

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

QTLs ASSOCIATED TO CAROTENE CONTENT IN MAIZE LEAVES (*Zea mays* L.)

Viridiana Silva-Pérez¹, F. Carlos Gómez-Merino¹, J. Jesús García-Zavala¹, Juan Burgueño-Ferreira²,
Amalio Santacruz-Varela¹, Natalia Palacios-Rojas², Axel Tiessen^{3*}

¹Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México.

²Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Carretera México-Veracruz km 45.

56130. El Batán, Texcoco. Estado de México. México. ³Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Irapuato. Libramiento Norte Carretera Irapuato-León km 9.6. 36821. Irapuato, Guanajuato, México. (atiessen@ira.cinvestav.mx).

RESUMEN

Los carotenos son pigmentos antioxidantes que captan fotones 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, con la participación de más de 10 enzimas y un número de factores aún no definidos. 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, provenientes de la cruce B73×Mo17, sembradas en Irapuato, México, en el ciclo primavera-verano 2009. Los QTLs localizados se asociaron a los siguientes compuestos: luteína, α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina. El caroteno presente en mayor cantidad en las hojas fue β -caroteno (80 % del total) y el menor β -criptoxantina (0.2 %). En los cromosomas 1, 2, 4, 5, 6 y 8, se detectaron 21 QTLs significativos. 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, $r^2 \cong 0.07$), α -caroteno ($-25.41 \mu\text{g g}^{-1}$ PMS, $r^2 \cong 0.07$) y β -caroteno ($-674.98 \mu\text{g g}^{-1}$ PMS, $r^2 \cong 0.09$). Un QTL de β -criptoxantina en el cromosoma 8 fue detectado mediante el marcador *psy2* que es parálogo de la enzima fitoeno sintasa, y otro QTL coincidió con un QTL evaluado para ácido abscísico, relacionado al gen caroteno dioxigenasa. Se infiere que en el genoma de maíz existen factores aún no identificados relacionados al contenido de carotenos en hojas verdes, y los QTLs identificados en este estudio podrían ayudar a encontrar

ABSTRACT

Carotenoids are antioxidant pigments that capture photons from the visible spectrum and protect plant tissues against photo-oxidation, which is related to photosynthesis rate and crop yield. Biosynthesis of carotenoids occurs in plastids, where they are synthesized via the mevalonate-independent pathway, with more than 10 enzymes and an unknown number of factors are involved. In order to identify chromosome regions of maize (*Zea mays* L.) associated with carotene content, carotenoids were measured in leaves from 200 maize recombinant inbred lines (RILs), developed from a B73×Mo17 cross and grown in Irapuato, México, during the 2009 spring/summer cycle. Quantitative trait loci (QTLs) found were associated with the following compounds: lutein, α -carotene, β -carotene, β -cryptoxanthin and zeaxanthin. β -carotene (80% of total) was the carotene present in the highest amount in the leaves and β -cryptoxanthin (0.2%) was the lowest. Twenty-one significant QTLs were located in chromosomes 1, 2, 4, 5, 6 and 8. A highly significant QTL ($p \leq 0.001$) was located in bin 1.07 with a high additive value for lutein ($-89.16 \mu\text{g g}^{-1}$ DW, $r^2 \cong 0.07$), α -carotene ($-25.41 \mu\text{g g}^{-1}$ DW, $r^2 \cong 0.07$) and β -carotene ($-674.98 \mu\text{g g}^{-1}$ DW, $r^2 \cong 0.09$). A β -cryptoxanthin QTL was located in chromosome 8 using the *psy2* marker which is a paralog gene to the phytoene synthase enzyme; another QTL coincided with an abscisic acid QTL related to the carotene dioxygenase gene. It is inferred that in the maize genome there are unknown factors related to carotene content in green leaves, and the QTLs located in this study could help to identify new genes or factors that determine the carotenoid content in maize leaves.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2011. Aprobado: abril, 2012.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 46: 333-345. 2012.

Key words: *Zea mays*, QTLs, quantitative traits, carotenoids in leaves.

trar nuevos genes o factores que determinan el contenido de carotenos en hojas de maíz.

Palabras clave: *Zea mays*, QTLs, caracteres cuantitativos, carotenoides en hojas.

INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son pigmentos naturales de color amarillo a rojo producidos por los organismos autótrofos (Farré *et al.*, 2010) y son relevantes en la nutrición humana y animal (HarvestPlus, 2006). Los carotenoides están involucrados en la fotosíntesis, ya sea como antenas accesorias durante la captarecepción de luz o como antioxidantes, y protegen las membranas contra la foto-oxidación (Demmig-Adams y Adams III, 1996). Estos compuestos afectan el rendimiento de las plantas, porque en parte determinan la tasa fotosintética y eficiencia en la captura de energía solar (Parry *et al.*, 2010). 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). En maíz (*Zea mays* L.) se conocen varios mutantes de genes involucrados en la ruta de los carotenos en granos y 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 ζ -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), aún no se han identificado todas las enzimas de la ruta, ni se han mapeado todos los genes relevantes, y sólo se conocen genes de algunas isoformas.

Una manera de localizar regiones en los cromosomas relacionadas con una característica fenotípica

INTRODUCTION

Carotenoids are natural yellow to red pigments produced by autotrophic organisms (Farré *et al.*, 2010) and are important in human and animal nutrition (HarvestPlus, 2006). Carotenoids are involved in photosynthesis, as light harvesting antenna accessory pigments or as antioxidants, preventing photo-oxidative damage in membranes (Demmig-Adams III, 1996). These compounds have an influence on crop yield due to their relationship to photosynthetic rate and sunlight capture efficiency (Parry *et al.*, 2010). Furthermore, they are precursors of signalling molecules that are induced in response to biotic and abiotic stress, such as abscisic acid (ABA) (North *et al.*, 2007).

In green leaves, carotene biosynthesis occurs in the internal membranes of chloroplasts (Gallagher, *et al.*, 2004) and proceeds via the mevalonate-independent pathway (Fraser and Bramley, 2004) (Figure 1). There are many mutants of genes involved in the carotenoid pathway in maize grain and leaves (*Zea mays* L.). The *yellow 1* (*y1*) mutant is associated with the phytoene synthase enzyme 1 (PSY) and produces white seeds (Buckner *et al.*, 1996). *Viviparous 2* (*vp2*) and *viviparous 5* (*vp5*) mutants show white endosperm and precocious germination due to their lack of carotenoids and ABA, and are associated to phytoene desaturase (PDS) (Li *et al.*, 1996; Hable *et al.*, 1998). *White seedling* (*w3*) mutants have white endosperm and white leaves; they are sometimes viviparous and accumulate phytoene (Li *et al.*, 1996). *Viviparous 9* (*vp9*) mutants show white endosperm and are related to ζ -carotene desaturase (ZDS) (Matthews *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007). Although many carotene mutants of maize are known (Figure 1), there are still several enzymes of the pathway that have yet remained unidentified. Not all relevant genes have been mapped (annotated), and only a few isoforms have been characterized.

An approach to identifying chromosomal regions related to a particular phenotypic characteristic is through Quantitative Trait Loci (QTL). This technique uses linkage disequilibrium and statistical methods to associate molecular markers with a particular phenotype. It permits the location of chromosome regions which contain one or more genes involved in the phenotypic traits of interest (Collard *et al.*, 2005). No studies of carotenoid

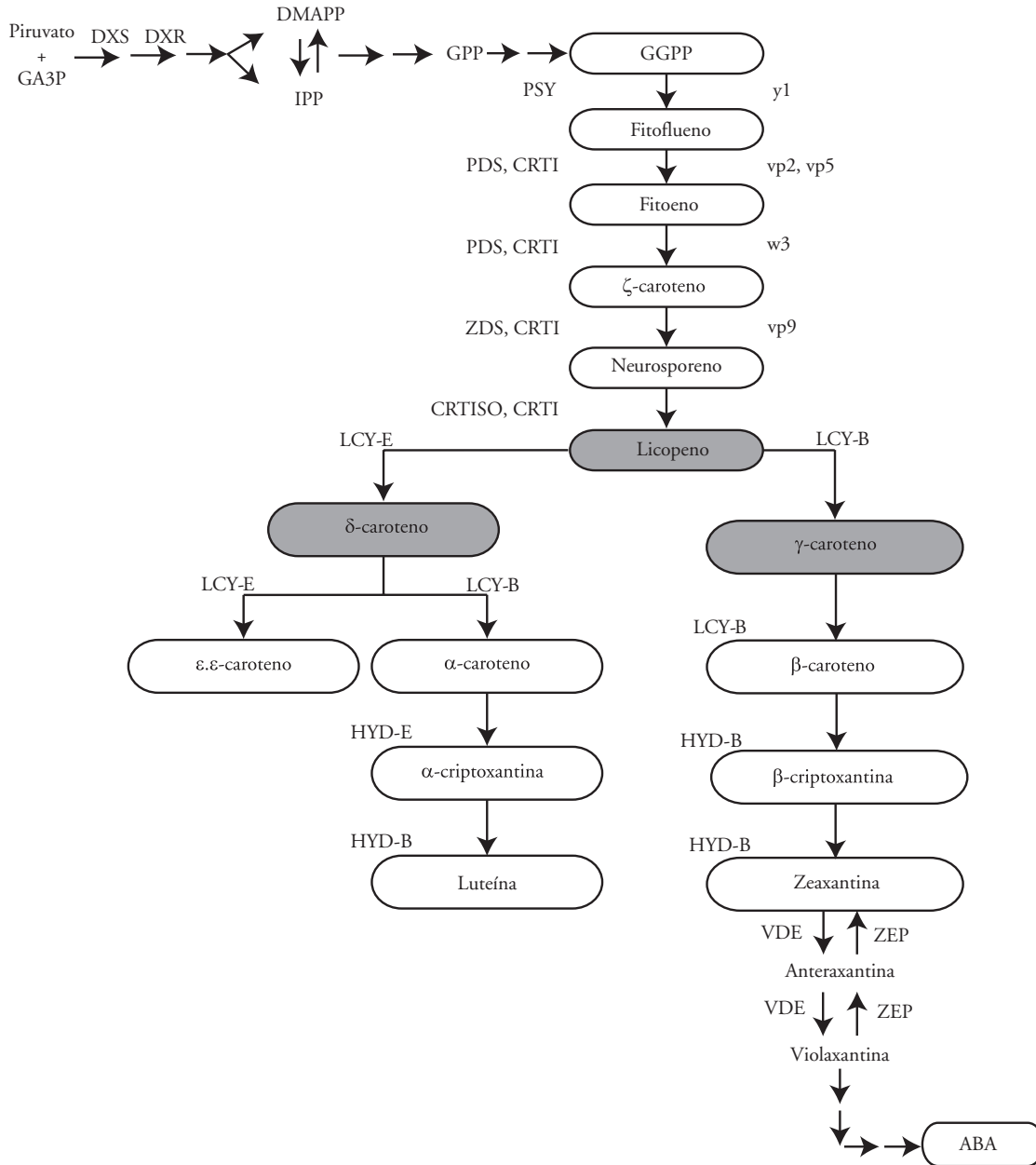


Figura 1. Ruta mevalónica independiente de los tetraterpenoides que da lugar a los diferentes carotenos de las plantas y la hormona ABA. GA3P: D-gliceraldehído-3-fosfato; DXS: 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa; DXR: reductoisomerasa; DMAPP: dimetilalil pirofosfato; IPP: isopentenil bifosfato; GPP: geranyl pirofosfato; GGPP: geranyl geranyl pirofosfato; PSY: fitoeno sintasa; PDS: fitoeno desaturasa; CRTI, ZDS: ζ-caroteno desaturasa; CRTISO: caroteno isomerasa; LCY-E: ε-licopeno ciclasa; LCY-B: β-licopeno ciclasa; HYD-E: ε-hidroxilasa; HYD-B: β-hidroxilasa; VDE: violaxantina de-epoxidasa; ZEP: zeaxantina epoxidasa; ABA: ácido abscísico. Enzimas asociadas a mutantes en maíz: *yellow 1* (*y1*), *viviparous 2* (*vp2*), *viviparous 5* (*vp5*), *white seedling* (*w3*), *viviparous 9* (*vp9*). (Li *et al.*, 1996; Fraser y Bramley, 2004; Wong *et al.*, 2004).

Figure 1. Mevalonate-independent pathway of tetraterpenes which produces carotenoids and the ABA hormone in plants. GA3P: D-glyceraldehyde-3-phosphate; DXS: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase; DXR: reductoisomerase; DMAPP: dimethylallyl diphosphate; IPP: isopentenyl diphosphate; GPP: geranyl pyrophosphate; GGPP: geranyl geranyl pyrophosphate; PSY: phytoene synthase; PDS: phytoene desaturase, CRTI, ZDS: ζ-carotene desaturase, CRTISO: carotenoid isomerase, LCY-E: ε-lycopene cyclase, LCY-B: carotene β-lycopene cyclase, HYD-E: carotene ε-hydroxylase, HYD-B: β-hydroxylase. VDE: violaxanthin de-epoxidase ZEP: zeaxanthin epoxidase ABA: abscisic acid. Enzymes related to maize mutants: *yellow 1* (*y1*), *viviparous 2* (*vp2*), *viviparous 5* (*vp5*), *white seedling* (*w3*), *viviparous 9* (*vp9*). (Li *et al.*, 1996; Fraser and Bramley 2004; Wong *et al.*, 2004).

específica es mediante la identificación de *loci* de caracteres cuantitativos (QTL, por sus siglas en inglés). La técnica se basa en el desequilibrio de ligamiento y usa 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 revisada no se encontraron estudios sobre QTLs de carotenos en hojas de maíz ni en tejidos verdes de otra especie vegetal. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el contenido de luteína, β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, y zeaxantina, así como detectar posiciones de *loci* de caracteres cuantitativos relacionados con este tejido fotosintético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetativo y siembra

Se usaron líneas endogámicas recombinantes (RILs, por sus 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, EE.UU. Las plantas crecieron en un sustrato de peat moss y vermiculita (proporción 1:1). Los genotipos se sembraron sistemáticamente con cuatro repeticiones cada uno en una maceta (25 cm diámetro, 25 cm altura), en un invernadero con luz solar natural y condiciones de temperatura y humedad semicontroladas, ubicado en Irapuato, México (20° 43' 06.19" N, 101° 19' 44.53" O; 1730 msnm). La población (5.7 plantas m⁻²) se mantuvo sin estrés biótico y abiótico, se regó diario, se fertilizó con triple 17 y urea, y se combatió plagas y enfermedades oportunamente.

Muestreo y extracción de carotenos

A los 65 d después de la siembra (DDS) (10^a hoja desarrollada) se obtuvieron muestras de 200 líneas IBM-RILs. 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 μ L de etanol más 3, 5-Di-tert-4-butilhidroxitolueno (BHT) 1 % y mezclar con agitador

QTLs in maize leaves or in green tissues of other plant species were found in the literature reviewed. Therefore, the objective of this project was to measure the lutein, β -carotene, α -carotene, β -cryptoxanthin and zeaxanthin content in maize leaves, and to identify QTLs in this photosynthetic tissue.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and sowing

Maize recombinant inbreeds lines (RILs) developed from the intermated B73×Mo17 cross (IBM population) (Lee *et al.*, 2002) were used. The original seed was acquired from Maize Genetics Cooperation Stock Center, USA. The plants grew in a mixture of peat moss and vermiculite (proportion 1:1). Four replications of the genotypes were sown systematically, one per pot (25 cm diameter and 25 cm high), in a greenhouse with natural light and semi-controlled temperature and humidity, located at Irapuato, Mexico (20°43'06.19" N, 101°19'44.53" W; 1730 masl). The plant population (5.7 plants m⁻²) were grown free of any biotic or abiotic stress. Plants were well watered, fertilized with 17-17-17 (NPK) and urea, pest and diseases were treated when required.

Sampling and carotenoid extraction

Sixty-five days after sowing (DAS) (10th expanded leaf), 200 IBM-RILs were sampled. Only healthy and uniformly green leaves were harvested. For each RIL entry, a tissue pool was formed from four replicate plants (always fourth leaf). This tissue was ground with liquid nitrogen, and two subsamples were lyophilized for 36 h. The dry tissue was ground in a Retch MM 301 mill during 30 s with 1/30 Hz frequency. Carotenoids were extracted from 20 mg dry weight (DW) of tissue, following a slightly modified technique (Kurilich and Juvik 1999). After adding 500 μ L ethanol and 1 % 3, 5-Di-tert-4-butylhydroxitoluene (BHT) and vortex mixing, the sample was heated to 80 °C for 5 min, and 20 μ L KOH 80 % was added and the extract was heated again to 80 °C for 20 min; the sample was then placed in ice, and 500 μ L of deionized water at 4 °C was added. In the first extraction 500 μ L hexane was added and in the second extraction 250 μ L hexane was added. The organic layer (750 μ L) was separated, dried and resuspended with 200 μ L absolute ethanol.

Carotenoids quantification

A sample aliquot 20 μ L was injected into a high performance liquid chromatographer (HPLC)(Agilent Technologies series

tipo vortex, 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. En un primer lavado, se agregaron 500 μL de hexano y en el segundo se usaron 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, California, EE.UU.) acoplado a una columna YMC Carotenoid, 5 μm 4.6 \times 150 mm de (Waters, Milford, MA, EE.UU.). Como fase móvil se usó 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. Un detector de arreglo de diodos se usó 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 usaron para determinar el contenido de los carotenos. Los tiempos de retención se obtuvieron con los estándares puros para α -caroteno (05784), β -caroteno (C4582) y zeaxantina (14681) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) y para luteína (0133) y β -criptoxantina (0055) de CaroteNature (Lupsingen, Suiza). 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 correspondieron a los datos obtenidos de contenido de carotenos en cada una de las 200 RILs. Los datos genotípicos se basaron en 2039 marcadores moleculares correspondientes a la población IBM-RIL 302 contenidos en la base de datos de maiz GDB (www.maizegdb.org). La distancia promedio entre marcadores fue 4.4 cM en los 10 cromosomas. Para localizar QTLs significativos se realizó una regresión lineal simple para cada marcador. Se probó la significancia de cada uno de los coeficientes de regresión asociados al efecto de los marcadores usando ANOVA. Todos aquellos marcadores cuyos p-valores fueron menores a 0.001 se consideraron asociados a QTLs. Los análisis fueron realizados en R-2.11.1 (31 05 2010).

1200, Santa Clara, California, U.S.A) attached to a YMC carotenoid column, 5 μm 4.6 \times 150 mm (Waters, Milford, MA, USA). A methanol/acetonitrile/dichloromethane/BHT 55/40/5/1 (v/v/v/w) mix was used as mobile phase, which allowed an isocratic elution of the compounds at a column temperature of 40 °C. A diode array detector (DAD) was used to monitor absorbance at three wavelengths simultaneously: 420, 450 and 473nm. The chromatographic peaks were integrated manually. The average value of the three areas of the three wavelengths was used to determine the carotenoid content with more reliability. Standard curves and retention times were obtained from pure standards: α -carotene (05784), β -carotene (C4582) and zeaxanthin (14681) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) and lutein (0133), and β -cryptoxanthin (0055) from CaroteNature (Lupsingen, Switzerland). Data were analyzed in an Excel spread sheet to obtain a final result in micrograms of carotenos per sample dry weight (μg carotenos g^{-1} DW). Total carotenoid content was defined as the sum of lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, β -carotene and α -carotene.

Statistical method for QTL analysis

In the QTL analysis, data from the carotenos measured in each of the 200 RILs were used as phenotypic values. The genotypic values were based on the IBM-RIL 302 population allelic scores of 2039 molecular markers which were downloaded from maizeGDB (www.maizegdb.org). Markers were homogeneously distributed among the 10 chromosomes with an average distance of 4.4 cM. QTLs were identified through single marker regression. The significance of the marker effects and regression coefficients were obtained by ANOVA. All single markers or group of linked markers with a p-value lower than 0.001 were considered as valid QTLs. R software version 2.11.1 (31-05-2010) was used in this analysis.

Bioinformatic analysis

The bioinformatic analysis consisted in to analyze the possible association between known carotenos gens and QTLs from this study. Gens and mutants were localized in Maizesequence (<http://www.maizesequence.org/>) and Maize GDB (<http://www.maizeGDB.org/>).

RESULTS AND DISCUSSION

β -carotene content in leaves

Total β -carotene content in mature maize leaves was similar to that reported in mature tobacco leaves

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 estudio. 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 Maize GDB (<http://www.maizeGDB.org/>).

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); 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. Hubo una tendencia similar en el contenido de luteína y en la razón β -caroteno/luteína (Cuadro 1).

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). 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 (Cuadro 1). Esto es interesante, porque para producir el arroz dorado transgénico con alto contenido de carotenos se usó una enzima PSY heteróloga de maíz (Paine *et al.*,

Nicotiana tabacum) (Table 1), but it was 10.7 times higher than in young *Arabidopsis thaliana* plants (Carol *et al.*, 1999) and 50 times higher than in *Nicotiana glauca* leaves (40-65 DAS) (Zhu *et al.*, 2007). This suggests that carotene content in leaves can vary considerably from species to species and is also likely affected by physiological aging. There was a similar trend in the content of lutein and in the β -carotene/lutein ratio (Table 1).

The β -carotene/lutein ratio indicates metabolic distribution in the two branches of the pathway and reflects the levels of activity and affinity for the substrate of the enzymes LYCE and LYCB in these tissues (Figure 1). Maize leaves have a higher β -carotene/lutein ratio contrasting with values lower than 1 in leaves of other species (Table 1). This is interesting because, to produce yellow transgenic maize with high carotene content, a heterolog PSY maize enzyme was used (Paine *et al.*, 2005) and not one from bacteria or from *Arabidopsis thaliana* as in other studies (Table 1). This implies that the maize genome can be a valuable source of genes that can help to manipulate and to understand the function of carotenos in other plant species.

Carotene profile in leaves from IBM-RILs

Confirming that there are large genetic variations in β -carotene and lutein content in maize leaves, the entire profile of carotenoid compounds was examined in the 200 IBM-RILs population. The result (Figure 2) is shown as *boxplot* graphs that reports medians, interquartile amplitudes and standard deviation of the carotene content in the evaluated samples.

Regarding total carotene content measured in IBM-RILs leaves, β -carotene had the highest

Cuadro 1. Contenido de carotenos en hojas de siete especies de diferentes edades ($\mu\text{g g}^{-1}$ PMS).

Table 1. Carotene content in leaves of different ages from seven species ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW).

Especie (edad fisiológica)	β -caroteno	Luteína	β -car/lut	Referencia
<i>Zea mays</i> (7 DDS)	514 \pm 29	432 \pm 25	1.190	Kay y Phinney 1956
<i>Zea mays</i> (B73) (65 DDS)	5339 \pm 1816	1142 \pm 278	4.675	Este estudio
<i>Arabidopsis thaliana</i>	500	750	0.667	(Carol <i>et al.</i> , 1999)
<i>Nicotiana tabacum</i>	5200 \pm 1200	10300 \pm 2100	0.505	Ralley <i>et al.</i> , 2004
<i>Nicotiana tabacum</i>	1390 \pm 280	1111 \pm 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. β -caroteno/luteína: β -car/lut \diamond DAS= days after sowing. β -carotene/lutein: β -car/lut.

2005) y no una de bacterias o de *Arabidopsis thaliana* como en 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. El resultado (Figura 2) se muestra como una gráfica *boxplot* que analiza las medias, las amplitudes intercuartiles y la desviación estándar del contenido de carotenos en las muestras evaluadas.

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 para la dominancia del β -caroteno en las hojas de maíz aún se desconoce; quizá se debe a sus propiedades químicas fuertemente hidrofóbicas,

concentración (80 %), based on dry weight (DW), followed by lutein (17.1 %), zeaxanthin (1.4 %), α -carotene (1.4 %) and β -cryptoxanthin (0.2 %). This carotenoid profile contrasted with that of maize kernels in which typically zeaxanthin and lutein are the dominant compounds, while β -carotene is found in lower concentrations (Berardo *et al.*, 2004; Ortiz-Monasterio *et al.*, 2007).

The reason β -carotene dominates in maize leaves is still unknown. It may be due to its strongly hydrophobic nature, and because it is ubiquitous in all oxygenic phototrophic organisms (Britton, 2009). β -carotene is intimately associated with centers of photosynthetic reaction of the chlorophylls, specifically in photosystem II (PSII) of the chloroplasts, and with photoprotection (Trebst and Depka, 1997). Lutein is a less hydrophobic compound associated with light reception and its antioxidant capacity (Telfer *et al.*, 2008; Ruban and Johnson, 2010). It is also part of PSII and is involved in the transfer of energy from chlorophylls *b* and *a* (Polivka and Frank, 2010). Zeaxanthin, also less hydrophobic than β -carotene, is involved in dissipating excess of light energy captured during photosynthesis (Ruban and Johnson, 2010) and participate for energy transference light energy to chlorophyll *a* (Connelly *et al.*, 1997). β -cryptoxanthin and α -carotene are hydrophobic (Telfer *et al.*, 2008), but they have less antioxidant activity and are not known to possess photosynthetic functions. This could explain why they were found in low concentrations in maize leaves.

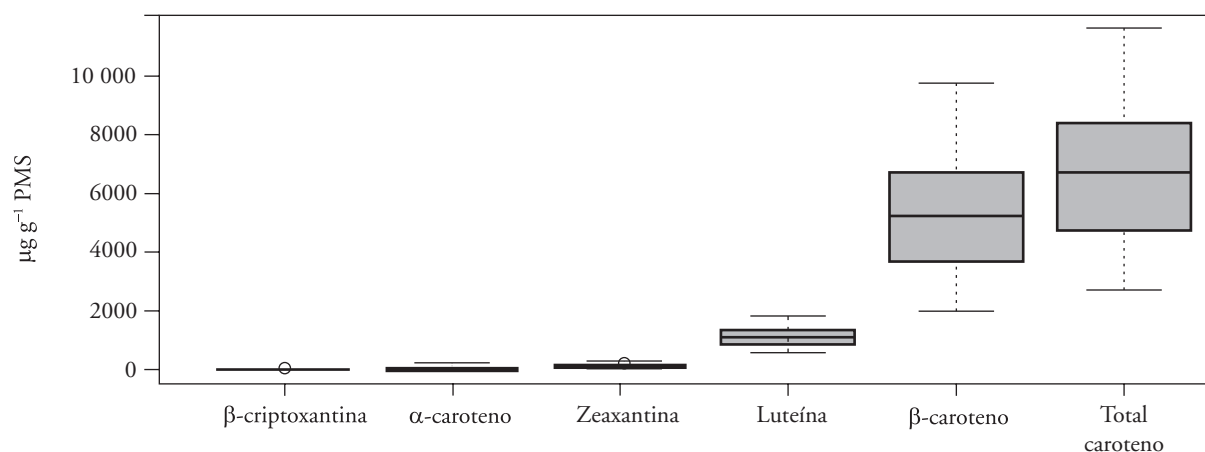


Figura 2. Contenido de compuestos carotenoides en hojas de las IBM-RILs.
Figura 2. Carotenoid compounds content from IBM-RILs leaves.

porque es ubicuo en todos los organismos fototrópicos oxigénicos (Britton, 2009), y por estar 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 recepción 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 cual 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 2 muestra los marcadores que representaron picos con $p \leq 0.001$ de las IBM-RILs para α -caroteno, luteína, β -caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina, en los cromosomas 1, 2, 4, 5, 6 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, el mayor valor aditivo (aditividad genética) se encontró para los marcadores *umc2239* (β -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 disponibles en la base de datos de Maizesequence, los cuales a su vez podrían ser genes regulatorios de algunas de las enzimas de la ruta de los carotenos.

Analysis of carotene QTLs

The first approximation to identifying regulatory genes of carotene biosynthesis, consisted in searching QTLs in all chromosomal regions of the IBM-RILs. Table 2 shows significant markers with $p \leq 0.001$ for α -carotene, lutein, β -carotene, β -cryptoxanthin, and zeaxanthin in chromosomes 1, 2, 4, 5, 6 and 8 of the maize genome.

The markers with the greatest additive effect (genetic additivity) on lutein were *umc2239* in chromosome 1 and *asg73* in chromosome 5. For the other compounds, the highest additivity was found for markers *umc2239* (β -carotene and β -carotene), *cdo507b* (β -cryptoxanthin) and *mmp169* (zeaxanthin). The marker *umc2239*, located in bin 1.07, was outstanding; it was highly significant ($p \leq 0.0001$) and had high additive value for α -carotene, lutein and β -carotene. This region contained 11 genes that have no available annotation in the Maizesequence database. These may be genes that regulate some of the enzymes of the carotene pathway in leaves.

Correspondence with QTLs previously reported for other traits

Some previously reported phenotypic and metabolic characteristics may be related to carotene content. Therefore, QTL co-location was examined. The zeaxanthin QTL (marker *mmp43*) is found near the range of markers (77 to 115 cM of bin 5.01) of a QTL previously described for ABA content, which has a candidate gene of carotene dioxygenase (*CCD-EST*) (Capelle *et al.*, 2010), which is involved in the oxidative cleavage of carotenoids that forms fragrances (β -ionone, geraniol, β -damascenone). *CCD-EST* leads to the synthesis of phytohormones (ABA) and stimulates growth of mycorrhizae, anti-fungicides and pheromones (Matthews and Wurtzel, 2007). The marker *asg73* is within the interval 83 to 122 cM in bin 5.02 of the QTL Desiccation DW 60_4 that contains the gene candidate of dehydrin Rab28 a LEA (Late Embryogenesis Abundant) protein involved in desiccation resistance (Capelle *et al.*, 2010). The two above examples suggest that the significant QTLs we have located using the IBM-RILs may contain several genes that are indeed involved in biotic and abiotic stress.

Cuadro 2. QTLs para carotenos medidos en hoja de maíz de IMB-RILs B73 x Mo17 (A=1; B=-1). Se presentan todos los marcadores con un nivel de significancia $p \leq 0.001$.**Table 2. QTLs for carotenoids measured in IMB-RILs B73 x Mo17 maize leaves (A=1; B=-1). All markers with a significance level of $p \leq 0.001$ are presented.**

Núm.	Marcador	Bin	Pos (cM)	Inicio (pb)	Fin (pb)	$p \leq$	r^2	V. A. [†]
<i>α</i> -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
<i>β</i> -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
<i>β</i> -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 ♦ Additive value.

[†] μg carotenos g^{-1} PMS ♦ μg carotenoids g^{-1} DW.

Correspondencia con QTLs previamente reportados para otras características

Algunas características fenotípicas y metabólicas pueden estar relacionadas con el contenido de carotenos, por lo cual 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

Correspondence with QTLs previously reported in kernel

The zeaxanthin QTL (*mmp43*) identified in this study (Table 2) is around 6 to 12 cM from four kernel QTLs (two of total carotenoids, one of β -carotene and another of lutein) located in the RILs of the maize cross By804 × B73 (Chander *et al.*, 2008).

The QTLs found for leaves did not coincide with the QTLs described in the cross W64a × A632 for carotenoids in kernel. Carotene QTLs had

(*CCD-EST*) (Capelle *et al.*, 2010), el cual está involucrado en la ruptura oxidativa de carotenos que permite formar fragancias (β -ionona, geraniol, β -damascenona). *CCD-EST* conlleva a la síntesis de fitohormonas (ABA) y estimula el crecimiento de micorrizas, antifúngicas y feromonas (Matthews y Wurtzel, 2007). El marcador *asg73* está dentro del intervalo 83 a 122 cM 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 sugieren 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 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 crucea By804 \times B73 (Chander *et al.*, 2008).

Los QTLs encontrados en hoja no coincidieron con los QTLs descritos en la crucea 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 crucea B73 \times Mo17 usada en este estudio puede generar QTLs diferentes a los reportados en otras cruces como la W64a \times 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. Un ejemplo es el mutante *y1* (PSY) que carece de carotenos en el grano, pero presenta hojas normales, lo cual indica la existencia de diversos parálogos e isoformas para cada paso enzimático expresados 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 2), probablemente porque en tejidos fotosintéticos sus funciones predominantes son la captación de luz y la foto-protección (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). En cambio, en

been identified in chromosome 6 (14 to 25 cM), chromosome 7 (80 to 85 cM), and chromosome 8 (54 to 88 cM) (Wong *et al.*, 2004). One possible explanation is that the cross B73 \times Mo17 used in our study may generate QTLs different from those reported for other crosses such as W64a \times A632 (Wong *et al.*, 2004). Another, and more likely reason, may be that the leaf and kernel biosynthetic pathways are independent and regulated in a different manner. There may be separate sets of enzymes and factors that determine carotene content in each type of tissue. One example is the mutant *y1* (PSY) that lacks carotene in the kernel but has normal green leaves. This indicates the existence of diverse paralogs and isoforms for each enzymatic step expressed differentially in the different tissues. This was the case of the enzyme phytoene synthase 2 (*psy2*), for which the β -cryptoxanthin QTL had a significance of $p=0.0076$ (Table 2), probably because in photosynthetic tissues its primary functions are light harvesting and photoprotection (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). In contrast, kernel carotenos are ABA precursors as has been shown in the *viviparous 2* and *5* maize mutants (Li *et al.*, 1996; Hable *et al.*, 1998). This phytohormone, besides assuring seed dormancy, is a mediator of programmed cell death in maize kernel (Young and Gallie, 2000).

Correspondence of QTLs with genes encoding known enzymes of the pathway

A bioinformatic search was done using the <http://www.maizesequence.org> and <http://www.maizegdb.org> databases (Andorf *et al.*, 2010) to determine the correspondence between the identified QTLs and known enzymes of the carotene pathway (Table 3). Of the 21 QTLs identified (Table 2), only the QTL corresponding to the marker *psy2* ($p=0.007$) coincided with the region of the *phytoene synthase 2* gene (GRMZM2G149317), one of the 18 annotated genes of the carotene pathway (Table 3). The rest of the genes are found at a distance of more than 800 kb from the significant peaks of the QTLs, indicating the possible existence of enzymes or transcription factors yet to be identified that determine carotene content in maize leaves. The QTLs identified in this study may help locate novel genes encoding proteins with a regulatory function for the carotenoid pathway.

el grano los carotenos son precursores del ABA como se muestra 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 3). De los 21 QTLs identificados (Cuadro 2) sólo el QTL correspondiente al marcador

CONCLUSIONS

The results showed that the predominant carotenoid compound found in green maize leaves was β -carotene, while β -cryptoxanthin and lutein were found in smaller quantities relative to those found in maize kernel. The statistical analysis permitted identification of 21 QTLs located in chromosomes 1, 2, 4, 5, 6 and 8, of these QTLs, 6 were α -carotene, 4 lutein, 3 β -carotene, 6 β -cryptoxanthin and 2 zeaxanthin. Two b-carotene and one a-carotene QTLs were found in chromosome 1 and 2. One lutein QTL, which was the most significant and had the highest additive value for lutein, α -carotene and β -carotene, was observed in chromosome 1 at the marker *umc2239*.

—End of the English version—

Cuadro 3. Genes de la ruta de los carotenos en el genoma completo de maíz (B73). <http://www.maizesequence.org> y <http://www.maizegdb.org> (consulta: enero 2011).

Table 3. Genes of the carotene pathway in the complete maize genome (B73). <http://www.maizesequence.org> and <http://www.maizegdb.org> (consulted in January 2011).

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 - 44 449 237
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>	5.04	100 700 176 - 100 702 026
GRMZM2G139650	Similar a <i>fitoeno 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

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 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.

CONCLUSIONES

El compuesto carotenoides mayoritario en las hojas verdes de maíz es el β -caroteno, mientras que la β -criptoxantina y la luteína se encuentran en menores cantidades, en comparación con los granos de maíz. El análisis estadístico permitió identificar 21 QTLs localizados en los cromosomas 1, 2, 4, 5, 6 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. Se encontraron dos QTLs en el cromosoma 1 y 2 de β -caroteno y α -caroteno. En el cromosoma asociado al marcador *umc2239* se observó un QTL de luteína, el cual fue el más significativo y presentó el mayor valor aditivo en luteína, α -caroteno y β -caroteno.

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.

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 Maize GDB: 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 Sci. & Emerging Technol.* 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: 173-19 p.
- Buckner, B., P. S. Miguel, D. Janick-Buckner, and J. L. Bennetzen. 1996. The *y1* 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 Biol.* 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. *Theor. Appl. Genet.* 116: 223-233.
- Delgado-Vargas, F., A. R. Jiménez, and O. Paredes. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betains-characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40: 173-289.
- Demmig-Adams, B., and W. W. Adams III. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Sci.* 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 *Sci.* 179: 28-48.
- Fraser, P. D., and P. M. Bramley. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress Lipid Res.* 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 Physiol.* 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. *Mol. General Genet.* 257: 167-176.
- HarvestPlus. 2006. *Breeding Crops for Better Nutrition.* HarvestPlus. Washington. 4 p.
- 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 engine *Plant J.* 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 Physiol.* 31: 415-420.

- Kurilich, A. C., and J. A. Juvik. 1999. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 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. Mol. Biol.* 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 Physiol.* 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 Biol.* 30: 269-279.
- Matthews, P. D., R. Luo, and E. T. Wurtzel. 2003. Maize phytoene desaturase and ζ -carotene desaturase catalyze a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *J. Exp. Bot.* 54: 2215-2230.
- Matthews, P. D. E. T. Wurtzel. 2008.2007. 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 neoxaisomers. *Plant J.* 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 breeding. *J. Cereal Sci.* 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 provitamin A content. *Nature Biotechnol.* 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 and efficiency. *J. Exp. Bot.* 62: 453-467.
- Polivka, T., and H. A. Frank. 2010. Molecular factors controlling photosynthetic light harvesting carotenoids. *Chem. Res.* 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 J.* 39: 477-486.
- Ruban, A. V., and M. P. Johnson. 2010. Xanthophylls as modulators of membrane function. *Arch. Biochem. Biophys.* 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. *Theor. Appl. Genetic.* 108: 349-359.
- Young, T. E., and D. R. Gallie. 2000. Programmed cell death during endosperm development. *Plant Mol. Biol.* 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 *crtI* gene. *Transgenic Res.* 16: 813-821.