puede convertirse en un punto limitante. En las plantas de maíz y arroz se ha observado que los estreses salino e hídrico provocan una inducción en los niveles de transcritos del gen que codifica la isoforma específica de raíz PSY3, lo que facilita el aporte de precursores para la síntesis acentuada de ABA en la raíz (Li, Vallabhaneni y Wurtze, 2008; Welsch *et al.*, 2008). En *Arabidopsis*, el único gen codificante para PSY se regula diferencialmente en tejidos aéreos y raíz en situaciones de

estrés salino. El estrés desencadena una inducción específica de la expresión de PSY en la raíz que, en conjunto con la inducción de genes codificantes para otras enzimas de la rama β,β como BCH2 y ZEP, permiten la canalización del flujo acentuado de precursores hacia la síntesis de las β,β -xantofilas después del estrés (Ruiz-Sola *et al.*, 2014). En *Arabidopsis*, al igual que en maíz y arroz, la inducción de la expresión de PSY está retrorregulada por la hormona en un mecanismo independiente de PIF (Ruiz-Sola *et al.*, 2014a).

Otros niveles de regulación

Hay muchos casos en los que la expresión de los genes biosintéticos no es capaz de explicar la acumulación o el perfil de carotenoides. Esto pone en evidencia que la vía carotenogénica también está regulada por otros mecanismos. Entre ellos, en este apartado se revisará la modulación de niveles y actividades enzimáticas, la canalización de metabolitos a través de complejos multienzimáticos, la capacidad de secuestro y almacenamiento de carotenoides y la degradación de estos metabolitos.

Modulación de niveles y actividades enzimáticas

La luz es capaz de modificar el flujo metabólico de la ruta carotenogénica al actuar sobre la actividad de ciertas enzimas biosintéticas. En primer lugar, parte de las actividades isomerasas Z-ISO y CRTISO pueden sustituirse por la luz en tejidos fotosintéticos (Park *et al.*, 2002; Isaacson *et al.*, 2002). La luz también modifica la actividad de las enzimas moduladas por sistemas redox fotosintéticos. Entre ellos podemos destacar varias enzimas de la ruta del MEP que parecen ser dianas del sistema ferredoxina-tiorredoxina (Balmer *et al.*, 2003) y las desaturasas PDS y ZDS que usan la plastoquinona como aceptor de H, lo que las vincula con la cadena fotosintética de

transporte de electrones (Carol y Kuntz, 2001). Además, las actividades ZEP y VDE también están controladas por la luz y el estado fotosintético de la planta. Cuando se someten a altas intensidades lumínicas, las plantas ajustan la composición de carotenoides de las hojas para activar la fotoprotección y transforman la violaxantina en zeaxantina que disipa el exceso energético de una manera más eficiente. Cuando la intensidad de luz vuelve a niveles normales, la zeaxantina se transforma de nuevo en violaxantina lo que se conoce como el ciclo de las xantofilas (Hieber *et al.*, 2000). Este proceso está gobernado principalmente por un mecanismo mediado por los cambios de pH que la distinta intensidad lumínica induce en los tilacoides. Con bajas intensidades lumínicas o en la oscuridad, donde el pH del estroma tilacoidal es neutro, la enzima VDE permanece soluble en el estroma e inactiva. Pero si la intensidad de la luz aumenta, la bomba fotosintética de protones aumenta la acidez del lumen y estimula la unión de VDE a las membranas tilacoidales donde se activa resultando en un aumento de la producción de zeaxantina (Hieber, Bugos y Yamamoto, 2000).

Existen otros mecanismos capaces de aumentar las actividades enzimáticas que no están regulados por la luz. Por ejemplo, uno de los aspectos que más influye en la actividad de las enzimas de la carotenogénesis es su asociación con membranas. En los cloroplastos de *Arabidopsis* la mayoría de las enzimas biosintéticas se localizan en la membrana externa del cloroplasto mientras que sólo unas pocas se han detectado asociadas a los tilacoides (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012; Joyard *et al.*, 2009).

Canalización de metabolitos a través de complejos multienzimáticos

Se ha postulado ampliamente que las enzimas carotenogénicas podrían organizarse en complejos multienzimáticos asociados

a membranas (Cunningham y Gantt, 1998; Bai *et al.*, 2009), para constituir un mecanismo clave en la regulación de su actividad y de la biosíntesis de carotenoides. Aunque los estudios de proteómica informan acerca de la localización de enzimas individuales y no de complejos multienzimáticos (Joyard *et al.*, 2009), la identificación y caracterización bioquímica de alguno de estos complejos se ha demostrado experimentalmente (Camara, 1993; Fraser, Schuch y Bramley, 2000; López *et al.*, 2008; Quinlan *et al.*, 2012). Además de estos datos, otros estudios evidencian la canalización de metabolitos a lo largo de la ruta (Candau, Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1991; De la Guardia *et al.*, 1971). Por último, el análisis de algunos mutantes y los estudios de coexpresión génica sugieren la acción conjunta de algunas enzimas en ramas específicas de la ruta (Tian *et al.*, 2003, 2004; Kim y DellaPenna, 2006; Kim *et al.*, 2009; Meier *et al.*, 2011).

Al integrar todos estos datos se ha propuesto recientemente un modelo que postula la formación de varios complejos multienzimáticos en *Arabidopsis* (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Este modelo propone la existencia de complejos proteicos asociados a la membrana externa del cloroplasto que transforman los precursores universales de isoprenoides en fitoeno, el fitoeno en licopeno (formado por las enzimas PDS, Z-ISO, ZDS, CRTISO), el fitoeno en β -caroteno (PDS, Z-ISO, ZDS, CRTISO y LCYB) y el licopeno en luteína (LCYE, LCYB y CYP97A y CYP97C). Además, enzimas individuales ancladas a la membrana externa o tilacoidal transformarían el β -caroteno en las β , β -xantofilas. Este modelo de canalización de metabolitos explicaría por qué se detectan tan pocos intermediarios de la ruta. Sin embargo, no puede explicar por qué la acumulación de carotenoides en las membranas tilacoidales (donde actúan en contra del daño fotooxidativo) es mucho mayor que en la membrana

externa (donde se han identificado la mayoría de enzimas que los producen). Por otro lado, teniendo en cuenta que la composición de los carotenoides varía en función del tipo de plasto, los cuales muestran una composición proteica y estructuras subplastídicas bastante diferentes, se esperaría que la naturaleza y localización de los complejos multiproteicos hipotéticos variara según el tipo de plasto. De acuerdo con esta premisa, las enzimas ZDS, LCYB, BCH1 y BCH2 se encontraron formando parte del proteoma del plastoglobulo en cromoplastos de pimiento pero no en cloroplastos de *Arabidopsis* (Vidi *et al.*, 2006; Ytterberg, Peltier y Van Wijk, 2006).

Capacidad de secuestro y almacenaje

El tipo de plasto también tiene una influencia crucial en la acumulación de carotenoides. Existen numerosos ejemplos en la literatura donde la naturaleza, fisiología y número de plastos determinan la acumulación de estos compuestos. En *Arabidopsis*, por ejemplo, la desetiación implica la diferenciación de los etioplastos en cloroplastos, lo que tiene un gran impacto no sólo en el aumento de la actividad PSY y de otras enzimas de la ruta sino en la capacidad de almacenamiento de los plastos (Von Lintig *et al.*, 1997; Welsch *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2006). Por lo tanto, la mayor capacidad de acumulación de carotenoides que ofrecen los cloroplastos frente a los etioplastos justifica en parte la elevada acumulación de estos compuestos durante la desetiación. De hecho, un desarrollo alterado de los cloroplastos provoca una disminución de carotenoides incluso en condiciones donde la biosíntesis de sus precursores está activada (Sauret-Güeto *et al.*, 2006; Flores-Pérez *et al.*, 2008). La diferenciación de cloroplastos o cromoplastos en raíz de zanahoria en función de las condiciones de luz tiene también una enorme influencia en el perfil cuantitativo y cualitativo de carotenoides que se

acumulan, demostrándose la importancia del tipo de plasto en la acumulación final de estos compuestos (Fuentes *et al.*, 2012).

La diferenciación de los cloroplastos en cromoplastos implica el desarrollo de plastoglobulos o estructuras de secuestro de formas diferentes, lo que en conjunto permite la deposición de cantidades enormes de carotenoides dentro de una matriz de lipoproteínas. Este proceso es el que ocurre, por ejemplo, durante la maduración del fruto de tomate (Deruère *et al.*, 1994; Simkin *et al.*, 2007). La coliflor naranja (*Brassica oleracea* variedad *votrytis*) acumula muchos más carotenoides (β -caroteno principalmente) que las variedades incoloras sin presentar grandes cambios en la expresión de los genes biosintéticos (Li *et al.*, 2001). En esta variedad coloreada, los plastos presentan una estructura similar a la de los cromoplastos. Se ha descubierto que una mutación en el gen *Or* (que codifica una proteína plastídica tipo DnaJ) es responsable de la diferenciación de los cromoplastos (Paolillo, Garvin y Parthasarathy, 2004; Lu *et al.*, 2006). Con este ejemplo se ilustra cómo se puede estimular la biosíntesis de carotenoides activando el desarrollo de estructuras plastídicas de depósito para su almacenamiento. De manera similar, los frutos de los tomates mutantes *hp* (*high pigment*) acumulan también mayores cantidades de carotenoides totales sin presentar ningún cambio en la transcripción de los genes de la ruta biosintética. Estos tomates muestran un mayor número de plastos por célula, lo que parece justificar de nuevo los mayores niveles de carotenoides (Galpaz *et al.*, 2008; Kolotilin *et al.*, 2007).

De forma inversa, alteraciones en la producción de carotenoides pueden modular el desarrollo de los plastos. Así, algunos mutantes de *Arabidopsis* en los que la síntesis

de carotenoides está bloqueada presentan defectos en el desarrollo de los cloroplastos (Dong *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que un aumento del flujo de la vía de síntesis de carotenoides mediante la sobreexpresión de PSY es suficiente para activar la diferenciación de cromoplastos a partir de leucoplastos de raíz y callos en *Arabidopsis* (Maass *et al.*, 2009) y de cloroplastos en fruto de tomate (Fraser *et al.*, 2007).

Degradación de carotenoides

El balance entre biosíntesis y degradación determina en muchos casos los niveles finales de carotenoides. En los tejidos fotosintéticos, los carotenoides pueden degradarse mediante procesos fotoquímicos no enzimáticos. Sin embargo, también existen enzimas capaces de catalizar reacciones de rotura oxidativa de carotenoides. Entre ellas, en las plantas, la familia de enzimas dioxigenasas CCD se encargan de la degradación específica de carotenoides en numerosos tejidos (Walter y Strack, 2011). La contribución de las CCD a la homeostasis de carotenoides es un tema en continua evaluación. Existen casos donde los niveles de transcritos codificantes para estas enzimas son inversamente proporcionales al contenido de carotenoides. Se ha observado por ejemplo una correlación entre el nivel de expresión del gen codificante para la isoforma CCD1 y la degradación de carotenoides (luteína) durante la maduración del fruto de fresa (García-Limones *et al.*, 2008) y la acumulación de carotenoides también parece estar controlada por estas enzimas en las flores de crisantemo y orquídea (Ohmiya *et al.*, 2006; Chiou *et al.*, 2010), el endospermo de maíz (Vallabhaneni, Bradbury y Wurtzel, 2010) y el tubérculo de patata (Campbell *et al.*, 2010). Sin embargo el patrón de expresión de genes codificantes para isoformas de CCD no parece coincidir con el contenido de carotenoides en las flores de Ipomea (Yamamizo, Kishimoto y Ohmiya, 2010), los frutos

cítricos (Kato *et al.*, 2006) y el endospermo de arroz (Ilg *et al.*, 2010).

En *Arabidopsis* los mecanismos que controlan la degradación de carotenoides son muy poco conocidos (Beisel *et al.*, 2010). Se ha demostrado que en las semillas, el contenido de carotenoides podría estar regulado por degradación mediada por la actividad CCD1 (Auldrige *et al.*, 2006). Sin embargo, esta actividad no parece tener un papel importante en la acumulación de carotenoides en las hojas, a pesar de que se detectan transcritos CCD1 en este órgano (Auldrige *et al.*, 2006).

AGRADECIMIENTOS

El trabajo en nuestro laboratorio está financiado por ayudas del Ministerio de Ciencia e Innovación de España (BIO2011-23680), la Generalitat de Catalunya (2009SGR-26 y XRB), el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (Cyted, Red IBERCAROT, ref. 112RT0445), y la Unión Europea FP7 (TiMet, contrato 245143).

REFERENCIAS

- Alba, R., Cordonnier-Pratt, M.M., Pratt, L.H. 2000. *Plant Physiol.* 123: 363-370.
- Al-Babili, S., von Lintig, J., Haubruck, H., Beyer, P. 1996. *Plant J.* 9: 601-612.
- Alder, A., Jamil, M., Marzorati, M., Bruno, M., Vermathen, M., Bigler, P., Ghisla, S., Bouwmeester, H., Beyer, P., Al-Babili, S. 2012. *Science* 335: 1348-1351.
- Auldridge, M.E., Block, A., Vogel, J.T., Dabney-Smith, C., Mila, I., Bouzayen, M., Magallanes-Lundback, M., DellaPenna, D., McCarty, D.R., Klee, H.J. 2006. *Plant J.* 45: 982-993.
- Austin, J.R., Frost, E., Vidi, P.A., Kessler, F., Staehelin, L.A. 2006. *Plant Cell* 18: 1693-1703.
- Bai, L., Kim, E.H., DellaPenna, D., Brutnell, T.P. 2009. *Plant J.* 59: 588-599.
- Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P., Buchanan, B.B. 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 370-375.
- Beisel, K.G., Jahnke, S., Hofmann, D., Köppchen, S., Schurr, U., Matsubara, S. 2010. *Plant Physiol.* 152: 2188-2199.
- Bonk, M., Hoffmann, B., Von Lintig, J., Schledz, M., Al-Babili, S., Hobeika, E., Kleinig, H., Beyer, P. 1997. *Eur. J. Biochem.* 247: 942-950.
- Bouvier, F., Keller, Y., D'Harlingue, A., Camara, B. 1998. *Biochim. Biophys. Acta* 1391: 320-328.
- Bréhélin, C., Kessler, F., van Wijk, K.J. 2007. *Trends Plant Sci.* 12: 260-6.
- Britton, G. 1993. En C. Sundqvist y M. Ryberg (eds.). *Pigment Protein Complexes in Plastids: Synthesis Assembly*. San Diego: Academic Press, pp. 447-483.
- Camara, B. 1993. *PMETHODS ENZYMOLOGY* 214: 352-365.
- Campbell, R., Ducreux, L.J.M., Morris, W.L., Morris, J.A., Suttle, J.C., Ramsay, G., Bryan, G.J., Hedley, P.E., Taylor, M.A. 2010. *Plant Physiol.* 154: 656-664.
- Candau, R., Bejarano, E.R., Cerdá-Olmedo, E. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4936-4940.
- Carol, P. Kuntz, M. 2001. *Trends Plant Sci.* 6: 31-36.
- Castillon, A., Shen, H., Huq, E. 2007. *Trends Plant Sci.* 12: 514-521.
- Chaudhary, N., Nijhawan, A., Khurana, J.P., Khurana, P. 2010. *Mol. Genet. Genomics* 283: 13-33.
- Chen, Y., Li, F., Wurtzel, E.T. 2010. *Plant Physiol.* 153: 66-79.
- Chiou, C.Y., Pan, H.A., Chuang, Y.Y., Yeh, K.W. 2010. *Planta* 232: 937-948.

REFERENCIAS

- Covington, M.F., Maloof, J.N., Straume, M., Kay, S.A., Harmer, S.L. 2008. *Genome Biol.* 9: R130.
- Cunningham, F.X. Gantt, E. 1998. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 557-583.
- Cunningham, F.X. Gantt, E. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2905-2910.
- Cunningham, F.X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K.A., DellaPenna, D., Gantt, E. 1996. *Plant Cell* 8: 1613-1626.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A.M., Adams, W.W. 1996. *FASEB J.* 10: 403-412.
- Deruère, J., Römer, S., D'Harlingue, A., Backhaus, R.A., Kuntz, M., Camara, B. 1994. *Plant Cell* 6: 119-133.
- Dogbo, O., Laferrière, A., D'Harlingue, A., Camara, B. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7054-7058.
- Dong, H., Deng, Y., Mu, J., Lu, Q., Wang, Y., Xu, Y., Chu, C., Chong, K., Lu, C., Zuo, J. 2007. *Cell Res.* 17: 458-470.
- Dong, T., Hu, Z., Deng, L., Wang, Y., Zhu, M., Zhang, J., Chen, G. 2013. *Plant Physiol.* 163: 1026-1036.
- Du, H., Wang, N., Cui, F., Li, X., Xiao, J., Xiong, L. 2010. *Plant Physiol.* 154: 1304-1318.
- Endo, T., Ishida, S., Ishikawa, N., Sato, F. 2008. *Mol. Cells* 25: 158-162.
- Fantini, E., Falcone, G., Frusciante, S., Giliberto, L., Giuliano, G. 2013. *Plant Physiol.* 163: 986-998.
- Flores-Pérez, U., Sauret-Güeto, S., Gas, E., Jarvis, P., Rodríguez-Concepción, M. 2008. *Plant Cell* 20: 1303-1315.
- Fraser, P.D., Enfissi, E.M.A., Halket, J.M., Truesdale, M.R., Yu, D., Gerrish, C., Bramley, P.M. 2007. *Plant Cell* 19: 3194-3211.
- Fraser, P.D., Schuch, W., Bramley, P.M. 2000. *Planta* 211: 361-369.
- Fraser, P.D., Truesdale, M.R., Bird, C.R., Schuch, W., Bramley, P.M. 1994. *Plant Physiol.* 105: 405-413.
- Fuentes, P., Pizarro, L., Moreno, J.C., Handford, M., Rodríguez-Concepción, M., Stange, C. 2012. *Plant Mol. Biol.* 79: 47-59.
- Fujisawa, M., Nakano, T., Shima, Y., Ito, Y. 2013. *Plant Cell* 25: 371-386.
- Galpaz, N., Wang, Q., Menda, N., Zamir, D., Hirschberg, J. 2008. *Plant J.* 53: 717-730.
- García-Limones, C., Schnäbele, K., Blanco-Portales, R., Luz Bellido, M., Caballero, J.L., Schwab, W., Muñoz-Blanco, J. 2008. *J. Agric. Food Chem.* 56: 9277-9285.

REFERENCIAS

- Ghassemian, M., Lutes, J., Tepperman, J.M., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., Quail, P.H., Lange, B.M. 2006. *Arch. Biochem. Biophys.* 448: 45-59.
- Giorio, G., Stigliani, A.L., D'Ambrosio, C. 2008. *FEBS J.* 275: 527-535.
- Giovannoni, J. 2001. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 725-749.
- Hieber, A.D., Bugos, R.C., Yamamoto, H.Y. 2000. *Biochim. Biophys. Acta* 1482: 84-91.
- Howitt, C.A., Cavanagh, C.R., Bowerman, A.F., Cazzonelli, C., Rampling, L., Mimica, J.L., Pogson, B.J. 2009. *Funct. Integr. Genomics* 9: 363-376.
- Howitt, C.A. Pogson, B.J. 2006. *Plant, Cell Environ.* 29: 435-445.
- Huguene, P., Bouvier, F., Badillo, A., Quennemet, J., D'Harlingue, A., Camara, B. 1996. *Plant Physiol.* 111: 619-626.
- Ilg, A., Yu, Q., Schaub, P., Beyer, P., Al-Babili, S. 2010. *Planta* 232: 691-699.
- Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D., Hirschberg, J. 2002. *Plant Cell* 14: 333-342.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2001. *Plant J.* 27: 325-333.
- Jia, W. 2002. *J. Exp. Bot.* 53: 2201-2206.
- Joyard, J., Ferro, M., Masselon, C., Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Garin, J., Rolland, N. 2009. *Mol. Plant* 2: 1154-1180.
- Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H., Yano, M. 2004. *Plant Physiol.* 134: 824-837.
- Kato, M., Matsumoto, H., Ikoma, Y., Okuda, H., Yano, M. 2006. *J. Exp. Bot.* 57: 2153-2164.
- Kim, J. DellaPenna, D. 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 3474-3479.
- Kim, J., Smith, J.J., Tian, L., Dellapenna, D. 2009. *Plant Cell Physiol.* 50: 463-479.
- Kim, J.E., Cheng, K.M., Craft, N.E., Hamberger, B., Douglas, C.J. 2010. *Phytochemistry* 71: 168-178.
- Kloer, D.P. Schulz, G.E. 2006. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 2291-2303.
- Kolotilin, I., Koltai, H., Tadmor, Y., Bar-Or, C., Reuveni, M., Meir, A., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Levin, I. 2007. *Plant Physiol.* 145: 389-401.
- De la Guardia, M.D., Aragón, C.M., Murillo, F.J., Cerdá-Olmedo, E. 1971. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2012-2015.
- Leivar, P. Quail, P.H. 2011. *Trends Plant Sci.* 16: 19-28.

REFERENCIAS

- Li, F., Tsfadia, O., Wurtzel, E.T. 2009. *Plant Signal. Behav.* 4: 208-211.
- Li, F., Vallabhaneni, R., Wurtzel, E.T. 2008a. *Plant Physiol.* 146: 1333-1345.
- Li, F., Vallabhaneni, R., Yu, J., Rocheford, T., Wurtzel, E.T. 2008b. *Plant Physiol.* 147: 1334-1346.
- Li, L., Paolillo, D.J., Parthasarathy, M. V, Dimuzio, E.M., Garvin, D.F. 2001. *Plant J.* 26: 59-67.
- Von Lintig, J., Welsch, R., Bonk, M., Giuliano, G., Batschauer, A., Kleinig, H. 1997. *Plant J.* 12: 625-634.
- Lois, L.M., Rodríguez-Concepción, M., Gallego, F., Campos, N., Boronat, A. 2000. *Plant J.* 22: 503-513.
- López, A.B., Yang, Y., Thannhauser, T.W., Li, L. 2008. *Physiol. Plant.* 133: 190-198.
- Lu, S., Van Eck, J., López, A.B., O'Halloran, D.M., Cosman, K.M., Conlin, B.J., Paolillo, D.J., Garvin, D.F., Vrebalov, J., Kochian, L.V., Küpper, H., Earle, E.D., Cao, J., Li, L. 2006. *Plant Cell* 18: 3594-3605.
- Maass, D., Arango, J., Wüst, F., Beyer, P., Welsch, R. 2009. *PLoS One* 4: e6373.
- Mann, V., Harker, M., Pecker, I., Hirschberg, J. 2000. *Nat. Biotechnol.* 18: 888-892.
- Martel, C., Vrebalov, J., Tafelmeyer, P., Giovannoni, J.J. 2011. *Plant Physiol.* 157: 1568-1579.
- Meier, S., Tzfadia, O., Vallabhaneni, R., Gehring, C., Wurtzel, E.T. 2011. *BMC Syst. Biol.* 5: 77.
- Mialoundama, A.S., Heintz, D., Jadid, N., Nkeng, P., Rahier, A., Deli, J., Camara, B., Bouvier, F. 2010. *Plant Physiol.* 153: 970-979.
- Millar, A.J. 2004. *J. Exp. Bot.* 55: 277-283.
- Moran, N.A. Jarvik, T. 2010. *Science* 328: 624-627.
- Nambara, E. Marion-Poll, A. 2005. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 165-185.
- Nashilevitz, S., Melamed-Bessudo, C., Izkovich, Y., Rogachev, I., Osorio, S., Itkin, M., Adato, A., Pankratov, I., Hirschberg, J., Fernie, A.R., Wolf, S., Usadel, B., Levy, A.A., Rumeau, D., Aharoni, A. 2010. *Plant Cell* 22: 1977-1997.
- Neta-Sharir, I., Isaacson, T., Lurie, S., Weiss, D. 2005. *Plant Cell* 17: 1829-1838.
- Neuman, H., Galpaz, N., Cunningham, F.X., Zamir, D., Hirschberg, J. 2014. *Plant J.* 78: 80-93.
- Van Norman, J.M., Frederick, R.L., Sieburth, L.E. 2004. *Curr. Biol.* 14: 1739-1746.
- Van Norman, J.M. Sieburth, L.E. 2007. *Plant J.* 49: 619-628.

REFERENCIAS

- Van Norman, J.M., Zhang, J., Cazzonelli, C.I., Pogson, B.J., Harrison, P.J., Bugg, T.D.H., Chan, K.X., Thompson, A.J., Benfey, P.N. 2014. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: E1300-1309.
- Norris, S.R., Barrette, T.R., DellaPenna, D. 1995. *Plant Cell* 7: 2139-2149.
- North, H.M., De Almeida, A., Boutin, J.P., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B., Marion-Poll, A. 2007. *Plant J.* 50: 810-824.
- Ohmiya, A., Kishimoto, S., Aida, R., Yoshioka, S., Sumitomo, K. 2006. *Plant Physiol.* 142: 1193-1201.
- Paolillo, D.J., Garvin, D.F., Parthasarathy, M. V 2004. *Protoplasma* 224: 245-253.
- Park, H., Kreunen, S.S., Cuttriss, A.J., DellaPenna, D., Pogson, B.J. 2002. *Plant Cell* 14: 321-332.
- Pecker, I., Gabbay, R., Cunningham, F.X., Hirschberg, J. 1996. *Plant Mol. Biol.* 30: 807-819.
- Phillip, D. Young, A.J. 1995. *Photosynth. Res.* 43: 273-282.
- Qin, G., Gu, H., Ma, L., Peng, Y., Deng, X.W., Chen, Z., Qu, L.J. 2007. *Cell Res.* 17: 471-482.
- Quinlan, R.F., Shumskaya, M., Bradbury, L.M.T., Beltrán, J., Ma, C., Kennelly, E.J., Wurtzel, E.T. 2012. *Plant Physiol.* 160: 204-214.
- Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylidès, C., Havaux, M. 2012. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 5535-5540.
- Rodrigo, M.J., Marcos, J.F., Zacarías, L. 2004. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6724-6731.
- Rodriguez-Concepcion, M. Stange, C. 2013. *Arch. Biochem. Biophys.* 539: 110-116.
- Rodríguez-Suárez, C., Atienza, S.G., Pistón, F. 2011. *PLoS One* 6: e19885.
- Rodríguez-Villalón, A., Gas, E., Rodríguez-Concepción, M. 2009. *Plant J.* 60: 424-435.
- Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D., Hirschberg, J. 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11102. 11107.
- Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D., Hirschberg, J. 1999. *Plant J.* 17: 341-351.
- Ruiz-Sola, M.Á. Rodríguez-Concepción, M. 2012. Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. *Arabidopsis Book* 10: e0158.
- Ruiz-Sola, M.Á., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., Rodríguez-Concepción, M., Rodríguez-Villalón, A. 2014. *PLoS One* 9: e90765.
- Ruiz-Sola, M.A., Rodríguez-Villalón, A., Rodríguez-Concepción, M. 2014a. *Plant Signal. Behav.* 9.
- Ruyter-Spira, C., Al-Babili, S., van der Krol, S., Bouwmeester, H. 2013. *Trends Plant Sci.* 18: 72-83.

REFERENCIAS

- Sandmann, G. 2009. *Arch. Biochem. Biophys.* 483: 169-174.
- Sauret-Güeto, S., Botella-Pavía, P., Flores-Pérez, U., Martínez-García, J.F., San Román, C., León, P., Boronat, A., Rodríguez-Concepción, M. 2006. *Plant Physiol.* 141: 75-84.
- Schwartz, S.H., Qin, X., Zeevaart, J.A.D. 2003. *Plant Physiol.* 131: 1591-1601.
- Shahbazi, M., Gilbert, M., Labouré, A.M., Kuntz, M. 2007. *Plant Physiol.* 145: 691-702.
- Shumskaya, M., Bradbury, L.M.T., Monaco, R.R., Wurtzel, E.T. 2012. *Plant Cell* 24: 3725-41.
- Simkin, A.J., Gaffé, J., Alcaraz, J.P., Carde, J.P., Bramley, P.M., Fraser, P.D., Kuntz, M. 2007. *Phytochemistry* 68: 1545-1556.
- Sun, Z., Gantt, E., Cunningham, F.X. 1996. *J. Biol. Chem.* 271: 24349-24352.
- Tian, L. DellaPenna, D. 2001. *Plant Mol. Biol.* 47: 379-388.
- Tian, L., Magallanes-Lundback, M., Musetti, V., DellaPenna, D. 2003. *Plant Cell* 15: 1320-1332.
- Tian, L., Musetti, V., Kim, J., Magallanes-Lundback, M., DellaPenna, D. 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 402-407.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., Rodríguez-Concepción, M. 2010. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 11626-11631.
- Vallabhaneni, R., Bradbury, L.M.T., Wurtzel, E.T. 2010. *Arch. Biochem. Biophys.* 504: 104-111.
- Vidi, P.A., Kanwischer, M., Baginsky, S., Austin, J.R., Csucs, G., Dörmann, P., Kessler, F., Bréhélin, C. 2006. *J. Biol. Chem.* 281: 11225-11234.
- Walter, M.H. Strack, D. 2011. *Nat. Prod. Rep.* 28: 663-692.
- Welsch, R., Arango, J., Bär, C., Salazar, B., Al-Babili, S., Beltrán, J., Chavarriaga, P., Ceballos, H., Tohme, J., Beyer, P. 2010. *Plant Cell* 22: 3348-3356.
- Welsch, R., Beyer, P., Hugueney, P., Kleinig, H., von Lintig, J. 2000. *Planta* 211: 846-854.
- Welsch, R., Medina, J., Giuliano, G., Beyer, P., Von Lintig, J. 2003. *Planta* 216: 523-534.
- Welsch, R., Wüst, F., Bär, C., Al-Babili, S., Beyer, P. 2008. *Plant Physiol.* 147: 367-380.
- Yamamizo, C., Kishimoto, S., Ohmiya, A. 2010. *J. Exp. Bot.* 61: 709-719.
- Ytterberg, A.J., Peltier, J.B., van Wijk, K.J. 2006. *Plant Physiol.* 140: 984-997.
- Yu, Q., Ghisla, S., Hirschberg, J., Mann, V., Beyer, P. 2011. *J. Biol. Chem.* 286: 8666-8676.