



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES  
*BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* EN SEMILLAS DE  
*BIXA ORELLANA* Y LA FUNCIÓN DE SUS  
PROTEÍNAS EN *ESCHERICHIA COLI*.**

Tesis que presenta

JONATHAN SANTIAGO DZIB CAUICH

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2019

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



## RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Jonathan Santiago Dzib Cauich titulado análisis de la expresión de los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* en semillas de *Bixa orellana* y la función de sus proteínas en *Escherichia coli*, fue realizado en la unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en la línea de investigación sobre genética vegetal, en el laboratorio 27 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dra. Renata Rivera Madrid, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

---

Dra. Clelia De la Peña Seaman

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 7 de Enero de 2019

## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: JONATHAN SANTIAGO DZIB CAUICH

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado análisis de la expresión de los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* en semillas de *Bixa orellana* L. y la función de sus proteínas en *Escherichia coli*, bajo la asesoría de la Dra. Renata Rivera Madrid.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada: 619234

*Para mi comité revisor:*

Los doctores (a): Renata Rivera Madrid, Yair Cárdenas Conejo, Gregorio Godoy Hernández y Enrique Castaño de la Serna

*Para la gente que aportó parte de su conocimiento, formó parte importante de los experimentos y estuvo al pendiente de esta investigación:*

Los maestros en ciencias: Margarita Aguilar Espinosa y Víctor Carballo Uicab.

*Para la gente que apoyó en los experimentos de esta investigación:*

IBQ. Angélica Chi Mena, Claudine Gallegos Brito, M.C Pedro Escobar Turriza, M.C Rodolfo Pech Oíl, M.C Lucila Sánchez Cach, M.C Francisco Alejandro Guillen Chablé y la Dra. Georgina Estrada Tapia

*Para la gente que proporcionó sugerencias sobre este estudio:*

Dr. Ignacio Islas Flores y M.C Gilberto Muñoz

*Para las personas que forman parte de mi equilibrio emocional*

Cintha del Carmen Chan Dzib, te agradezco por todos los momentos a mi lado, por ser la fuerza motriz que me impulsa a ser mejor persona y profesional todos los días. Reconozco todo el apoyo que me brindas y no está de más mencionar que sin equilibrio emocional el ser humano pierde la brújula y si no la he perdido, es gracias a ti.

A mi familia: Hermanos (Pablo, Dany y Fátima), sobrinos (Sofía, Eduardo, Francisco, Matías, Diego, Regina), abuelos (Sofía), tíos (Lupe, Eloy, Rosa, Alberto), primos, cuñados (a) y a mi mamá (Regina Cauich Más) por hacer de cada fin de semana, un cargador de fuerzas para iniciar la semana. Estoy consciente que el ser humano necesita de amor, comprensión y consejos para tener un propósito en la vida, y ustedes me lo han brindado.

A mis amigos: Hiram, Alejandra, Aurora, Jenny, Alejandro, Henry y Zuriely por formar parte de este círculo de amistad que no únicamente brinda diversión, si no también apoyo, consejos y contribuye al crecimiento personal y profesional.

## **DEDICATORIAS**

*Dedicado a dos mujeres importantes en mi vida: la primera me brinda un amor de pareja que me ayuda todos los días a enfocarme en mis metas, la segunda me brinda un amor más antiguo pero puro y legítimo, un amor que ha hecho forjarme como un ser humano de bien y un excelente profesional. Esta tesis está dedicada para mi novia Cinthya del Carmen Chan Dzib y para mi mamá Regina Cauich Más.*

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....                            | <b>12</b> |
| <b>CAPÍTULO I</b> .....                              | <b>14</b> |
| <b>ANTECEDENTES</b> .....                            | <b>14</b> |
| 1.1 <i>BIXA ORELLANA</i> .....                       | 14        |
| 1.2 ISOPRENOIDES .....                               | 21        |
| 1.3 CAROTENOIDES. ....                               | 33        |
| 1.4 APOCAROTENOIDES.....                             | 43        |
| 1.5 COMPLEMENTACIÓN DE COLOR.....                    | 47        |
| <b>HIPÓTESIS</b> .....                               | <b>52</b> |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....                           | <b>51</b> |
| <b>OBJETIVO GENERAL</b> .....                        | <b>53</b> |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                           | 53        |
| <b>DIAGRAMA EXPERIMENTAL</b> .....                   | <b>54</b> |
| <b>CAPÍTULO II</b> .....                             | <b>55</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....                    | <b>55</b> |
| 2.1 MATERIAL VEGETAL .....                           | 55        |
| 2.2 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y SÍNTESIS DE cDNA ..... | 56        |
| 2.3 DISEÑO DE CEBADORES.....                         | 57        |
| 2.4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....                     | 58        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.5 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR PCR TIEMPO REAL .....  | 59        |
| 2.6 AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DEL ORF DE <i>BoDXS2a</i> , <i>BoPSY1</i> Y <i>BoPSY2</i> ... 60               |           |
| 2.7 CONSTRUCCIONES DE VECTORES pET_ <i>BoDXS2a</i> , pET_ <i>BoPSY1</i> Y<br>pET_ <i>BoPSY2</i> .....      | 62        |
| 2.8 COMPLEMENTACIÓN DE COLOR.....  | 64        |
| 2.9 ANÁLISIS POR HPLC .....  | 65        |
| <b>CAPÍTULO III .....</b>  | <b>66</b> |
| <b>RESULTADOS. ....</b>  | <b>66</b> |
| 3.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y SÍNTESIS DE cDNA. ....   | 66        |
| 3.2 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR TIEMPO REAL. . 68  |           |
| 3.3 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....   | 70        |
| 3.4 AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DEL ORF DE <i>BoDXS2a</i> , <i>BoPSY1</i> Y <i>BoPSY2</i> ... 80               |           |
| 3.5 ELABORACIÓN DE LOS CONSTRUCTOS: pET_ <i>BODXS2a</i> , pET_ <i>BoPSY1</i> Y<br>pET_ <i>BOPSY2</i> ..... | 83        |
| 3.6 COMPLEMENTACIÓN DE COLOR.....  | 86        |
| <b>CAPITULO IV .....</b>   | <b>89</b> |
| <b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>  | <b>89</b> |
| <b>CAPITULO V .....</b>  | <b>92</b> |
| <b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>  | <b>92</b> |
| 5.1. CONCLUSIONES .....  | 92        |
| 5.2. PERSPECTIVAS .....  | 93        |

**BIBLIOGRAFIA..... 94**

## **ABREVIATURAS.**

**AACT:** Acetil-CoA tiolasa.

**ABA:** Ácido abscísico

**ATP:** Trifosfato de adenosina.

**BCH:**  $\beta$ -caroteno hidroxilasa.

**LCD:** Licopeno dioxigenasa.

**ALDH:** Aldehído deshidrogenasa

**BMT:** Norbixina metiltransferasa.

**Contig:** Segmentos de DNA superpuestos, que juntos representan una región consenso de DNA.

**CRTISO:** Carotenoide isomerasa.

**CMS:** 2- c-metil-D-eritrol-4-fosfato citidil transferasa.

**CMK:** 4-(histidina-5'-difosfato)-2-C-metil-D-eritrol Kinasa.

**CDP-ME:** 4-difosfocetidil-2-c metil-eritrol.

**CDP-MEP:** CDP-ME 2 fosfato.

**cDNA:** DNA de cadena complementaria.

**CCD:** Escisión de carotenoide dioxigenasa.

**CTP:** Trifosfato de citidina.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DMAPP:** Dimetilalil difosfato.

**DXP:** 1-Deoxi-D-xilulosa-5 fosfato.

**DXS:** 1-desoxi-D-xilulosa-5- fosfato sintasa.

**DXR:** DXP reductoisomerasa.

**ESTs:** Etiquetas de secuencia expresada.

**FPP:** Farnesil difosfato

**GPP:** Geranil difosfato.

**GGPP:** Geranilgeranil difosfato.

**G3P:** D-gliceraldehído-3 fosfato.

**HMG-CoA:**  $\beta$ -Hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA.

**HMGS:** HMG-CoA sintasa.

**HMGR:** HMG-CoA reductasa.

**HMBPP:** Hidroximetil butenil difosfato.

**HDS:** HMBPP sintasa.

**HDR:** HMBPP reductasa.

**IDI:** Isopentenil difosfato isomerasa.

**IPP:** Isopentenilo de pirofosfato.

**LCY $\beta$ :** Licopeno  $\beta$ - ciclasa.

**LCY $\epsilon$ :** Licopeno  $\epsilon$ -ciclasa.

**MEP:** 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato

**MEcPP:** CDP-ME 2-fosfato y 2-c-metil-D-eritritol 2,4 ciclodifosfato.

**MCS:** 2-C-metil-eritrol 2,4-ciclodifosfato sintasa.

**MCT:** CDP-ME transferasa.

**mRNA:** RNA mensajero

**MVA:** Mevalonato.

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.

**NSY:** Neoxantina sintasa.

**NCEDs:** 9-cis epoxicarotenoide dioxigenasas

**ORF:** Marco de lectura abierto

**PIF:** Factores de interacción con el fitocromo.

**PSY:** Fitoeno sintasa.

**PDS:** Fitoeno desaturasa.

**RNA:** Ácido ribonucleico.

**SABATH:** Metiltransferasa.

**SLs:** Estrigolactonas.

**UTR:** Regiones no traducidas de los mRNA.

**VDE:** Violaxantina de-epoxidasa.

**ZDS:**  $\zeta$  caroteno desaturasa.

**ZEP:** Zeaxantina epoxidasa.

**Z-ISO:**  $\zeta$ -caroteno isomerasa.

## ÍNDICE DE FIGURA

|  |    |
|--|----|
| Figura 1.1 Distribución de <i>Bixa orellana</i> a través de los continentes.....                                       | 15 |
| Figura 1. 2 Estructura vegetal de la familia <i>Bixaceae</i> . .....   | 17 |
| Figura 1. 3 Frutos y semillas de <i>Bixa orellana</i> .....  | 18 |
| Figura 1. 4 Haplotipos de <i>Bixa orellana</i> . .....   | 19 |
| Figura 1.5 Ruta mevalonato (MVA). .....  | 27 |
| Figura 1.6 Ruta 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP).....   | 32 |
| Figura 1. 7 Ruta de carotenoides del GGPP-licopeno.....  | 36 |
| Figura 1.8 Ruta de biosíntesis de carotenoides del licopeno-xantofilas.. .....   | 37 |
| Figura 1.9 Ruta de biosíntesis de isoprenoides plastidiales. ....  | 42 |
| Figura 1.10 Funciones de los apocarotenoides en las plantas. ....  | 44 |
| Figura 1.11 Modelo de la regulación génica y coordinación de las rutas implicadas en la biosíntesis de bixina.....     | 46 |
| Figura 1.12 Plásmido pACCRT-EIB.. .....  | 49 |
| Figura 1.13 Genes <i>crt</i> de <i>Erwina herbicola</i> .....  | 50 |
| Figura 1.14 Plásmido pACCAR25CrtB.....   | 50 |
| Figura 2.15 Plásmido de expresión pETDuet_1.....   | 62 |
| Figura 3.1 Muestras de RNA total. ....   | 66 |
| Figura 3.2 Muestras de cDNA. ....  | 67 |
| Figura 3.3 Cuantificación de la expresión de <i>BoDXS2a</i> , <i>BoPSY1</i> y <i>BoPSY2</i> por medio de RT-qPCR. .... | 69 |
| Figura 3.4 Alineamiento múltiple de las proteínas DXS.....   | 72 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 3.5 Alineamiento múltiple de las proteínas PSY.</b> .....   | 73 |
| <b>Figura 3.6 Análisis filogenético de las proteínas DXS</b> .....  | 76 |
| <b>Figura 3.7 Análisis filogenético de las proteínas PYS</b> .....  | 77 |
| <b>Figura 3.8 Estructura de BoDXS2a modelado por homología</b> .....  | 78 |
| <b>Figura 3.9 Estructura de BoPSY2 modelado por homología</b> .....   | 79 |
| <b>Figura 3.10 Amplificación del ORF de <i>BoDXS2a</i>, <i>BoPSY1</i> y <i>BoPSY2</i></b> .....                             | 80 |
| <b>Figura 3.11 Predicción de cortes por medio de enzimas de restricción sobre los constructos pGEM.</b> .....               | 81 |
| <b>Figura 3.12 Digestión de los constructos pGEM_BoDXS2a, pGEM_BoPSY1 y pGEM_BoPSY2 con enzimas de restricción.</b> .....   | 82 |
| <b>Figura 3.13 Liberación de los ORFs y linearización del plásmido pETDuet_1 por medio de enzimas de restricción.</b> ..... | 83 |
| <b>Figura 3.14 Predicción de cortes por medio de enzimas de restricción sobre los constructos pET.</b> .....                | 84 |
| <b>Figura 3.15 Constructos pET digeridos con enzimas de restricción.</b> .....  | 85 |
| <b>Figura 3.16 Análisis de la función de <i>BoDXS2a</i> por complementación de color.</b> .....                             | 86 |
| <b>Figura 3.17 Análisis de la función de <i>BoPSY1</i> y <i>BoPSY2</i> por complementación de color.</b> .....              | 87 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabla 1. 1. Clasificación de los isoprenoides. ....</b>                           | <b>23</b> |
| <b>Tabla 1. 2. Catálogo de plásmidos carotenogénicos. ....</b>                       | <b>48</b> |
| <b>Tabla 2.1. Etapas de maduración de las semillas.....</b>                          | <b>55</b> |
| <b>Tabla 2.2. Secuencia de cebadores RT y OR. ....</b>                               | <b>57</b> |
| <b>Tabla 3. 1. Valores de BoDXS2a y BoPSY2 encontrados a través de ProParam.....</b> | <b>70</b> |

## RESUMEN

*Bixa orellana* o “achiote” como es conocido en México es la fuente de bixina, el segundo colorante natural demandado por la industria alimentaria, cosmética y textil. La bixina es un apocarotenoide de 25C, que se sintetiza a partir del licopeno por medio de las siguientes enzimas: escisión de carotenoides dioxigenasa (BoCCD), aldehído deshidrogenasa (BoALDH) y metiltransferasa (BoSABATH). Adicionalmente, la ruta de bixina se coordina con la ruta MEP y de carotenoides para tener un flujo acoplado de los precursores del apocarotenoide. Asimismo se ha identificado que algunos pasos enzimáticos de las tres rutas mencionadas anteriormente, están a cargo de pequeñas familias de genes, donde los miembros parálogos se expresan en un tejido o etapa de desarrollo específico. La regulación de la ruta MEP por la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (*DXS*) y la regulación de la ruta de carotenoides por la fitoeno sintasa (*PSY*) incentivó a estudiar los genes *DXS* y *PSY* de *Bixa orellana*, los primeros estudios implicaron el análisis de los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2*. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar si los genes mencionados anteriormente, están involucrados en la síntesis de bixina. Los resultados señalaron que de los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* analizados en este estudio, únicamente los genes *BoDXS2a* y *BoPSY2* podrían estar involucrados en la síntesis de bixina. Sin embargo, la función de sus proteínas es escasa en bacterias.

## ABSTRACT

*Bixa orellana* or "achiote" as it is known in México is the source of bixina, the second natural colorant demanded by the food, cosmetic and textile industry. Bixin is an apocarotenoid of 25C, which is synthesized from lycopene by means of the following enzymes: carotenoid cleavage dioxygenase (*BoCCD*), aldehyde dehydrogenase (*BoALDH*) and methyltransferase (*BoSABATH*). Additionally, the bixin pathway is coordinated with the MEP and carotenoid pathways to have an unrestricted flow of the apocarotenoid precursors. It has also been identified that some enzymatic steps of the three routes mentioned above are in charge of small families of genes, where the paralog members are expressed in a specific tissue or stage of development. The regulation of the MEP pathway by 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (*DXS*) and the regulation of the carotenoid pathway by phytoene synthase (*PSY*) stimulated the study of the *DXS* and *PSY* genes of *Bixa orellana*, the first studies involved the analysis of the *BoDXS2a*, *BoPSY1* and *BoPSY2* genes. Therefore, the objective of this study was to determine if the genes mentioned above are involved in the synthesis of bixin. The results indicated that of the *BoDXS2a*, *BoPSY1* and *BoPSY2* genes analyzed in this study, only the *BoDXS2a* and *BoPSY2* genes could be involved in the synthesis of bixin. However, the function of their proteins is poor in bacteria.

## INTRODUCCIÓN

*Bixa orellana* o “achiote” como es conocido en México es un arbusto perenne de 3 a 5 metros de altura originario de la cuenca amazónica en Brasil y que se ha extendido por las regiones neotropicales (Moreira *et al.*, 2015). Según la variante, la planta produce frutos de diferentes formas, tamaños y colores (Trujillo-Hernández *et al.*, 2016). Dentro del fruto se encuentran de 30 a 60 semillas (Leal & Michelangeli, 2010), en el arilo de las semillas se localiza una mezcla de pigmentos de naturaleza isoprenoide, entre los que se encuentra en mayor proporción la bixina, un apocarotenoide de 25C procedente del licopeno (Jako *et al.*, 2002; Bouvier *et al.*, 2003; Rivera-Madrid *et al.*, 2006; Cardenas-Conejo *et al.*, 2015). La bixina es demandada por la industria alimentaria, cosmética y textil que la emplea como pigmento en la elaboración de sus productos con la plena regulación por parte de la FAO, la FDA y la secretaria de salud en México a través de la NOM -119-SSA1-1994 en la cual se reconoce como colorante orgánico natural de grado alimentario (Bastos, 1999; Franco, 2007).

Debido a la importancia, diferentes grupos de investigación se han dado a la tarea de abordar el estudio de la planta de achiote y trabajar en la elucidación de la biosíntesis de bixina, así como en la obtención de plantas con características deseables, todo esto encaminado al mejoramiento de propiedades de interés en la planta (Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la alimentación y la agricultura (SINAREFI) a través de la Red de Achiote). En el grupo de investigación de la Dra. Renata Rivera-Madrid hemos obtenido la secuencia *In silico* por medio de la elaboración del transcriptoma, de todos los genes de las rutas que están implicadas en la biosíntesis del pigmento: MEP, carotenoides y bixina. Con base en esta información se ha identificado que varias enzimas que forman parte de alguna de las en las tres rutas son codificadas por pequeñas familias de genes, posiblemente procedentes de mecanismos como la retroposición, el cruce desigual, las duplicaciones segmentarias o cromosómicas y la poliploidía (Zhang, 2003; Shoemaker *et al.*, 2006). En *Bixa orellana* se ha identificado que DXS, primera enzima de la ruta MEP es codificada por cuatro genes, y la PSY, primera enzima de la ruta de carotenoides es codificada por dos genes. Con el propósito de conocer el perfil de expresión de los genes que se consideran importantes en la biosíntesis de bixina, se realizó un análisis por RT-qPCR, que incluyó a los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* (Cárdenas-Conejo *et al.* 2015).

Por consiguiente este estudio se enfocó en continuar evaluando por medio de su expresión y la función de sus proteínas, si los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* están involucrados en la biosíntesis de bixina. Los resultados obtenidos en este estudio concluyeron que de los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* analizados, únicamente los genes *BoDXS2a* y *BoPSY2* están involucrados en la biosíntesis de bixina. Sin embargo, la función de sus proteínas es escasa en bacterias.

# CAPÍTULO I

## ANTECEDENTES

### 1.1 BIXA ORELLANA

#### 1.1.1 HISTORIA

*Bija* palabra de origen indo-antillana es como era conocida la planta de *Bixa orellana* por los indígenas nativos de América, en México la planta era conocida como achote o achiote palabra de origen náhuatl que significa grano o semilla y que actualmente se sigue manteniendo (Leal & Michelangeli, 2010).

La primera referencia que se tiene sobre el achiote y el uso de sus semillas como pigmento data desde la llegada de Cristóbal Colón a la isla de San Salvador el 12 de octubre de 1492, cuando describió a los nativos que salieron a su encuentro; “De ellos se pintan de prieto, y ellos son de la color de los canarios ni negros ni blancos, y de ellos se pintan de blanco, y de ellos de colorado, y de ellos de lo que hallan, y de ellos se pintan las caras, y de ellos todo el cuerpo, y de ellos solos los ojos, y de ellos sólo la nariz” (Leal & Michelangeli, 2010).

Después de Cristóbal Colón, varios viajeros de Europa (Vaz de Caminha, Gonzalo Fernández de Oviedo, López de Gómara) que llegaban al viejo mundo, describían que los nativos les traían unos frutos en forma de capullos que se parecían al algodón, excepto que por fuera tienen un vello grosezuelo, y que contenían unas semillas que desprendían un color rojo, y cuando éstas eran humedecidas más color se producía. Estas semillas eran utilizadas por los nativos de América para teñir sus caras y sus cuerpos. Los hombres de las tribus se pintaban el rostro con *bija* y *Jagua* (*Genipa americana*) a la hora de presentarse en campos de batalla o en guerras, esto les hacía dar una apariencia feroz delante de sus enemigos. Por otro lado, las mujeres se pintaban el rostro con *bija* en sus fiestas y areitos o bailes. En México la civilización azteca utilizaba el achiote para preparar la bebida del chocolate azteca (Leal & Michelangeli, 2010; FOOD-INFO, 2014).

Del mismo modo Gonzalo Fernández de Oviedo menciona en aquella época que la planta de achiote no solo se localizaba en “La Española” (primer lugar de América donde llegó Colón) si no en todas las islas del nuevo mundo. A mediados del siglo XVI varios navíos transportaban granos y semillas incluidos de achiote desde el nuevo mundo a Europa, fue

por este acontecimiento que se creó que la planta de achiote fue llegando a otros continentes (**Figura 1.1**) y gracias a su alta capacidad de sobrevivir a diferentes condiciones ambientales se extendió en varios lugares sobre todo donde los climas son tropicales y subtropicales (Leal & Michelangeli, 2010).



**Figura 1.1** Distribución de *Bixa orellana* a través de los continentes.

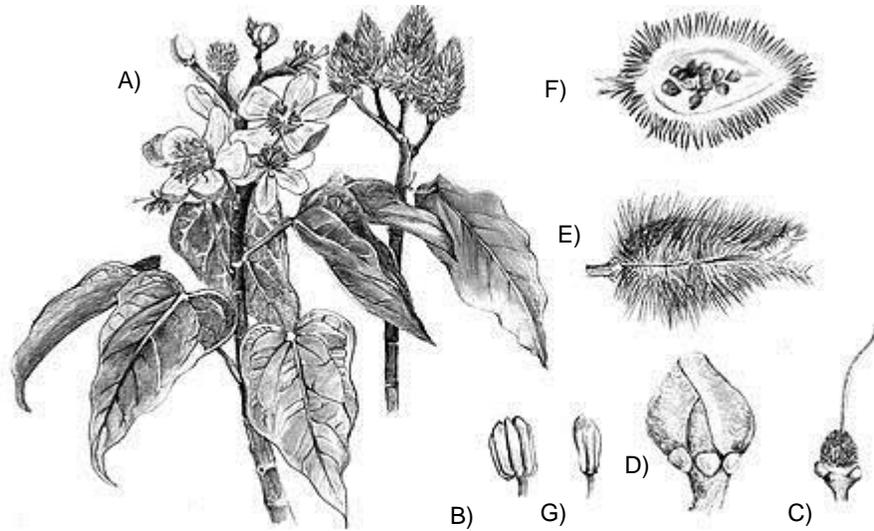
### 1.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Según Leal y Michelangeli (2010) el achiote pertenece a la clase de las *Magnoliopsidas*, sub-clase *Dilleniidae*, orden *Violales*, familia *Bixaceae*, género *Bixa*, especie *Bixa orellana*. Sin embargo, en nuestro grupo de trabajo, un análisis filogenético utilizando 13 proteínas codificadas por genes de una sola copia que se localizan en la mayoría de plantas, agrupo al achiote en el orden de las *Malvales* donde presentó una estrecha relación con *Gossypium raimondii* y *Theobroma Cacao* indicando que el achiote pertenece a este orden (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015).

Además de la especie *B. orellana*, otras especies no cultivables como *B. urucurana*, *B. platycarpa*, *B. arbórea* y *B. excelsa* se presentan en el género *Bixa*. Recientemente se demostró que la especie cultivable fue domesticada a partir de la especie no cultivable, *B. urucurana*, esto a través de la información biológica, arqueológica y etnográfica del género, integrado a las observaciones etnobotánicas sobre poblaciones cultivables (Moreira *et al.*, 2015).

La planta de *Bixa orellana* es un pequeño árbol o arbusto que mide de 3 a 5 metros de altura, con raíz pivotante y larga; tallo corto de 20 a 30 cm de diámetro de color gris cenizo con lenticelas en filas verticales; ramas de diferentes diámetros de color marrón cenizo las cuales exudan un mucílago cuando hay heridas; la madera es blanca y suave. Las hojas son alternas enteras en forma a corazonada, haz membranoso de color verde oscuro, envés algo plateado, de 10 a 25 cm de largo y de 10 a 20 cm de ancho. Las flores son de 5 pétalos, hermafroditas, regulares, bisexuales y actinomorfas con colores que van desde el blanco al rosa intenso. Los frutos son de tipo cápsulas con forma ovoide a esferoidal, de unos 30-50 mm de largo y 25-40 mm de ancho, con espinas duras y colores que van desde el verde al rojo intenso, aunque en la etapa madura todos se tornan de color marrón (Leal & Michelangeli, 2010) (**Figura 1.2**).

Dentro del fruto se encuentra un total de 30 a 60 semillas, de 0.3 a 0.5 de longitud y de 0.2 a 0.3 cm de diámetro, con formas que van desde piramidal a casi cónica.



**Figura 1. 2 Estructura vegetal de la familia *Bixaceae*.** A: Hojas y flores; B: Botón floral; C: Antera; D: Pistilo; E: Fruto; F: Fruto con corte longitudinal radial; G: Vista frontal de una semilla (Leal & Michelangeli, 2010).

Las semillas se consideran como la parte más importante de la planta, ya que en el arilo de éstas, se acumula una mezcla de pigmentos de origen carotenoide y apocarotenoide (**Figura 1.3**), donde la molécula de bixina representa un 80% de la mezcla (Leal & Michelangeli, 2010; Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Sin embargo, dependiendo de la variante y las condiciones climáticas de la región el contenido de bixina puede variar (Franco *et al.*, 2008).



**Figura 1. 3 Frutos y semillas de *Bixa orellana*.**

Por otro lado Trujillo-Hernandez *et al.*, 2016 continuando con los trabajos sobre caracterización de la variación alélicas en genes de la ruta de carotenoides en achiote, indentifica tres haplotipos que presentan relacion entre su morfología y su contenido de bixina (**Figura 1.4**). Así, en el haplotipo A, se colocaron las plantas que presentan flores blancas y frutos verdes, en el haplotipo B, las que presentan flores rosa y frutos verdes con espinas rojas y por último en haplotipo C, las de flores rosas con frutos rojos, teniendo las del haplotipo B, el mayor contenido de bixina (16.90-20,56 mg/g en PS) en comparación con los haplotipos A (8,76-10,76 mg/g) y C (6,25-12,67 mg/g).

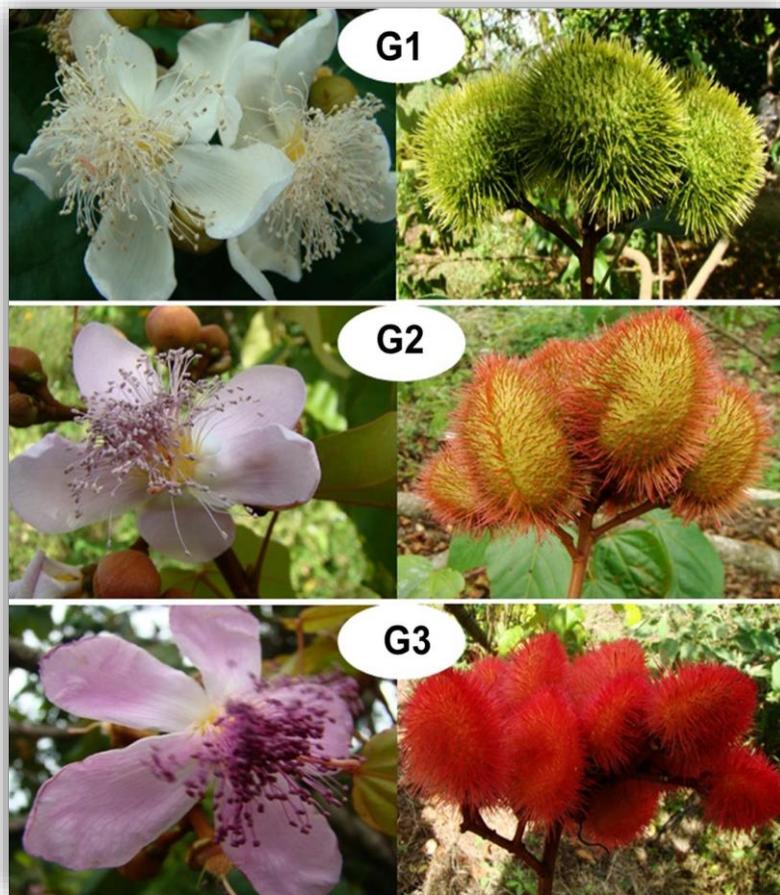


Figura 1. 4 Haplotipos de *Bixa orellana*.

### **1.1.3 USOS**

Antes de la llegada de los españoles, los indígenas nativos de América utilizaban la planta de achiote principalmente para obtener el colorante de sus semillas que les servía para teñir sus cuerpos con propósitos decorativos, para repeler insectos, en ritos religiosos, para hacer guerra a sus enemigos y para teñir sus vestiduras y alfarerías, esta última a través de técnicas artesanales que aún se mantienen en poblaciones indígenas (Leal & Michelangeli, 2010) .

El uso del pigmento bixina en la industria ha pasado por dos etapas. A principios de su descubrimiento por los europeos estos la empezaron a emplear en la industria de los alimentos para brindar color a las mantequillas, quesos, sopas, entre otros alimentos, así como en la industria textil como colorante de telas y en la elaboración de barnices. Sin embargo, a finales del siglo XIX la síntesis rentable de colorantes sintéticos desplazó a los colorantes naturales del mercado, entre ellos a la bixina. A finales de la segunda guerra mundial la relación de los colorantes sintéticos con efectos toxicológicos y cancerígenos hizo que se prohíban sus usos, es así como nuevamente los colorantes naturales se posicionaron en el mercado (Leal & Michelangeli, 2010). Además del empleo de las semillas como fuente de colorante, otros tejidos de la planta eran utilizados por los nativos de América en su medicina tradicional, conocimiento que se mantuvo por generaciones hasta los tiempos actuales (Côrrea, 1978; Leal & Michelangeli, 2010).

## 1.2 ISOPRENOIDES

### 1.2.1 GENERALIDADES

Los isoprenoides constituyen la familia de moléculas más abundantes en la naturaleza y son importantes para la mayoría de seres vivos. Actualmente se han identificado más de 80, 000 isoprenoides siendo el reino vegetal el que más variedad de estas moléculas presenta y donde forman parte del metabolismo secundario en su mayoría, en consecuencia de esto, ciertos tipos de isoprenoides están acotados a familias e incluso especies de plantas (Bouvier *et al.*, 2005; Christianson, 2017).

Los isoprenoides cumplen varias funciones dentro el metabolismo primario y secundario de las plantas. En el metabolismo primario estos participan: (I) en el proceso de conversión de la energía lumínica en energía química, (II) en la ampliación del rango de absorción de luz solar, (III) en la protección del aparato fotosintético frente al daño fotooxidativo (Malking y Niyogi, 2000; Pulido *et al.*, 2012), formando parte de la membrana celular, (IV) en el proceso de respiración y además las fitohormonas vegetales como el ácido abscísico y las giberelinas proceden de manera parcial o completa de isoprenoides, por lo que se puede decir que los isoprenoides participan en el proceso de regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, así como en la generación de respuesta a señales externas (Santner *et al.*, 2009).

En el metabolismo secundario, los isoprenoides más simples en su mayoría volátiles, son utilizados por las plantas; (I) como moléculas para repeler herbívoros o atraer a sus depredadores como medio indirecto de defensa, (I) para la comunicación entre ellas y para brindar olores agradables a los órganos reproductivos con en el fin de atraer a organismos polinizadores (Dudareva *et al.*, 2006; Bramley *et al.*, 2015). Algunos isoprenoides de cadena larga además de cumplir funciones en el metabolismo primario, cumplen funciones en el metabolismo secundario. Por ejemplo; los carotenoides dentro del metabolismo secundario son utilizados para brindar colores llamativos a flores y frutos y en el metabolismo primario sirven como recolectores de luz solar y moléculas protectoras del aparato fotosintético.

Actualmente las industrias tienen interés sobre los isoprenoides ya que muchos de ellos son utilizados como fármacos, aromas, fragancias, pigmentos, agroquímicos y desinfectantes (Bohlman y Keeling, 2008). Como por ejemplo la bixina, el pigmento que se acumula en el arilo de las semillas de achiote y que tiene múltiples aplicaciones como

colorante. El papel que juegan los isoprenoides en las plantas y sus aplicaciones industriales hace llamativa la investigación sobre la elucidación de sus síntesis.

### 1.2.2 CLASIFICACIÓN

A pesar de la gran diversidad de isoprenoides todos derivan de la molécula de 5 carbonos, pirofosfato de isopentenilo (**IPP**) que debido a su similitud con la molécula no fosforilada también se le conoce a este IPP como isopreno. La primera reacción para la formación de isoprenoides de más de 5 carbonos es la condensación de moléculas de IPP sobre su isómero alílico el dimetilalil difosfato (**DMAPP**), éstas reacciones son catalizadas por prenil transferasas (McGarvey y Croteau, 1995).

La primera clase de isoprenoides con una unidad de isopreno en donde no ocurre la reacción descrita anteriormente, se conocen como hemiterpenos (5C) y tienen como esqueleto base al IPP. Los isoprenoides resultantes de la condensación de una molécula de IPP sobre su isómero DMAPP se conocen como monoterpenos (10C) y tienen como esqueleto base al geranil difosfato (**GPP**). Los resultantes de la condensación de 2 IPP sobre el mismo isómero, se conocen como sesquiterpenos (15C) y tienen como esqueleto base al farnesil difosfato (**FPP**) y por último los resultantes de la condensación de 3 IPP sobre el DMAPP se conocen como diterpenos (20C) y tienen como esqueleto base al geranilgeranil difosfato (**GGPP**).

Los isoprenoides de cadena más larga son formados a través de reacciones de condensación de los esqueletos bases. La condensación de dos moléculas de FPP va a resultar en la formación de los isoprenoides de 30C que tiene como esqueleto base al escualeno y la condensación de dos moléculas de GGPP va a resultar la formación de los isoprenoides de 40C que tienen como esqueleto base al fitoeno (**tabla 1.1**), primer

carotenoide incoloro en donde la enzima que participa en esta reacción de condensación (fitoeno sintasa), es tema de estudio en este trabajo (McGarvey y Croteau, 1995).

**Tabla 1.1 Clasificación de los isoprenoides.** Las abreviaturas corresponden a las definiciones dadas al inicio de la tesis. Ruiz-Sola (2014).

| Átomos de C | Denominación   | Esqueleto base | Compuestos  |
|-------------|----------------|----------------|---|
| C5          | Hemiterpenos   | IPP            | Isopreno, citoquininas, isopentenil-ARNt  |
| C10         | Monoterpenos   | GPP            | Aceites esenciales, esencias volátiles  |
| C15         | Sesquiterpenos | FPP            | Fitoalexinas, piretrinas, fracción isoprenoide de proteínas preniladas                                    |
| C20         | Diterpenos     | GGPP           | Giberelinas, resinas, fracción isoprenoide de proteínas preniladas, clorofilas, tocoferoles y filoquinona |
| C25         | Sesterpenos    | GFPP           | Ceras   |
| C30         | Triterpenos    | Escualeno      | Fitoesteroles, brasinosteroides, saponinas, triterpenos pentacíclicos                                     |
| C40         | Tetraterpenos  | Fitoeno        | Carotenoides, ABA, estrigolactonas  |
| >C45        | Politerpenos   | GGPP           | Caucho, látex, dolicol, fracción isoprenoide de plastoquinona y ubiquinona                                |

**Tabla 1. 1. Clasificación de los isoprenoides.** Las abreviaturas corresponden a las definiciones dadas al inicio de la tesis. Tabla tomada de la tesis doctoral de Ruiz-Sola, 2014

### 1.2.3 BIOSÍNTESIS DE IPP Y DMAP.

Como se mencionó anteriormente todos los isoprenoides son sintetizados a partir del pirofosfato de isopentenilo (Hunter, 2007). Existen dos rutas para la síntesis de IPP; (I) la ruta del mevalonato (**MVA**) que se especula que es propia de organismo eucariotas y arqueas por donde se sintetiza únicamente moléculas de IPP (Kuzuyama, 2002; Boucher *et al.*, 2004) que se condensan para generar los precursores que acabaran dando lugar a los esteroides, brassinosteroides, sesquiterpenos, triterpenos y la ubiquinona mitocondrial (Pulido *et al.*, 2012) y (II) la ruta 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (**MEP**) localizada en eubacterias y plastos que además del IPP sintetiza su isómero alílico el DMAPP en una relación 5:1 (Lange *et al.*, 2000; Rohdich *et al.*, 2002). A través de esta ruta se sintetizan los monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos.

Existen excepciones a esta regla, por ejemplo: una clase de bacterias gram positivas sintetizan IPP a través de la ruta MVA y los apicoplexas una clase de protozoos que poseen un orgánulo llamado apicoplasto (derivado de un ancestro fotosintético) en el cual se localiza la vía MEP y a través de ella estos organismos sintetizan el IPP (Lange *et al.*, 2000).

Los organismos eucariotas fotosintéticos como las plantas y las algas verdes tienen la peculiaridad de usar ambas rutas, la MVA y la MEP. En base a la teoría endosimbiótica se considera que los actuales eucariotas fotosintéticos obtuvieron la vía MEP a partir de bacterias fotosintéticas que al ser incorporadas por las células vegetales ancestrales, dieron lugar a los actuales plastidios (Lange *et al.*, 2000).

#### 1.2.4 LA RUTA DEL MEVALONATO (MVA)

La ruta MVA fue identificada en los años 50s a través de las primeras aplicaciones de marcaje isotópico (McGarvey y Croteau, 1995), de manera general se considera que la ruta se localiza en el citoplasma y en el retículo endoplasmático (Newman y Chappell, 1999). Sin embargo, estudios recientes han identificado enzimas pertenecientes a la ruta en otros compartimientos como peroxisomas y en pequeñas vesículas lo que nos hace pensar que quizás la ruta MVA está fragmentada en estos compartimientos (Carrie *et al.*, 2007).

En la vía MVA se generan los precursores que acabaran dando lugar a los esteroides, brasinosteroides, sesquiterpenos, triterpenos y la ubiquinona mitocondrial (Pulido *et al.*, 2012).

El primer paso de esta ruta consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA en una reacción mediada por la enzima acetil-CoA tiasa (**AACT**). El segundo paso consiste en la condensación de una nueva molécula de acetil-CoA con el acetoacetil-CoA para así formar el  $\beta$ -Hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA, reacción catalizada por la enzima HMG-CoA sintasa (**HMGS**). A continuación el HMG-CoA es reducido liberando CoA, en este paso el **NADPH** sirve como agente reductor para así formar el mevalonato (molécula que le da el nombre a la ruta) en una reacción catalizada por la enzima HMG-CoA reductasa (**HMGR**). Inmediatamente el mevalonato sufre dos reacciones de fosforilación en el carbono 5 para dar en primer lugar 5-fosfomevalonato y a partir de este el 5-pirofosfomevalonato, reacciones mediadas por la enzima mevalonato quinasa y mevalonato fosfato quinasa respectivamente, en las dos fosforilaciones el **ATP** es el dador del grupo fosfato. El último paso de la ruta consiste en la descarboxilación de 5-pirofosfomevalonato para dar el pirofosfato de isopentenilo (IPP) reacción catalizada por la pirofosfomevalonato descarboxilasa, actuando una molécula ATP como dador de energía para la reacción. La ruta incorpora un último paso enzimático que es la conversión de IPP es su isómero alílico el DMAP, esta reacción es catalizada por la enzima isopentenil difosfato isomerasa (**IDI**) (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2012) (**Figura 1.5**).

Con respecto a la regulación de la ruta el paso catalizado por la enzima HMGR ha sido ampliamente descrito como la principal etapa limitante del flujo de la vía MVA. Se ha observado un aumento de la actividad de esta enzima en varios tejidos y etapas de maduración en donde existe una acumulación de esteroides, así como también la sobre

expresión de HMGR en sistemas homólogos y heterólogo ha llevado a la acumulación de estos metabolitos (Harker *et al.*, 2003; Manzano *et al.*, 2004).

Se ha propuesto que la regulación transcripcional es el principal responsable en los cambios de la actividad de HMGR y que la regulación a nivel pos-transcripcional produce un ajuste más fino y rápido sobre la actividad de la enzima por ejemplo: la retro-regulación que presenta HMGR es consecuencia de su sustrato o producto de reacción, así también se ha observado que la fosforilación de la enzima HMGR1 de *Arabidopsis thaliana* en su residuo ser577 por la cinasa SnRK1 de coliflor y espinaca produce su activación completa (Dale *et al.*, 1995; Sugden *et al.*, 1999). Por último, también se han realizado estudios en donde la actividad de HMGR puede estar regulada por la proteólisis dependiente de luz (Korth *et al.*, 2000).

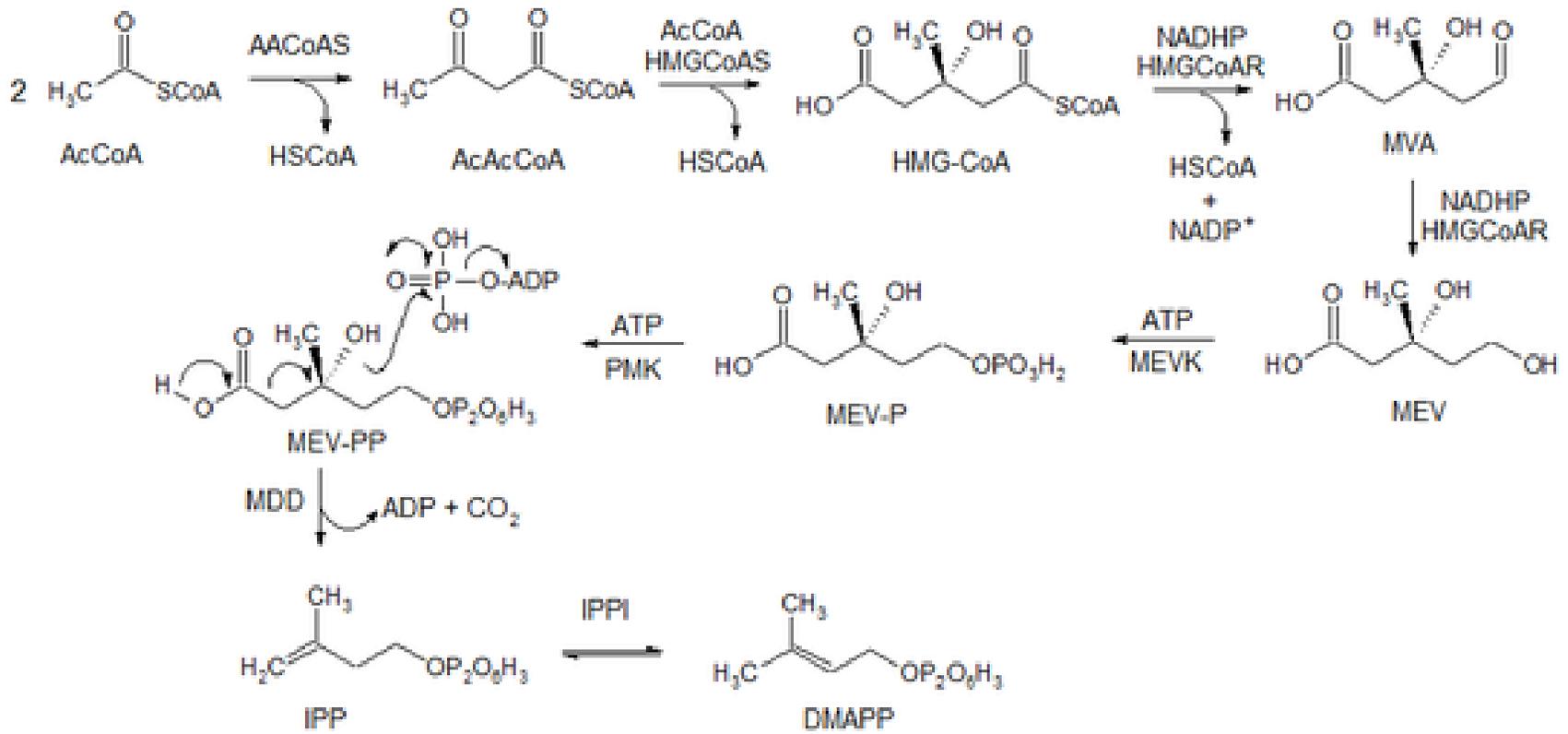


Figura 1.5 Ruta mevalonato (MVA).

### 1.2.5 LA RUTA 2-C-METIL-D-ERITRITOL-4-FOSFATO (MEP).

Después del descubrimiento de la ruta MVA en levaduras y animales se propuso que ésta era la ruta en todos los organismos por donde se sintetizaban las moléculas de IPP (McGarvey y Croteau, 1995). Sin embargo, estudios sobre la biosíntesis de isoprenoides en bacterias y plantas pronto mostraron inconsistencias.

Muchos grupos de investigación se habían percatado de la posible existencia de una ruta alterna al MVA para la síntesis de IPP, pero en 1993 Rohmer y colaboradores usando precursores etiquetados para estudiar la biosíntesis de los isoprenoides y los hopanoides bacterianos, observaron patrones de etiquetado que sugirieron la adición de una unidad de C2 derivada de piruvato por descarboxilación a un fosfato trisódico C3 (o un derivado) en una reacción de tipo transcetolasa. Más tarde el gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y el piruvato se identificarían como precursores directos del IPP mediante experimentos de marcaje con mutantes de *E. coli* defectuosas en enzimas del metabolismo de las triosas fosfato. El profesor Rohmer, fue el primero en publicar sus trabajos en revistas arbitradas por lo que se le reconoce como el descubridor de esta nueva ruta (Rohmer *et al.*, 1993; Rohmer *et al.*, 1996; Rohmer *et al.*, 1999).

Más tarde las investigaciones se centraron en elucidar la ruta MEP en las plantas superiores. Así en los tejidos verdes de tres plantas se demostró que se formaban todos los isoprenoides ( $\beta$ -caroteno, cadenas fitolíticas de clorofila y cadena nona-prenil de plastoquinona-9) a través de la vía MEP, mientras que los esteroides citoplásmicos se forman a través de la vía MVA concluyendo la existencia de éstas dos vías para la biosíntesis de IPP en plantas superiores (Lichtenthaler *et al.*, 1997; Lichtenthaler, 1999).

La biosíntesis del IPP en la ruta MEP inicia con la producción de la pentosa 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (**DXP**), a partir de la condensación del D-gliceraldehído-3 fosfato (G3P) con el producto de la descarboxilación del piruvato, el hidroximetil tiamina, esta primera reacción es catalizada por la enzima DXP sintasa (**DXS**) codificada por el gen con el mismo nombre. En la segunda reacción de la ruta, la enzima DXP reductoisomerasa (**DXR**) cataliza en dos pasos la formación de 2-c metil-eritrol-4 fosfato (**MEP**) a partir de DXP, ocurriendo primero una isomerización seguida de una reducción empleando a la molécula de NADH como agente reductor. Dado que el MEP es el precursor de las vitaminas B1 (tiamina), B6 (piridoxal) y además es el primer intermediario comprometido de la ruta, se ha nombrado a

la ruta con este mismo nombre (**ruta MEP**) siguiendo la nomenclatura utilizada en la ruta MVA. En la siguiente reacción a partir del MEP se forma el 2-c-metil-D-eritrol 2,4-ciclodifosfato (**MEcPP**) en tres pasos enzimáticos. Primero el MEP se transforma en 4-difosfocetidil-2-c metil-eritrol (**CDP-ME**) en una reacción dependiente de **CTP** catalizada por la enzima 2- c-metil-D-eritrol-4-fosfato citidil transferasa (**MCT**). El grupo hidroxilo del C2 del CDP-ME se fosforila a continuación en una reacción dependiente de ATP catalizada por la enzima 4-(histidina-5'-difosfato)-2-C-metil-D-eritrol cinasa (**CMK**) para dar CDP-ME 2-fosfato (**CDP-MEP**) que inmediatamente es transformada a MEcPP por la enzima 2-C-metil-eritrol 2,4-ciclodifosfato sintasa (MDS). Por último, dos reacciones de reducción convierten el MEcPP en una mezcla de IPP y DMAP. En la primera reacción el MEcPP se reduce a E)-4-hidroxi-3 metilbut-2-enil difosfato (**HMBPP**) por la enzima HMBPP sintasa (**HDS**) y por último en una reacción catalizada por la enzima HMBPP reductasa (**HDR**) el HMBPP es reducido produciendo una mezcla de IPP y DMAP (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2012) (**Figura 1.6**).

#### **1.2.6 1-DESOXI-D-XILULOXA-5-FOSFATO SINTASA (DXS).**

DXS fue identificada a través de su mecanismo de reacción, un mecanismo bien documentado para la actividad secundaria de las enzimas transcetolasas dependiente de difenato de tiamina, con esta información sumado a la disponibilidad del genoma completo de *E. coli* se realizó una búsqueda dentro del genoma con el propósito de identificar secuencias conservadas en las transcetolasas. Así se identificó un gen bacteriano que codificaba un producto con homología a las transcetolasas y producía únicamente DXP a partir de piruvato y G3P, moléculas conocidas por ser precursores del IPP, confirmando que este gen codificaba una enzima DXS (Sprenger *et al.*, 1997; Lois *et al.*, 1998). Más tarde DXS fue identificada en otras bacterias y plantas, pero no se reportó su presencia en animales y levaduras. En el modelo de plantas más estudiado *Arabidopsis thaliana* se encontró un gen homólogo a DXS de bacteria y se nombró previamente como CLA1, este codificaba una proteína que se dirigía al plastidio con función desconocida y que su disrupción ocasionaba un fenotipo albino (Mandel *et al.*, 1996; Araki *et al.*, 2000; Estévez *et al.*, 2000). Más tarde en una biblioteca de cDNA realizada a partir de células secretoras de glándulas sebáceas de *Mentha piperita* especializadas en la síntesis de monoterpenos y por lo tanto una buena fuente para encontrar genes implicados en la biosíntesis de isoprenoides, se identificó un gen que codificaba un producto DXS que tenía más similitud

con la CLA1 de *Arabidopsis* que con la DXS bacteriana (Mandel *et al.*, 1996; Lange *et al.*, 1998).

Actualmente en plantas se han reportado que la enzima DXS esta codificada por una pequeña familia génica (Grassi *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2013), esta enzima junto con la HDR parecen ser las únicas de la ruta que presentan isoformas (Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009).

En *Arabidopsis* por ejemplo: dos proteínas adicionales DXS se han identificado a través de secuencias genómicas y **ESTs** (etiquetas de secuencias expresadas) los cuales se han nombrado tentativamente DXS2 y DXS3 (Estévez *et al.*, 2000). Se sabe que cuando la misma enzima es codificada por genes duplicados, las nuevas isoformas presentan subfuncionalidad acotándose a expresar en ciertos tejidos o en diferentes etapas de desarrollo del organismo (Veita *et al.*, 2008), el fenómeno anterior ha sido observado en *Arabidopsis* donde la mayoría de ESTs realizados en diferentes condiciones se localiza la enzima DXS1, pero las isoformas DX2 y DXS3 solo se presentan en ciertas condiciones (Estévez *et al.*, 2000).

En *Cucumis melo* y *Daucus carota* se han identificado 4 isoformas de DXS, nombradas como DXS1, DX2a, DXS2b, y DSX3 (Saladié *et al.*, 2014; Simpson *et al.*, 2016). En base a los análisis de estas isoformas se ha establecido clados para las DXS de plantas (Walter *et al.*, 2002), esta distinción se basa en el análisis filogenético, la caracterización bioquímica y los patrones de expresión génica y se ha observado en angiospermas y gimnospermas (Kim *et al.*, 2006a; Phillips *et al.*, 2007; Vallabhaneni y Wurtzel, 2009; Córdoba *et al.*, 2011). Las DXS de tipo I se expresan constitutivamente en tejidos verdes fotosintéticos, las DXS de tipo II suelen estar especializadas en la producción de isoprenoides secundarios (Walter *et al.*, 2002) y por último las DXS de tipo III aunque están presentes en varios genomas de plantas, su actividad no está del todo claro (Vallabhaneni y Wurtzel, 2009).

Con respecto a la funcionalidad de las DXS, un trabajo con *Arabidopsis* ha demostrado que la expresión génica no puede por sí solo explicar la funcionalidad del gen, como ocurre con la DXS3 de esta planta que presenta expresión génica pero carece de funcionalidad enzimática, situación similar que ocurre en la misma isoforma de DXS en *Cucumis melo* (Estévez *et al.*, 2000; Saladié *et al.*, 2014).

Son varios los factores que pueden afectar la funcionalidad de un gen, entre ellos se encuentra; disrupciones y mutaciones no silenciosas que afectan en regiones estructurales o en el sitio catalítico de la enzima codificada. Por ejemplo; en plantas, las enzimas que participan en la ruta MEP presentan un extremo N-terminal que los dirige a plastidios, a pesar que la DXS3 de *Arabidopsis* presenta según el programa ChloroP el extremo-N terminal, esta isoforma tiene un tamaño menor y no contiene el residuo conservado de Histidina esencial para la actividad DXS, siendo esto quizás la causa de su nula funcionalidad (Lois *et al.*, 1998; Querol *et al.*, 2001).

En *Bixa orellana* se han identificado *In silico*, 4 genes que codifican enzimas DXS las cuales se han nombrado *BoDSX1*, *BoDXS2a*, *BoDXS2b* y *BoDXS3* (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015). Estos resultados coinciden con la cantidad de isoformas que se originan a partir de la transcripción y traducción de este gen en *Cucumis melo L* y *Daucus carota*, aunque en *Bixa orellana* no se ha reportado otra enzima de la ruta MEP codificada por pequeñas familia de genes (Saladié *et al.*, 2014; Simpson *et al.*, 2016). Con respecto a la regulación de la vía MEP el paso controlado por la enzima DXS ha sido identificado como el regulador principal de la ruta (Wright *et al.*, 2014) y a pesar que DXR ha mostrado signos de regulación, su rol es más específico comparado con DSX (Simpson *et al.*, 2016).

Por otro lado, la sobreexpresión de *DXS* en diferentes plantas típicamente da lugar a un aumento en los niveles de isoprenoides plastídicos tales como carotenoides y clorofilas (Estevez *et al.*, 2001, Enfissi *et al.*, 2005, Carretero-Paulet *et al.*, 2006, Morris *et al.*, 2006, Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2009, Henriquez *et al.*, 2016). Además de regular la ruta MEP, en *Arabidopsis thaliana* y en *Solanum lycopersicum*, la *DXS* se ha visto relacionada con el aumento de la actividad de la enzima fitoeno sintasa (PSY), enzima que participa en el primer paso de la ruta de biosíntesis de carotenoides (Lois *et al.*, 2000; Enfissi *et al.*, 2005; Carretero-Paulet *et al.*, 2006; Lois *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2006). Lo anterior se justifica ya que los pasos catalizados por las enzimas DXS y PSY representan nodos reguladores que coordinan la ruta MEP y la ruta de carotenoides para asegurar el suministro adecuado de IPP para la biosíntesis de carotenoides cuando sea necesario (Simpson *et al.*, 2016).

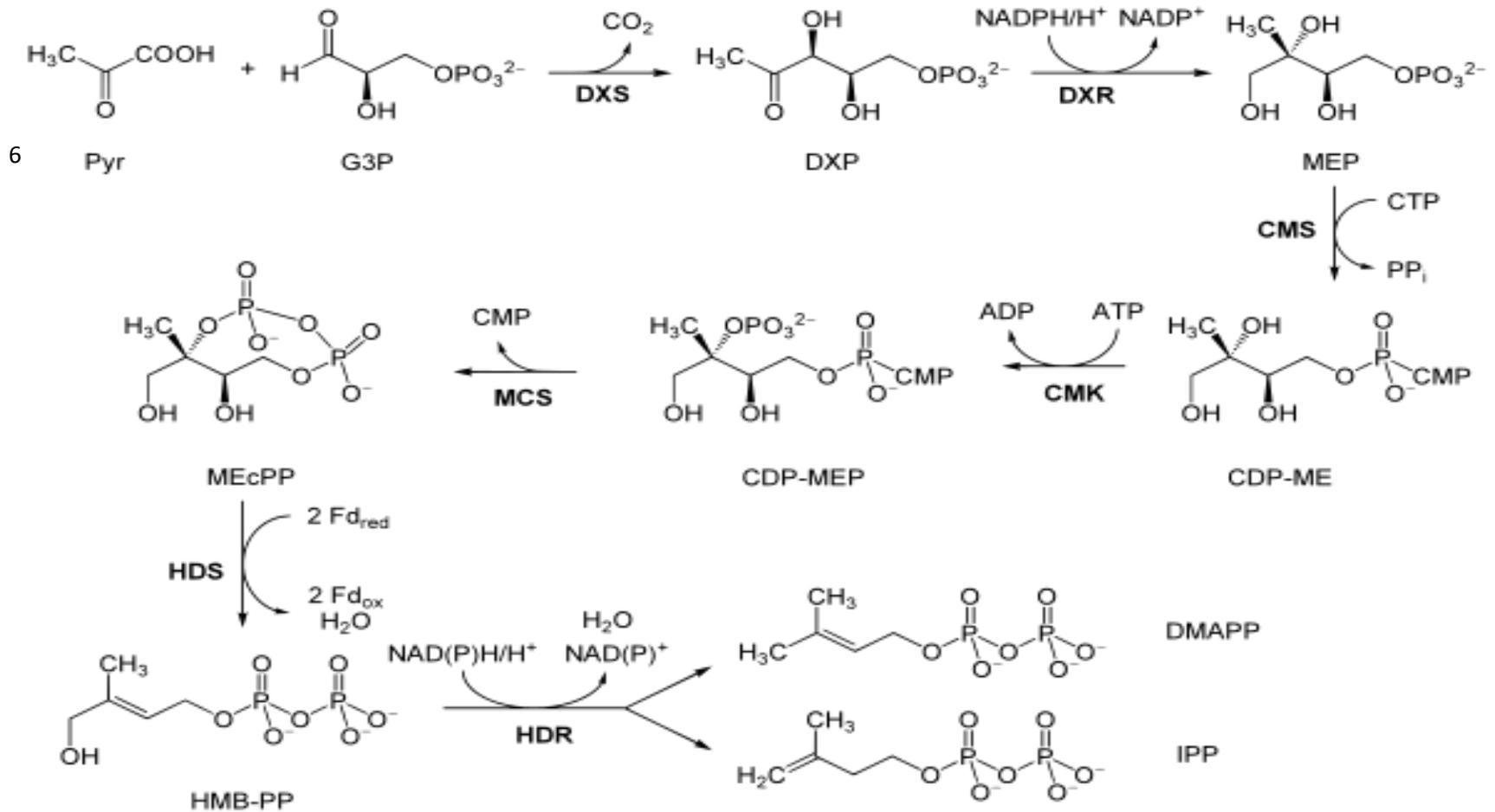


Figura 1.6 Ruta 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP).

## **1.3 CAROTENOIDES.**

### **1.3.1 GENERALIDADES.**

Los carotenoides son una clase de isoprenoides plastídicos que se clasifican en tetraterpenos (moléculas de 40C) caracterizados en 1907. Adquieren su nombre de la molécula más representativa del grupo, el  $\beta$ -caroteno, que fue descubierto en zanahorias (*Daucus carota*) por Wackenroder en 1831. Los carotenoides se encuentran en mayor concentración y variedad en los vegetales, aunque también se acumulan en bacterias, algas, hongos y en algunos animales, si bien estos últimos no pueden sintetizar carotenoides los adquieren a través de su dieta siendo los responsables de la coloración de aves, peces e invertebrados (Moran & Jarvik, 2010). En la dieta humana estos compuestos presentan propiedades beneficiosas para la salud lo que les ha conferido una relevancia detectable como nutraceuticos o como complemento alimentario (Chen, McClements, & Decker, 2013). Aparte de sus aplicaciones farmacéuticas, muchos carotenoides se utilizan como fuente natural de pigmentos para la industria (Leal & Michelangeli, 2010).

En las plantas los carotenoides colorean semillas, flores y frutos actuando de señales visibles para los animales que contribuyen a la polinización y dispersión de semillas (Grotewold, 2006). En estos organismos los carotenoides se sintetizan y se acumulan en plastos especializados en su almacenamiento denominados cromoplastos, los cuales pueden albergar en mayor proporción una sola clase de carotenoides (Deruère et al., 1994), el resto de plastos también alberga la capacidad de síntesis de estos compuestos y los almacena en menor proporción y en base a una relación entre ellos. Por ejemplo, en los cloroplastos la biosíntesis de carotenoides es elevada, pero en los cromoplastos, el perfil no varía entre diferentes especies vegetales (45% de luteína, un 25-30% de  $\beta$ - caroteno y un 10-15% de las  $\beta$ ,  $\beta$ -xantofilas violaxantina y neoxantina (Bartley & Scolnik, 1995). Además, en estos plastos los carotenoides se asocian con las clorofilas y las proteínas que forman los complejos fotosintéticos en las membranas tilacoidales donde colaboran con la captación de la luz y desempeñan un papel fundamental en la protección del aparato fotosintético (Demmig-Adams & Adams, 1996).

### 1.3.2 RUTA DE BIOSÍNTESIS.

La ruta de biosíntesis de carotenoides es una de las muchas que ocurre en los plastídeos. Anteriormente habíamos comentado que todos los isoprenoides plastídicos tienen como precursores moléculas de IPP y DMAPP proceden de la ruta MEP.

La ruta de biosíntesis de carotenoides inicia con una reacción de dos pasos; la condensación cabeza-cabeza de dos moléculas de geranilgeranil difosfato (GGPP) para así formar el prefitoeno al que luego se le elimina su grupo fosfato a través de una reorganización compleja vía la neutralización de un carbocación para así formar el 15 -cis-fitoeno. Esta reacción es mediada por la enzima fitoeno sintasa (**PSY**) (Dogbo *et al.*, 1988) codificada por el gen con mismo nombre.

El segundo y tercer paso de la ruta consiste en desaturaciones a la molécula de 15-cis fitoeno para así formar 15, 9'- di-cis-fitoeno y 9, 15, 9'-tri-cis fitoeno respectivamente, ambas reacciones mediadas por la enzima fitoeno desaturasa (**PDS**) (Dong *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2007; Chaudhary *et al.*, 2010). A continuación, el 9, 15, 9'-tris-cis fitoeno es convertido a su isómero el 9, 9-Di-cis  $\zeta$ - caroteno reacción catalizada por la enzima  $\zeta$ -caroteno isomerasa (**ZISO**) (Chen *et al.*, 2010). El 9, 9-Di-cis  $\zeta$ - caroteno es desaturado en una serie de dos pasos similares al del 15-cis fitoeno para formar 7, 9, 9'-tri-cis neurosporeno y 7,9, 7',9'-tetra-cis-licopeno respectivamente, ambas reacciones catalizadas por la enzima  $\zeta$  caroteno desaturasa (**ZDS**) (Chaudhary *et al.*, 2010). Por último, el 7, 9,7',9'-tetra-cis-licopeno es transformado a su isómero el trans-licopeno (el carotenoide que le brinda ese color rojo característico al jitomate) esta reacción es catalizada por la enzima carotenoide isomerasa (**CRTISO**) (Isaacson *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002) (**Figura 1.7**).

A partir del trans-licopeno la ruta se bifurca por un lado para dar  $\alpha$ -caroteno y por el otro  $\beta$ -caroteno (**Figura 1.8**). (I) En el primer caso, el trans licopeno es ciclado en uno de sus extremos por la enzima licopeno  $\epsilon$ -ciclaza (**LCY-  $\epsilon$** ) para formar  $\delta$ - caroteno, enseguida una nueva ciclación en el otro extremo pero ahora catalizada por la enzima licopeno  $\beta$ - ciclaza (**LCY-  $\beta$** ) formará el  $\alpha$  caroteno. (II) Por el otro lado, el trans-licopeno en dos reacciones en las que se ciclarán sus extremos por una LCY-  $\beta$ , formará después de la primera ciclación el  $\gamma$ -caroteno y después de la segunda el  $\beta$ - caroteno respectivamente (Phillip y Young., 1995; Pecker *et al.*, 1996; Verhoeven *et al.*, 1999; Cunningham y Gantt, 2001).

Por último, los carotenos cíclicos pueden ser modificados 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  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno da lugar a las xantofilas luteína y zeaxantina respectivamente. Además, consecutivas epoxidaciones en las posiciones C-5,6 y C-5'6' de los anillos 3-hidroxi  $\beta$  de la zeaxantina dan lugar a la violaxantina vía el intermedio monoepoxidado anteraxantina. La violaxantina puede ser de-epoxidada para volver hacer zeaxantina (ciclo de las xantofilas) o por el contrario sufrir una abertura de uno de los epóxidos y formar neoxantina, precursor del fitorregulador ácido abscísico (Sun *et al.*, 1996; Kim y DellaPenna, 2006; Tian and Zeevaart, 2004)

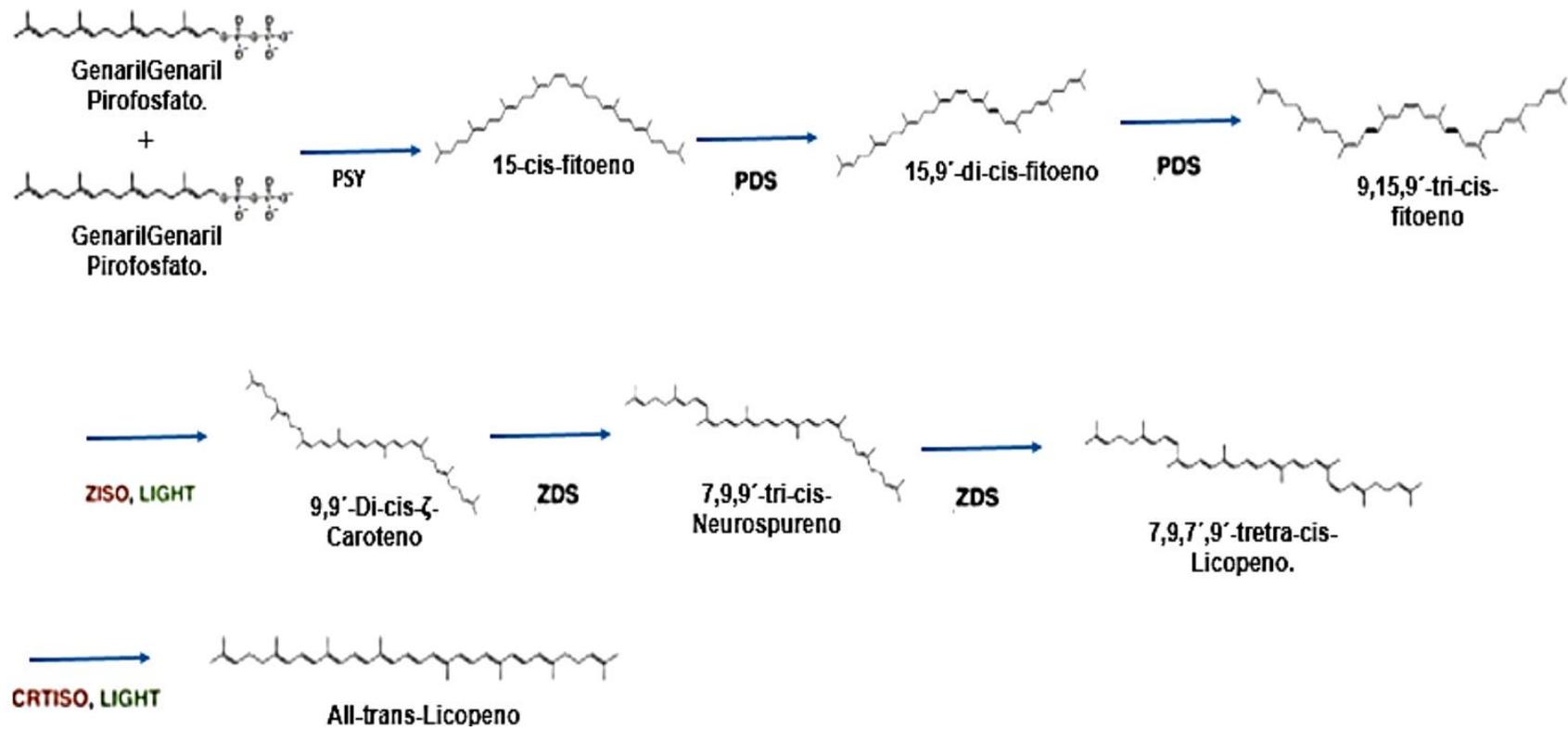
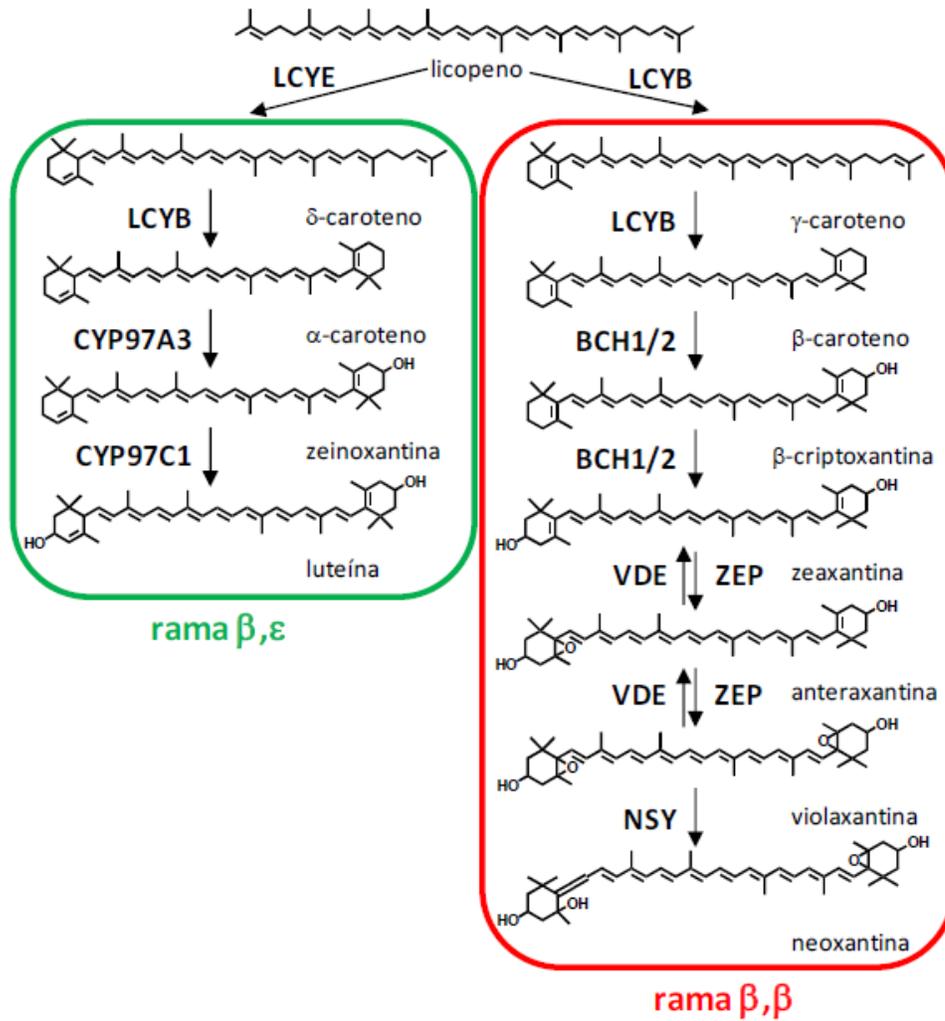


Figura 1. 7 Ruta de carotenoides del GGPP-licopeno.



**Figura 1.8 Ruta de biosíntesis de carotenoides del licopeno-xantofilas.** A partir del licopeno la ruta de biosíntesis de carotenoides se bifurca por un lado para dar  $\alpha$ -caroteno y por el otro al  $\beta$ -caroteno, además reacciones de hidroxilación y epoxidación van a dar  $\alpha$ -caroteno y por el otro al  $\beta$ -caroteno, además reacciones de hidroxilación y epoxidación van a dar lugar a las xantofilas. Ruiz-Sola (2014).

### 1.3.3. FITOENO SINTASA (PSY)

La primera reacción mediada por la enzima PSY es el paso de la ruta de carotenoides más estudiada. En *Arabidopsis thaliana* y pimiento esta enzima es codificada por un solo gen (Ruíz-solas y Rodríguez-Concepción, 2012). Sin embargo, en otras plantas esta codificada por pequeñas familias génicas, por ejemplo: en tabaco y zanahoria se han descrito dos genes codificantes para PSY (Busch y Seuter, 2002; Rodríguez-Concepción y Stange, 2013) mientras que en tomate, yuca, arroz, maíz y trigo se han descrito tres genes que codifican para PSY (Giorio *et al.*, 2008; Fantini *et al.*, 2013; Arango *et al.*, 2010; Welsch *et al.*, 2008). Al igual que en las DXS la formación de isoformas de la enzima ha ocasionado subfuncionalidad en ellas. Así en monocotiledóneas como el maíz y el trigo la isoforma PSY1 es responsable de la biosíntesis de carotenoides en el endospermo de la semilla, mientras que la producción de carotenoides en hoja está controlada principalmente por la isoforma PSY2. Por último, la isoforma PSY3 parece ser la única encargada de controlar la biosíntesis de carotenoides en la raíz de éstas plantas (Li *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2008b). En tomate, la isoforma PSY1 es específica en flores y frutos, órganos donde se acumula gran cantidad de carotenoides, la isoforma PSY2 predomina en tejido fotosintético y la tercera isoforma, PSY3 es específica de la raíz (Giorio *et al.*, 2008; Fantini *et al.*, 2013). En Níspero (*Eriobotrya Japonica*), PSY1 es responsable de la biosíntesis de carotenoides en la cascara de la fruta, mientras que una PSY2 denominada *EjPSY2A* fue responsable en la acumulación de carotenoides en el endospermo y la isoforma PSY3 presento niveles bajos de expresión en los tejidos analizados (tejidos aéreos) (Fu *et al.*, 2014). Con base en estos trabajos podemos decir que las isoformas de PSY1 y PSY2 controlan la biosíntesis de carotenoides en tejidos aéreos y la isoforma PSY3 realiza la misma función en tejidos no aéreos. Sin embargo, hay algunas excepciones por ejemplo: en yuca en donde no se ha detectado la isoforma PSY3, PSY1 y PSY2 controlan la biosíntesis de carotenoides en todos los tejidos (Arango *et al.*, 2010). Por otro lado, trabajos recientes sobre plantas en condiciones de estrés salino han propuesto que la isoforma PSY3 es la encargada de sintetizar los carotenoides precursores para la producción de ácido abscísico (ABA) en raíces (Li *et al.*, 2008a).

Con respecto a la regulación de la ruta de biosíntesis de carotenoides, se ha identificado que los genes DXS y PSY son los responsables de la regulación. La regulación de DXS es más acentuada que la de PSY y nos resulta muy lógico lo anterior, cuando se requiere la

acumulación de carotenoides un suministro de precursores debe estar disponible, sin este suministro la acumulación de carotenoides se ve limitada. Por lo tanto, es necesario una coordinación entre la DXS y PSY para que la acumulación de carotenoides no se vea limitada (**Figura 1.9**) (Lois *et al.*, 2000).

La ruta de biosíntesis de carotenoides es capaz de regularse con el fin de acumular un carotenoide específico. Este ejemplo ha sido bien descrito en el proceso de maduración del jitomate. La maduración del fruto implica la degradación de las clorofilas en el fruto verde a la vez que una acumulación masiva de licopeno lo torna de color rojo. El aumento desmesurado del carotenoide está precedido por una acumulación de transcritos codificantes para la isoforma 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 desaturasa e isomerasa y una fuerte represión de la expresión de las ciclasa lo que en conjunto resulta en una acumulación de licopeno en el fruto maduro (Ronen *et al.*, 1999). Este complejo mecanismo de regulación génica se debe a factores de transcripción, uno de ellos ya identificados son los RIN (ripening Inhibitor) de la familia de factores de regulación MADS-box que son capaces de controlar la carotenogénesis uniéndose directamente al promotor de los genes carotenogénicos entre ellos *PSY*, impidiendo su transcripción (Toledo-Ortiz *et al.*, 2010).

El proceso de desetiología de plantas es otro ejemplo de regulación carotenogénica a nivel transcripcional muy interesante. Además, demuestra la existencia de una coordinación entre la ruta MEP y de carotenoides a través de los genes *PSY* y *DXS*, como una manera de coordinación de ambas rutas para asegurar un aporte suficiente de GGPP para la síntesis de carotenoides. En el proceso de desetiología de plántulas, la luz desencadena un aumento masivo en la producción de carotenoides en los cloroplastos para proteger el emergente aparato fotosintético y ayudar a la transición del desarrollo fotosintético de la plántula (Park *et al.*, 2002; Rodríguez-Villalón *et al.*, 2009; Toledo-Ortiz *et al.*, 2010).

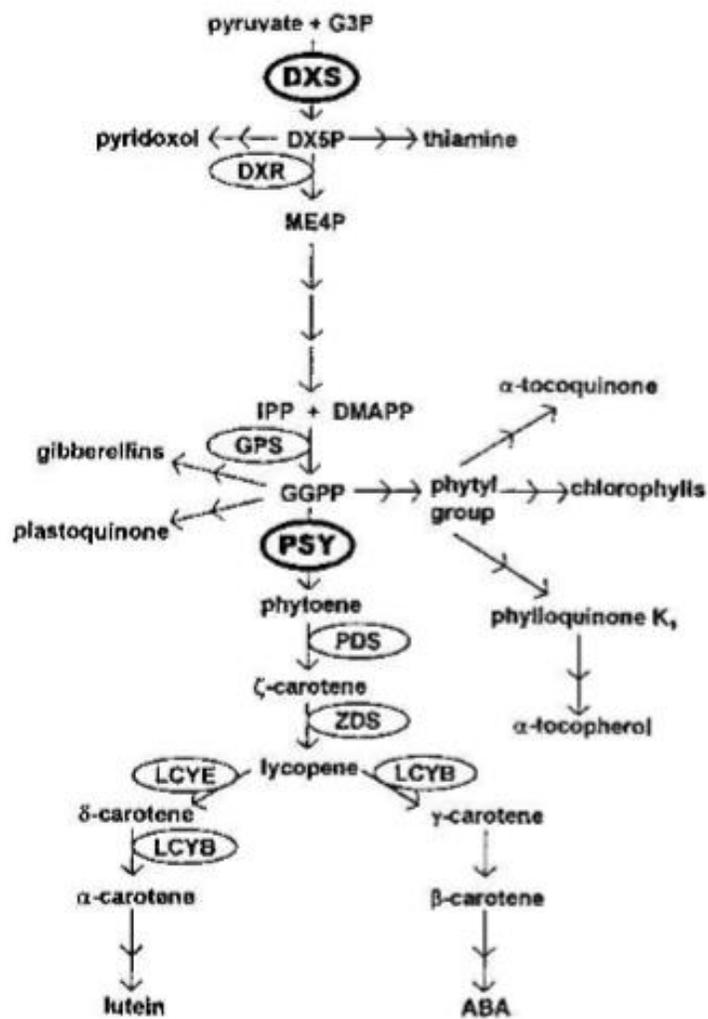
Ocurre que cuando las plántulas germinan en la oscuridad, niveles altos de PIFs (factores de interacción con el fotocromo) evitan el desarrollo fotomorfogénico y reprimen la biosíntesis de carotenoides mediante la unión de PIF1 (y posiblemente otros PIFs) al promotor del gen *PSY*. La acumulación de los PIFs en las plántulas crecidas en oscuridad también reprime la expresión de genes requeridos en la biosíntesis de clorofilas y del

desarrollo del cloroplasto. Inmediatamente después de que las plántulas emergen de la tierra a la luz, los PIFs se degradan mediante la interacción con los fitocromos activados causando una des-represión conjunta de todos estos genes (Leivar y Quail, 2011).

En *Bixa orellana* desde hace un tiempo se viene trabajando con la identificación de los genes de las rutas implicadas en la biosíntesis de bixina. Uno de los primeros trabajos donde se vio implicado el gen PSY, fue realizado por Rodríguez-Avila *et al.*, 2011 donde analizó por PCR punto final la expresión de los genes; DXS, PSY y otros genes de la ruta de carotenoides en dos variantes de achote, con características contrastantes con respecto al color de la flor y del fruto, así como en la acumulación de bixina (Valdez Ojeda *et al.*, 2008; Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Los resultados señalan que en la variante con mayor acumulación de bixina se presenta la mayor expresión de los genes carotenogénicos incluidos PSY, lo que sugirió una participación importante de esta enzima en la biosíntesis de bixina (Rodríguez Ávila *et al.*, 2010). 4 años después se realizó en el grupo de trabajo el primer transcriptoma de *novo* del achote, donde se reportó la presencia de dos isoformas de PSY, denominadas *BoPSY1* y *BoPSY2* y se cuantificó por RT-qPCR la expresión de ambas isoformas en semilla inmaduras y maduras (Carballo-Uicab, 2013). Los resultados señalaron que la isoforma PSY2 presento una mayor expresión en las semillas en etapa inmadura (etapa donde se ha reportado la mayor expresión de genes) y por lo tanto se postuló como la isoforma candidata responsable de la biosíntesis de bixina (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015).

Hasta el momento con base en los resultados de expresión ya se tiene identificado las isoformas que posiblemente participan directamente en la biosíntesis de bixina, sin embargo aún no se han realizado investigaciones sobre la funcionalidad de estos genes así como tampoco se ha verificado a través de la técnica RT-qPCR si existe diferencias de su expresión en variantes contrastantes. Es bien sabido que la expresión de los genes no va de la mano con la funcionalidad de la proteína que codifican, así se han reportado varios trabajos por ejemplo; en *Eriobotrya japonica* se identificó la expresión del gen *EjPSY2A<sup>d</sup>* que codifica para una isoforma PSY2, sin embargo al realizar los análisis de funcionalidad por complementación de color se demostró que dicha isoforma no presenta actividad catalítica debido a la carencia de la región C-terminal, lo que se refleja en un fenotipo con el endospermo incoloro (Fu *et al.*, 2014). En tomate se presenta una situación similar en donde en el mutante de color amarillo *r* posee un gen PSY1 no funcional y por lo tanto la planta no

acumula carotenoides en el fruto y aunque este mutante es de color amarillo y podría dar la impresión de presencia de otros carotenoides, se ha identificado que son flavonoides los que le proporcionan el color amarillo.



**Figura 1.9 Ruta de biosíntesis de isoprenoides plastidiales.** La ruta de biosíntesis de carotenoides además de la regulación por PSY, presenta otro sitio de regulación en la ruta MEP donde DXS se encarga de esta regulación. (Lois *et al.*, 2000)

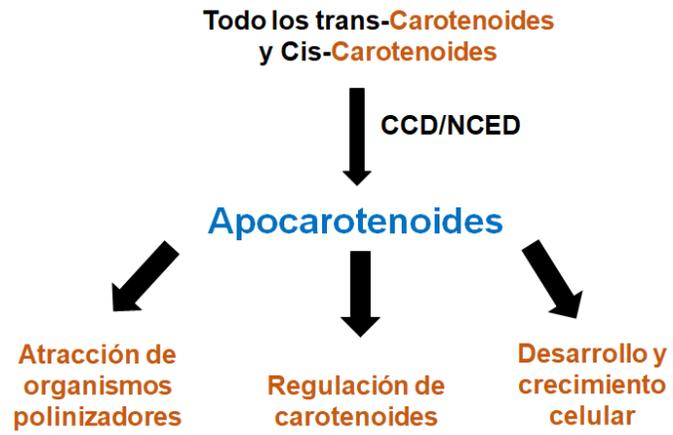
## 1.4 APOCAROTENOIDES

### 1.4.1 GENERALIDADES

Los apocarotenoides (*apo* que significa a partir de) son el producto del corte oxidativo de los carotenoides, este corte puede ser inespecífico cuando es por degradación mediada por la luz, temperatura y otros factores ambientales o específico a través de cortes mediados por enzimas denominadas **CCDs** (dioxigenasas de escisión de carotenoides) que corta carotenoides lineales, monocíclicos, bicíclicos y **NCED** (9-cis-epoxicarotenoides dioxigenasas) que cortan carotenoides bicíclicos como neoxantina y violaxantina (Matilla *et al.*, 2015). Los cortes por enzimas ocasionan la producción de apocarotenoides específicos, las rutas más conocidas de apocarotenoides es la ruta de la vitamina A en mamíferos y la del ABA en plantas (Schwartz S. *et al.*, 2001) (**Figura 1.10**).

Las funciones de los apocarotenoides en las plantas apenas está siendo visualizado en los últimos años, algunas de éstas funciones son: como moléculas que regulan el crecimiento y desarrollo de la planta, para la regulación de la carotenogenesis y algunos tienen la función de ser moléculas volátiles que ayudan en la atracción de organismos polinizadores (Lewinsohn *et al.*, 2005; Ohmiya *et al.*, 2006; Van Norman *et al.*, 2014; Avendano-Vazquez *et al.*, 2014). Las industrias también han puesto su mirada en los apocarotenoides ya que estos pueden emplearse como colorantes naturales, por ejemplo; la bixina que se sintetiza y acumula en las semillas de *Bixa orellana* y la crocetina en los pistilos de *Crocus sativus*, sin embargo éstas funciones y aplicaciones descubiertas en los apocarotenoides son apenas la punta del iceberg (Li *et al.*, 2008a; Leal & Michelangeli, 2010).

Con lo que respecta a la propiedad pigmentante de los apocarotenoides, este puede exhibir las características pigmentante de su carotenoide precursor, dependiendo del arreglo de los enlaces dobles conjugados de su estructura, existiendo la posibilidad además de alterar la tonalidad del color si se le adiciona grupos carboxilos o cetos (Walter y Strack 2011).



**Figura 1.10 Funciones de los apocarotenoides en las plantas.** Eroglu, A., & Harrison, E. H. (2013).

### 1.4.2 LA BIXINA

La bixina es el apocarotenoide; monometil éster del ácido norbixin-dicarbónico que se encuentra en altas concentraciones en las semillas del achiote y representa del 80 al 90% de los colorantes totales de este tejido. Sin embargo, la presencia de bixina no se restringe solamente a las semillas ya que se ha reportado en otros tejidos del achiote, particularmente en las células que rodean los tejidos vasculares y células epidermales (Leal & Michelangeli, 2010; Rodríguez-Avila *et al.*, 2011).

La bixina tiene un grupo carboxilo libre y otro esterificado los cuales le confieren funciones como ácido orgánico, proporcionando solubilidad y estabilidad a la molécula. Es soluble en aceites y grasas, además en solventes como el cloroformo, piridina, ácido glacial y propilenglicol. Tiende a degradarse en presencia de luz y temperaturas altas, es resistente a ácidos, alcoholes y a la acción microbiana (Leal & Michelangeli, 2010).

Respecto a la ruta de biosíntesis de bixina a pesar que ya se ha establecido y documentado en un sistema de expresión heterólogo (Bouvier *et al.*, 2003), aún existe controversias ya que los análisis de secuencia demuestran que los genes reportados para esta ruta, presentan poca homología con los genes encontrados y propuestos por otros autores (Jako *et al.*, 2002; Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015). En 2015 nuestro grupo de trabajo identificó nuevos genes pertenecientes a tres rutas implicadas en la biosíntesis y acumulación de bixina (MEP, carotenoides y bixina), además varios de estos genes forman parte de pequeñas familias génicas que codifican para enzimas con la misma función (parálogos). Con el fin de brindar un mejor entendimiento de la presencia de estas pequeñas familias de genes se realizaron análisis de los niveles de transcritos de cada uno de ellos a través de RT-qPCR en diferentes tejidos de la planta de achiote. Los resultados indicaron que ciertos parálogos están implicados directamente en la biosíntesis y acumulación de bixina. Así también se propuso una coordinación entre las rutas; MEP, carotenoides y bixina, en donde las dos primeras estarían participando en el aporte de moléculas precursoras (IPP y licopeno) de bixina (**Figura 1.11**). Hasta el momento se continúa trabajando con los análisis de expresión de los parálogos seleccionados, con el fin de aumentar los resultados que señalen su importancia en la producción de bixina, así también se han iniciado los primeros trabajos sobre el análisis de la funcionalidad de los genes en vistas a futuras aplicaciones biotecnológicas.

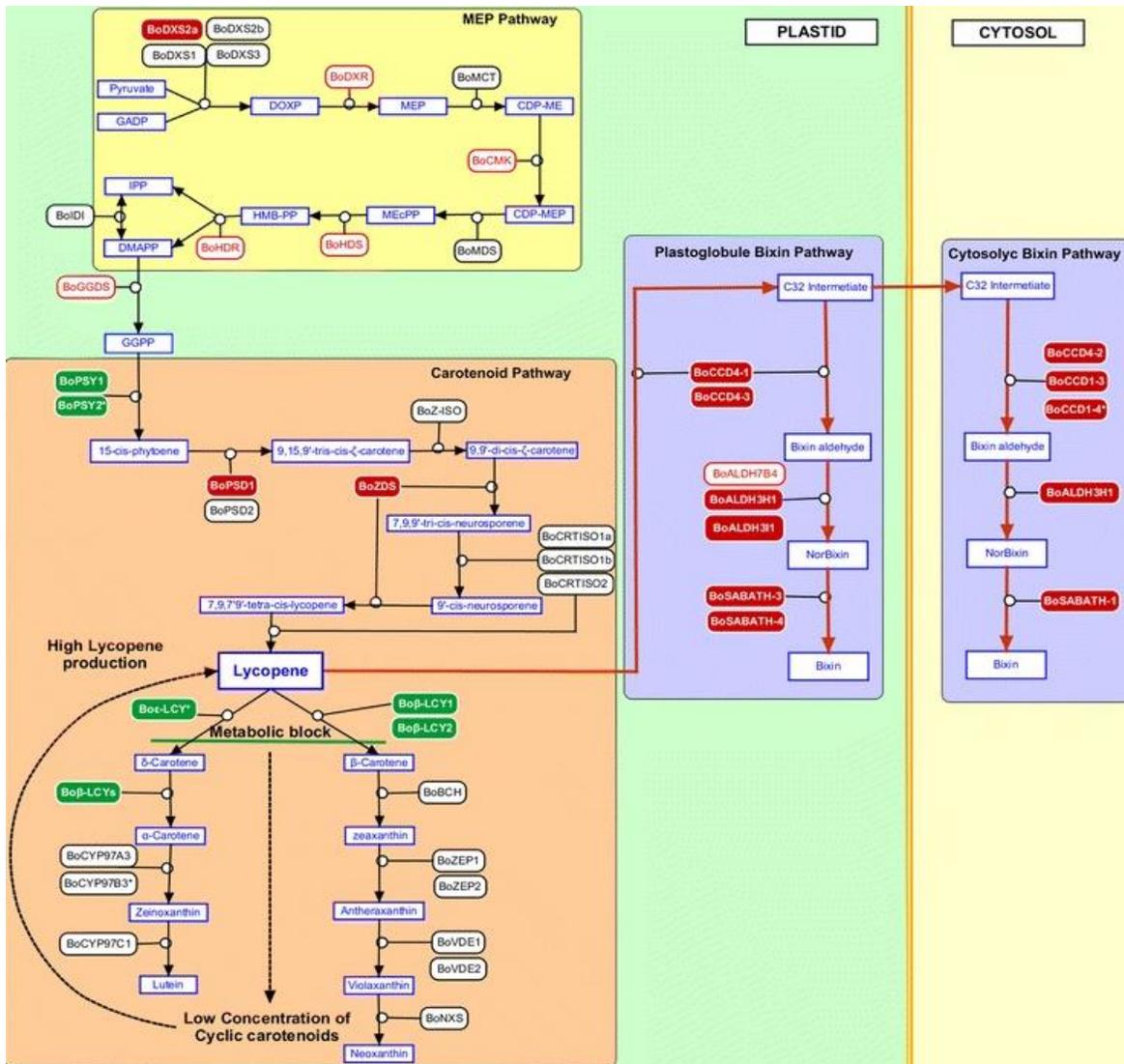


Figura 1.11 Modelo de la regulación génica y coordinación de las rutas implicadas en la biosíntesis de bixina. Cardenas-Conejo *et al.*, 2015

## 1.5 COMPLEMENTACIÓN DE COLOR

Con base en la función que cumplen los isoprenoides en las plantas y su papel en la industria, el estudio de la ruta de su biosíntesis y el análisis de los genes que codifican las enzimas que participan en esta, se ha convertido en un gran proyecto adoptado por varios investigadores.

Entre las metodologías propuestas para estudiar la funcionalidad de las proteínas derivadas de los genes que participan en la ruta de los isoprenoides se encuentra el análisis de complementariedad funcional, muchas veces llamado complementariedad por color. Esta metodología tiene su fundamento en el uso de cepas de *E. coli* modificadas genéticamente para producir carotenoides, como hospedadores heterólogos para analizar la función de los genes carotenogénicos del organismo en estudio (Cunningham y Gantt, 2007). Los primeros indicios de esta metodología fueron publicados por Perry *et al.*, (1986) donde mencionaba que al introducir un fragmento de DNA de *Erwinia herbicola* en células de *E. coli* éstas formaban colonias amarillas, más tarde Tuveson *et al.*, (1988) demostró que el color amarillo se debía a la presencia de carotenoides. A partir de entonces se empezó a introducir genes de *Erwinia* en *E. coli* como: crtE (geranilgeranil pirofosfato sintasa), crtB (fitoeno sintasa), crtI (fitoeno desaturasa), crtY (licopeno ciclasa), crtZ (caroteno hidroxilasa) y crtX (zeaxantina glucosil transferasa) para el estudio de los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides.

A través del uso de enzimas de restricción se construyó una variedad de plásmidos que albergan distintas secuencias de genes de la biosíntesis de carotenoides, que pueden ser introducidos por esta vía en el hospedador. (Misawa *et al.*, 1990; Cunningham *et al.*, 1994; Cunningham y Gantt, 2007). La variedad de plásmidos construidos permite a los investigadores analizar cDNAs implicados en la ruta de isoprenoides (**Tabla 1.2**).

La 1-desoxi- xilulosa- 5- fosfato sintasa (*DXS*) y fitoeno sintasa (*PSY*) son genes que codifican la primera enzima de la ruta MEP y de carotenoides, respectivamente. Ambas enzimas regulan su ruta en varias especies de plantas por lo que su análisis es de importancia cuando se pretende entender la producción de carotenoides o algún producto derivado de ellos (Simpson *et al.*, 20016).

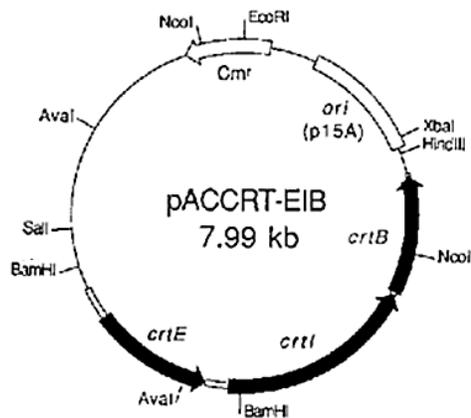
Para analizar el gen *DXS*, en varios trabajos se ha empleado el plásmido pACCAR-EIB que al ser introducido en *E. coli* ocasiona la acumulación de licopeno y le confiere a la bacteria resistencia al cloranfenicol. Así cuando se cotransforman cepas de *E. coli* que albergan el plásmido pCCART-EIB (**Figura 1.12**), con un plásmido constructo en el cual se ha introducido un ORF de *DXS*, un aumento en el flujo de licopeno indica que el ORF de *DXS* introducido codifica una enzima funcional 1-desoxi D-xilulosa 5 fosfato sintasa que está acelerando la síntesis de IPP, molécula precursora de los carotenoides. Por el contrario si el contenido de licopeno no varía después de la segunda transformación, es posible que el gen codifique una enzima *DXS* no funcional (Yuru-Tong *et al.*, 2015).

**Tabla 1. 2. Catálogo de plásmidos carotenogénicos.**

| <b>Enzima</b>  | <b>plásmido Screening</b> | <b>Cambio de color de colonia</b> |
|--|---------------------------|-----------------------------------|
| De la ruta de isoprenoides                             |                           |                                   |
| <i>1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa</i>           | pACCRT-EIB                | Rosa a rojo                       |
| <i>1-hidroxi-2-metil-butenil-4-difosfato reductasa</i> | pAC-LYC                   | Rosa a rojo                       |
| <i>IPP isomerasa</i>                                   | pAC-BETA                  | Amarillo a naranja                |
|  | pAC-LYC                   | Rosa a rojo                       |
| <i>GGPP sintasa</i>                                    | pAC-ZEAX                  | Amarillo pálido                   |
|  | pAC.94 N                  | Amarillo                          |
| De la ruta de carotenoides                             |                           |                                   |
| <i>Fitoeno sintasa</i>                                 | pAC-85B                   | Amarillo                          |
|  | pACCAR25ΔcrtB             | Amarillo                          |
| <i>Fitoeno desaturasa</i>                              | pAC-LYC                   | Amarillo pálido                   |

Por otro lado, los análisis de la función de PSY han tenido buenos resultados empelando el plásmido pACCAR25ΔcrtB, este plásmido contiene genes que codifican enzimas que participan en la biosíntesis de β-digluósido zeaxantina con excepción del gen crtB que codifica para la enzima fitoeno sintasa. Adicionalmente este plásmido confiere a las bacterias resistencia al cloranfenicol. Cuando se co-trasforman células de *E. coli* que contienen el pACCAR25ΔcrtB con un constructo que alberga un ORF de PSY funcional, se produce la acumulación de β-digluósido zeaxantina, sin embargo si la enzima traducida no presenta función no existe presencia del metabolito (Fu *et al.*, 2014).

pACCRT-EIB y pACCAR25ΔcrtB fueron construidos por Misawa *et al.*, 1990. El plásmido pACCRT-EIB contiene los genes: crtE, crtB, crtI de *Erwinia herbicola* (**Figura 1.12**). Para su diseño se utilizaron enzimas de restricción que sirvieron para eliminar las regiones de los genes crtY, crtH, crtX y de esta forma lograr la acumulación de licopeno en las cepas bacterianas que alberguen este plásmido (**Figura 1.13**).



**Figura 1.12 Plásmido pACCRT-EIB. Misawa *et al.*, 1990.**

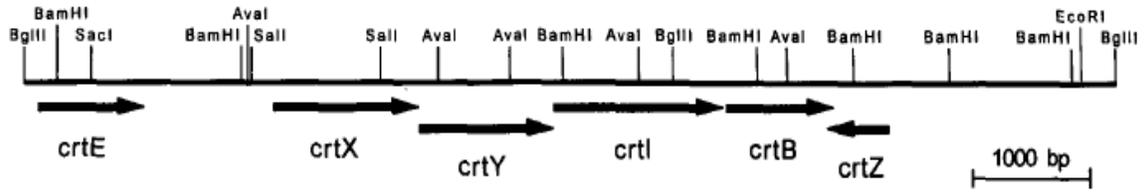


Figura 1.13 Genes *crt* de *Erwinia herbicola*. Cuningham *et al.*, 1994

Por su parte pACCAR25ΔcrtB como se mencionó anteriormente contiene los genes: crtE, crtI, crtY, crtZ y crtX de *Erwinia uredovora* (Figura 1.14).

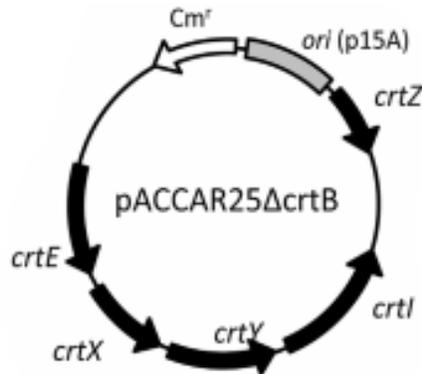


Figura 1.14 Plásmido pACCAR25CrtB. Misawa *et al.*, 1990

## JUSTIFICACIÓN

*Bixa orellana* o “achiote” es la fuente de la bixina, un apocarotenoide que se deriva del licopeno. La bixina, es el segundo colorante natural más empleado por las industrias en la elaboración de sus productos. Debido al valor que representa el pigmento, el estudio de la ruta de su biosíntesis se efectúa por diferentes grupos de investigación. Con la elaboración del transcriptoma de *nov* de *Bixa orellana* se ha identificado: (I) una ruta para la biosíntesis de bixina con genes que presentan poca homología con los ya reportados por Bouvier en 2003; (II) se documentó que la ruta de bixina se coordina con la ruta MEP y de carotenoides para obtener un flujo acoplado de los precursores del apocarotenoide; (III) se encontraron nuevos genes en la ruta MEP, carotenoides y bixina. Por último, (IV) se reportó que varios de los genes que participan en las rutas MEP, carotenoides y bixina, forman parte de pequeñas familias génicas que codifican enzimas con la misma función (parálogos). Así con base en la información anterior, los primeros experimentos estuvieron enfocados en analizar el perfil de expresión de genes parálogos de la ruta MEP, carotenoides y bixina. Por lo tanto, este estudio pretende continuar evaluando por medio de su expresión y la función de sus proteínas, si los genes parálogos: *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* están involucrados en biosíntesis de bixina. Los resultados que se obtengan de estudio ayudarían a un mejor entendimiento de la bioquímica implicada en la ruta de biosíntesis de bixina e iniciaría con la selección de genes parálogos que podrían aplicar para futuros trabajos en ingeniería metabólica.

## **HIPÓTESIS**

Los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* codifican enzimas funcionales involucradas en la biosíntesis de bixina puesto que sus expresiones se correlacionan con la producción del pigmento en la semilla de *Bixa orellana*.

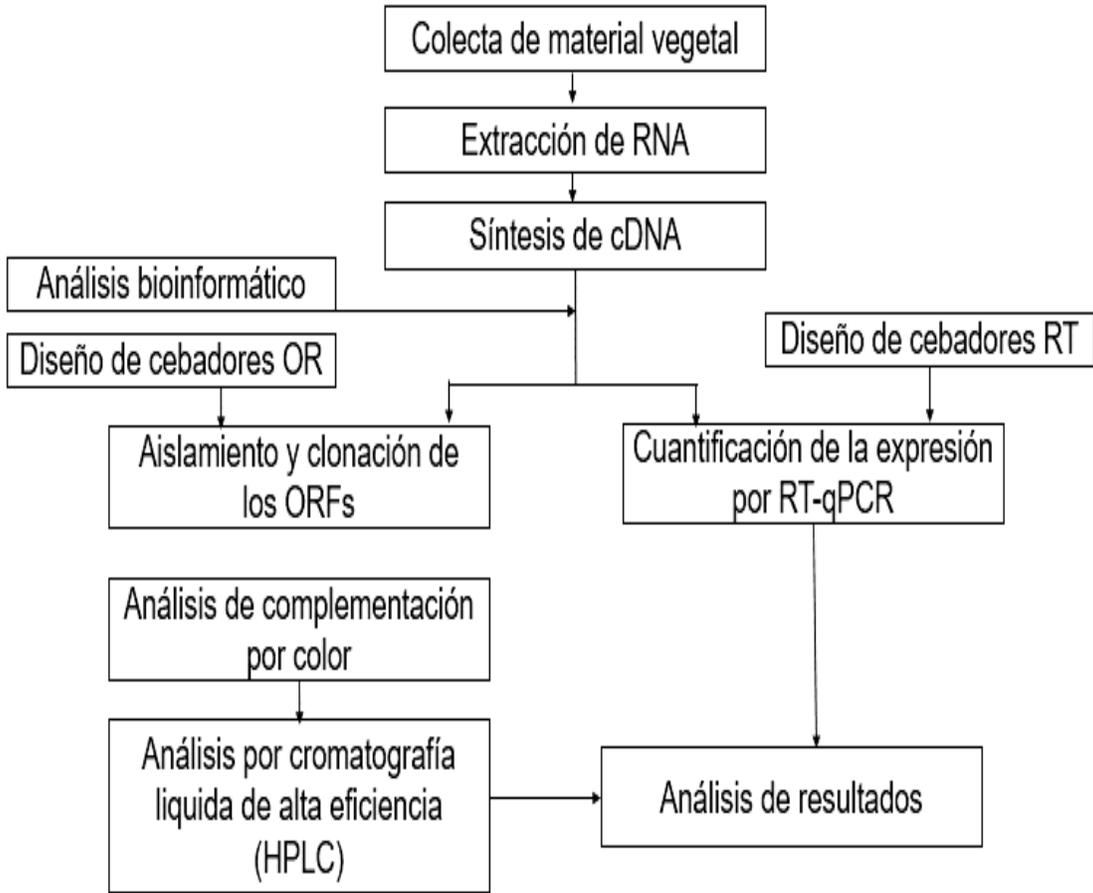
## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* están involucrados en la síntesis de bixina, mediante el análisis de su expresión en la maduración de semillas de tres variantes de *Bixa orellana*, y la función de sus proteínas en *Escherichia coli*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analizar a través de bioinformática el mRNA de los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2*, y sus proteínas codificantes.
- Evaluar los patrones de expresión individual de los genes durante la maduración de las semillas de tres variantes de *Bixa orellana*.
- Demostrar la función 1-desoxi-D-xilulosa-5 fosfato sintasa de *BoDXS2a*, y fitoeno sintasa de *BoPSY1* y *BoPSY2*, por complementación de color en *Escherichia coli*.

**DIAGRAMA EXPERIMENTAL**



## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 2.1 MATERIAL VEGETAL

Se recolectaron las semillas de las variantes P12, N5 y N4 de *Bixa orellana* en tres etapas de maduración (**Tabla 2.1**) en el banco de germoplasma localizado en Temozón norte, Mérida, ubicado al noroeste del estado de Yucatán, México. El material colectado fue envuelto en papel aluminio e inmediatamente fueron sumergidas en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta la realización de los análisis.

**Tabla 2.1. Etapas de maduración de las semillas.**

| <b>Etapas de maduración</b> | <b>Días después de la antesis.</b> |
|-----------------------------|------------------------------------|
| E1                          | 7 días                             |
| E3                          | 14 días                            |
| E5                          | 21 días                            |

## 2.2 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y SÍNTESIS DE cDNA

Se obtuvo el RNA total de las tres etapas de maduración de las semillas de las variantes P12, N5 y N4 de achote. Para ello se utilizó el sistema PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purificación System Invitrogen®, cat.No.12183-018 modificado por Rodríguez-Ávila *et al.*, 2009.

Con el fin de garantizar que el RNA total esté libre de DNA genómico, el RNA total se sometió a una digestión con la enzima “DNase I Amp Grade” (Desoxyribonuclease I Amplification Grade) (Cat. No 18068-018). La integridad del RNA total se verificó en un gel de agarosa, por otro lado, la concentración y pureza por espectrofotometría en un NanoDrop ND-1000.

La síntesis de la cadena complementaria (cDNA) se realizó a través de transcripción inversa usando la enzima “SuperScript III First-Strand” para RT-PCR (Invitrogen, Cat. No. 18080-093) y hexámeros al azar como iniciadores. Para este procedimiento se siguió el protocolo proporcionado por el proveedor, el cual consta de los siguientes pasos: en un tubo Eppendorf de 0.5 mL libre de nucleasas, se agrega 1 µl de mezcla de dNTP (el cual contiene dATP, dGTP, dCTP y dTTP a una concentración de 10 mM), 100 ng de RNA total y agua bidestilada estéril libre de nucleasas, hasta obtener un volumen final de reacción de 13 µl. Hecho esto, se procede a calentar la reacción a 65 °C por 5 minutos y posteriormente incubar en hielo por 1 minuto. Después se le agrega 4 µl de amortiguador 5X First-Strand, 1 µl DTT 0.1 M, 1 µl de inhibidores de RNAasa (RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor Invitrogen, Cat. No. 10777-019, 40 U/ µl) y 0.5 µl de transcriptasa inversa (SuperScript™ III RT 200 U/ µl). El siguiente paso es incubar la reacción a temperatura ambiente por 5 minutos y posteriormente a 55°C por 60 minutos, para proceder finalmente a la inactivación de la reacción se calienta a 70 °C por 15 minutos y se resguarda a -80°C.

La integridad, concentración y pureza del cDNA se verificó de manera similar que en el caso del RNA total.

## 2.3 DISEÑO DE CEBADORES

Se diseñaron cebadores para la cuantificación de la expresión por RT-qPCR (cebadores RT) y para aislar el ORF (cebadores OR) empleando la secuencia de nucleótidos del mRNA de *BoDXS2a* (KT358984.1), *BoPSY1* (KT358995.1) y *BoPSY2* (KT358996.1) reportado en la base de datos de NCBI (Tabla 2.2). Los cebadores fueron analizados con el programa en línea OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) para corroborar un buen diseño. Se analizaron los ORFs de los transcritos de *DXS2a* y *PSY2* a través de la herramienta en línea RestrictionMapper version 3 (<http://www.restrictionmapper.org/>) con el propósito de identificar los sitios de restricción contenidos en los ORFs, reduciendo los sitios de restricción disponibles para utilizar en el diseño de cebadores tipo OR. Después de este análisis se seleccionaron los sitios de restricción contenidos en el plásmido pETDuet-1 y que no estuvieran presentes en el ORF del transcrito a analizar.

**Tabla 2.2. Secuencia de cebadores RT y OR.**

| Cebadores                | Secuencia                              |
|--------------------------|--|
| Cebadores tipo RT        |  |
| <b>RT-FBoDXS2a</b>       | 5'-CTGCACCATGTCTTCAGCAC-3'             |
| <b>RT-RBoDXS2a</b>       | 5'-TGGTCTTGGCATGGCAGTAG-3'             |
| <b>RT-FBoPSY1</b>        | 5'-TTCAATCCGAGACGGAAACC-3'             |
| <b>RT-RBoPSY1</b>        | 5'-TGTA CTGGTGATTCTCGCGTAG-3'          |
| <b>RT-FBoPSY2</b>        | 5'-GAACTGTGGGGCTAATGAGTGT-3'           |
| <b>RT-RBoPSY2</b>        | 5'-CGAAGATGCTAGGAGAGGAAGAGT-3'         |
| Cebadores tipo OR        |  |
| <b>OR-FBoDXS2a-BamHI</b> | 5'-CAGGATCCGTTGAGAGCCTCTGCCTCCAA-3'    |
| <b>OR-RBoDXS2a-Sall</b>  | 5'-GTCGACTGATTACTTGAAGTGCAGGGC-3'      |
| <b>OR-FBoPSY1-NcoI</b>   | 5'-ATACCATGGGCATGTATGTAGCAGTGTTATGG-3' |
| <b>OR-RBoPSY1-BamHI</b>  | 5'-TTAGGATCCTTATGCCTTACTCAAAGGAG-3'    |
| <b>OR-FBoPSY2-NcoI</b>   | 5'-ATACCATGGGCATGGCTGGTGTCTTCTTTGG-3'  |
| <b>OR-RBoPSY2-BamHI</b>  | 5'-TTAGGATCCTCAGCGATTATAAACTCCCATG-3'  |

## 2.4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

El mRNA de *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* se tomaron de la base de datos de NCBI y se analizaron sus secuencias de nucleótidos, secuencias de aminoácidos deducidos y marco de lectura abierto (ORF). Los pI teóricos y el Mw de las proteínas deducidas así como otros parámetros físicos y químicos se calcularon con la herramienta ProtParam del servidor ExPASy (disponible en línea: <https://web.expasy.org/protparam/>).

Los análisis de alineamiento múltiple se llevaron a cabo empleando el algoritmo Clustal W por medio del editor de secuencias BioEdit. Las secuencias de aminoácidos empleados en el alineamiento de las BoDXS fueron: BoDXS1:AMJ39459.1, BoDXS2a: AMJ39460.1, BoDXS2b: AMJ39461.1, BoDXS3: AMJ39462.1, EcDXS: 2O1S\_D. Por otro lado, las secuencias de aminoácidos empleados en el alineamiento de las BoPSY fueron: BoPSY1: AMJ39471.1, BoPSY2: AMJ39472.1, GrPSY1: AIJ00007.1, GrPSY2 XP\_012459972.1, TcPSY1:EOY32351.1, TcPSY2: XP\_007048944.1, AtPSY: AED92400.1. Los análisis filogenéticos se realizaron con MEGA7 (Kumar S. *et al.*, 2016). Las relaciones evolutivas se infirieron utilizando el método de máxima verosimilitud basado en la matriz JTT (Jones D.T. *et al.*, 1992) con un número de Bootstrap igual a 1000. El análisis involucró 39 secuencias de aminoácidos en el caso de las BoDXS y 46 en el caso de las BoPSY.

Las predicciones de las estructuras proteicas así como la localización del sitio activo de las enzimas, se realizó por homología mediante una combinación de plegamiento *ab initio* en plantillas de 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS) de *Escherichia coli* (2o1s) y escualeno sintasa de *Enterococcus hirae* (5iys), usando el servidor UCSF Chimera. Antes de modelar estructura consenso de las PSY de *Bixa orellana* se realizó un subprocesamiento de la secuencia de aminoácidos de cada proteína PSY sin su péptido señal. La minimización de la energía y las simulaciones de dinámica molecular se realizaron para cada estructura modelada utilizando el software VEGA ZZ. Durante las simulaciones de dinámica molecular, cada sistema se solvató en una caja de agua con valores de 70x, 70y y 70z.

## 2.5 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR PCR TIEMPO REAL.

Para analizar la expresión de *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2*, los RT-qPCR fueron realizados en el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System. El RNA total se aisló de tres etapas de maduración de semillas de las variantes N4, N5 y P12 de *Bixa orellana*. Todos los RNA se convirtieron en cDNA como plantillas para RT-qPCR. El gen endógeno 18s rRNA (5'-CGGCTACCATCCAAGGAA-3' y 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3') se usó como normalizador de la carga de cDNA en cada reacción. Los cebadores tipo RT se diseñaron dentro el ORF de cada mRNA como se explica en la sección 2.4.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en 10 µl de mezcla de reacción que contiene: 750 ng de cDNA, 5 µl de mezcla maestra SYBR Green, 0.66 mM de cebadores y agua hasta alcanzar volumen. Las condiciones de RT-qPCR consistieron en: incubación a 50°C por 2 min, activación de la polimerasa a 95°C por 1 min, seguido de 40 ciclos de amplificación a 95°C por 30 s, 62.3 °C para *BoDX2a*/ 62°C para *BoPSY1* y *BoPSY2* por 30 s y 72°C por 1:30 min. Con una extensión final de 72°C por 1 min. La totalidad procedimiento se repitió tres veces para calcular el error estándar para cada muestra. El nivel relativo de expresión génica se calculó utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 2.6 AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DEL ORF DE *BoDXS2a*, *BoPSY1* Y *BoPSY2*.

El cDNA de la hoja de *Bixa orellana* se empleó como templado para aislar el ORF de *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* con el uso de cebadores OR específicos (OR-*FBoDXS2a*-*Bam*HI: 5'-CAGGATCCGTTGAGAGCCTCTGCCTCCAA-3'/OR-*RBoDXS2a*-*Sall*: 5'-GTCTGACTGATTACTTGAACTGCAGGGC-3', OR-*FBoPSY1*:  
ATACCATGGGCATGTATGTAGCAGTGTTATGG/ OR-*RBoPSY1*:  
TTAGGATCCTTATGCCTTACTCAAAGGAG, OR-*FBoPSY2*-*Nco*I: \_\_\_\_\_ 5'-  
ATACCATGGGCATGGCTGGTGTCTTCTTTGG-3'/OR-*RBoPSY2*-*Bam*HI: \_\_\_\_\_ 5'-  
TTACCTAGGTCAGCGATTATAAACTCCCATG-3'), a través una reacción de RT-PCR con un volumen final de 15 µl que contiene: 1.5 µl de Buffer 10x MgCl<sub>2</sub> (20 mM), 1.5 µl de GC-Rich, 0.2 mM de dNTP's, 0.13 mM de cebadores, 750 ng de cDNA, 0.6 unidades de FastStart Taq DNA Polymerase y agua hasta alcanzar volumen. Las condiciones de RT-PCR consistieron en una activación de la polimerasa a 95°C por 4 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, más una temperatura de hibridación que fue específica para cada par de cebador con un tiempo de 30 s: 59°C empleando cebadores OR-*BoDXS2a* y 57°C empleando cebadores OR-*BoPSY1* y OR-*BoPSY2*, y una extensión a 72°C por 1:50 min. Por último se realizó una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Los productos de PCR fueron inyectados en un gel de agarosa al 1%, teñido con 0.3 µl de Red-Gel y corridos en una cámara electroforética a 90 V por 35 min. La visualización se realizó través del Transilluminator, modelo M-20E de la marca UVP. Inmediatamente los fragmentos amplificados y que coincidían con el tamaño de los ORFs de interés, fueron extraídos con la ayuda de un bisturí estéril (#23 de la marca RIBBEL) y purificados empleando el QIAquick Gel Extraction Kit (cat. nos. 28704 and 28706) de QIAGEN, siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración y pureza de los productos purificados fue verificado en un NanoDrop Spectrophotometer ND-1000.

Después de amplificar y purificar los segmentos de interés, estos fueron ligados al vector de clonación pGEM®-T Easy (pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems) (Cat. No A1360) por medio de una reacción de ligación usando una relación 3:1, con un volumen final de 10 µl que contiene: 5 µl de Buffer de rápida ligación 2X (60mM Tris-HCl (pH 7.8), 20mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM DTT, 2mM ATP y 10% polyethylene glicol), 3 unidades de DNA ligasa T<sub>4</sub>, 25 ng µl de vector de clonación pGEM®-T Easy y 66.5 ng de producto de purificación. La reacción fue incubada a 4°C durante toda la noche.

Posteriormente, el producto de ligación se introdujo en células DH5 $\alpha$  químicamente competentes obtenidas por el método de RbCl<sub>2</sub>, siguiendo el protocolo del manual pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems modificado, que consiste en: (I) colocar 2  $\mu$ l de producto de ligación a 50  $\mu$ l de muestra de células DH5 $\alpha$  químicamente competentes, (II) Incubar por 30 min en hielo, (III) incubar por 30s a 42 °C, (IV) inmediatamente trasferir en hielo e incubar por 10 minutos y (V) por último colocar 500  $\mu$ l de medio SOC y dejar crecer por 1.15 horas a 37°C a 200 rpm. Pasado el tiempo de incubación, se colocó 200  $\mu$ l de cultivo bacteriano, se colocó en placas de petri adicionado con ampicilina (100  $\mu$ g/ $\mu$ l), 40  $\mu$ l de X-gal (5-bromo-4-cloro-indolil- $\beta$ -D-galactósido) (20 mg/ml), 4  $\mu$ l de IPTG (isopropiltio- $\beta$ -D-galactósido) (20 mg/ml) y se incubo a 37 °C durante toda la noche.

Seguidamente, se seleccionaron las colonias a través del cribado de células azules/blancas. Las colonias blancas seleccionadas se picaron con palillo de madera estéril, y se colocaron en tubos falcón de 15 ml conteniendo 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 mg/L) y se incubaron por 12 h a 37°C a 200 rpm. La extracción de plásmidos se realizó empleando el kit QIAprep Spin Miniprep de la marca QUIAGEN catálogo 27104. Siguiendo el protocolo del fabricante.

Los plásmidos extraídos fueron analizados por digestión, con ayuda de enzimas de restricción FastDigest de la marca Thermo Scientific. El volumen de las reacciones de digestión fueron de 10  $\mu$ l y contenían: 1  $\mu$ l de FastDigest Green Buffer, 0.6-0.7  $\mu$ g de DNA plasmídico, 1  $\mu$ l de enzima FastDigest y agua, hasta igualar el volumen final. En el caso de las reacciones de doble digestión se colocó 1  $\mu$ l de cada enzima de restricción FastDigest. Los productos de la digestión fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñido con 0.2  $\mu$ l de Red-Gel.

## 2.7 CONSTRUCCIONES DE VECTORES pET\_BoDXS2a, pET\_BoPSY1 Y pET\_BoPSY2.

Para introducir el ORF de *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* en un vector de expresión de manera independiente, se linearizó el vector pETDuet-1 (**Figura 2.1**) y se recuperó el ORF de *BoDX2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* de los constructos de pGEM, por medio de una reacción de doble digestión, empleando las enzimas FastDigest BamHI y Sall en el caso de *BoDXS2a* y las enzimas NcoI y BamHI para el caso de *BoPSY1* y *BoPSY2*. Los productos de digestión fueron inyectados en un gel de agarosa y corridos en una cámara electroforética. El plásmido linearizado y los ORFs fueron recuperados del gel empleando el Kit QIAquick Gel Extraction (cat. nos. 28704 and 28706) de QIAGEN.

Se recombinaron los segmentos de DNA con extremos cohesivos y se unieron covalentemente empleando el Kit Rapid DNA Ligation con una relación aproximada de 1:10 en una reacción de volumen final de 20 µl que contenía: 2.63 ng de pETDuet-1 linearizado, 35.8 de ORF, 4 µl de Buffer 5x, 4 µl de agua y 5 unidades de ligasa.

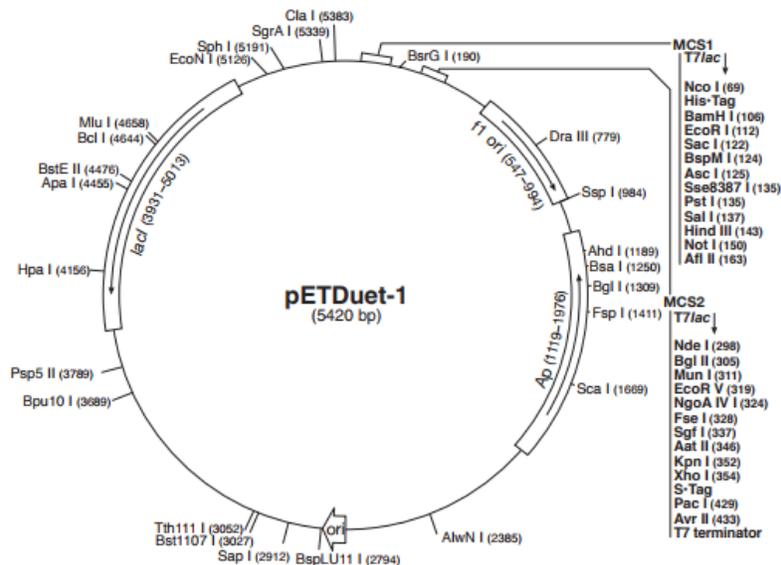


Figura 2.1 Plásmido de expresión pETDuet\_1.

El análisis de los nuevos constructos pET\_*BoDXS2a*, pET\_*BoPSY1* y pET\_*BoPSY2* se llevó a cabo con enzimas de digestión FastDigest en reacciones con volumen final de 10  $\mu$ l que contiene: 0.4-0.5  $\mu$ g de plásmido, 1  $\mu$ l de FastDigest Green Buffer, 5 unidades de cada enzima de restricción y agua hasta alcanzar el volumen final. El resultado fue analizado en un gel de agarosa en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

## 2.8 COMPLEMENTACIÓN DE COLOR

Para analizar la función de *BoDXS2a* por complementación de color, se empleó el plásmido pACCART-EIB que contiene todos los genes implicados en la ruta de síntesis de licopeno y un gen de resistencia al antibiótico cloranfenicol, la identificación de la función se realizó siguiendo los criterios del experimento de Yuru Tong *et al.*, (2015) los cuales se basan en el aumento de licopeno.

Para ello, se cotransformaron células competentes BL21 que albergan el plásmido pACCART-EIB (Misawa *et al.*, 1990) con el vector constructo pET\_*BoDXS2a*. Las células transformadas se seleccionaron en placas LB con 34 mg/l de cloranfenicol y 100 mg /l de ampicilina después de un crecimiento a 37 ° C durante toda la noche. Las colonias de bacterias se picaron para ser inoculadas en un tubo falcón con 5 ml de LB complementado con antibióticos (ampicilina y cloranfenicol). 1 ml de cultivo bacteriano fue inoculado en un matraz con 50 ml de LB, suplementado con antibióticos. El inóculo se colocó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5-0.6 e inmediatamente la expresión fue inducida con 1 mM de IPTG. Esto fue seguido de un proceso de incubación a 28 °C en la oscuridad, con agitación a 200 rpm durante 48 h y luego otras 48 h sin agitación. Por último, el LB fue eliminado a través de centrifugación a 4000 rpm por 30 min (Ampomah-Dwamena *et al.*, 2015).

Por otro lado, para el analizar la función de BoPSY1 y BoPSY2 por complementación de color, se empleó el plásmido pACCAR25ΔcrtB (Misawa *et al.*, 1990) que tiene todos los genes implicados en la ruta de síntesis de diglucósido de zeaxantina (un carotenoide de color amarillo), a excepción de un gen que codifica para PSY. Las células competentes BL21 portadoras del plásmido pACCAR25ΔcrtB se cotransformaron, individualmente, con las construcciones: pET\_*BoPSY1* y pET\_*BoPSY2*. Las células transformadas se seleccionaron en placas LB con 34 mg/L de cloranfenicol y 100 mg /L de ampicilina después de un crecimiento a 37 ° C durante toda la noche. A partir de aquí, se realizó el mismo procedimiento empleado anteriormente.

## 2.9 ANÁLISIS POR HPLC

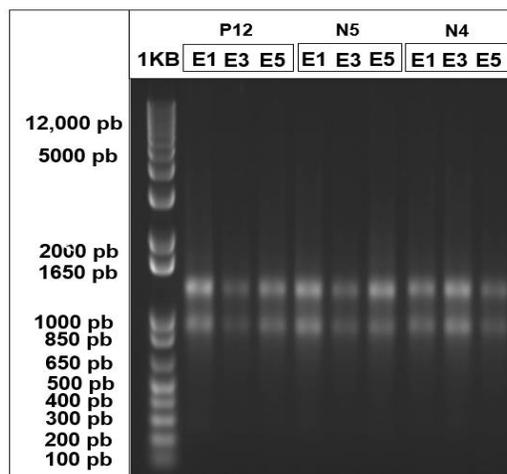
El análisis de carotenoides por HPLC, se realizó en un equipo de la marca Agilent 1200 con arreglo de diodos. Los extractos de bacteria se trataron de acuerdo al método usado por Ampomah-Dwamena *et al.*, (2015). El extracto seco se resuspendió en 200 µl de acetona y 200 µl de metanol, se filtró a través de una membrana de PVDF (0.22 µm de tamaño de poro). Se inyectó 50 µl de cada muestra en una columna YMC RP C30 (5 µm, 250 x 4.6 mm), acoplada a una columna protectora de 20 x 4.6 C30 (YMC Inc. Wilmington, Carolina del Norte) (temperatura de columna 25 ° C). La fase móvil consistió de Solvente A; acetonitrilo/metanol/isopropanol (75:10:15 v/v/v) y el solvente B (metanol). La separación de cromatografía fue llevada a cabo a un flujo de 1 ml/min a 25°C: Paso 1, 100% de solvente A por 35 minutos; paso 2, incremento lineal hasta 100% de solvente B por 5 minutos; paso 3, regreso al 100% solvente A por 5 minutos. La zeaxantina se detectó a 450 nm y se determinó de los extractos por comparación de los tiempos de retención con el estándar comercial de Zeaxantina marca Sigma (CAS: 144-68-3). Todos los solventes usados fueron grado HPLC y se inyectó 3 réplicas de cada uno.

## CAPÍTULO III

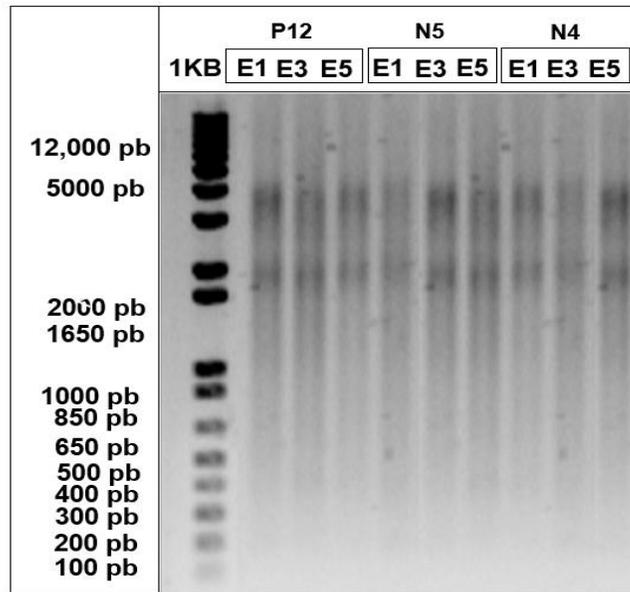
### RESULTADOS.

#### 3.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y SÍNTESIS DE cDNA.

La integridad y pureza de las muestras de ácidos nucleicos son factores que deben de considerarse, ya que de ellos depende futuros experimentos como por ejemplo: análisis de expresión y amplificación de segmentos. Para verificar la integridad y la pureza de las muestras de RNA total y cDNA que se emplearon para medir la expresión génica y amplificar el ORF de los transcritos *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2*; se realizó una electroforesis en geles de agarosa y se midieron las muestras por espectrofotometría en un NanoDrop. Las muestras de RNA total y cDNA visualizadas en gel de agarosa, después de una electroforesis mostraron dos bandas (**Figura 3.1**) y un barrido (**Figura 3.2**), características que muestran la calidad del RNA y cDNA respectivamente. Asimismo, los valores de la relación 260/280 proporcionados por espectrofotometría para el RNA total oscilaron de 2.0-2.2 y para el cDNA de 1.8-2.0. Los resultados anteriores confirmaron que las muestras de RNA total y cDNA tienen pureza e integridad ideal y por consiguiente se pueden emplear para posteriores análisis de expresión génica y amplificación de segmentos (Desjardins y Conklin *et al.*, 2010).



**Figura 3.1 Muestras de RNA total.** Las muestras de RNA total fueron extraídas de tres etapas de maduración de semillas de las variantes P12, N5 y N4 de *Bixa orellana*. Las muestras fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1% teñido con Red-Gel, después de la electroforesis a 90V por 35 min.



**Figura 3.2 Muestras de cDNA.** Las muestras de cDNA fueron sintetizadas a partir de las muestras de RNA total extraídas de las tres etapas de maduración de semillas de las variantes de *Bixa orellana*. Las muestras de cDNA se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con Red-Gel, después de la electroforesis a 90V por 35 min.

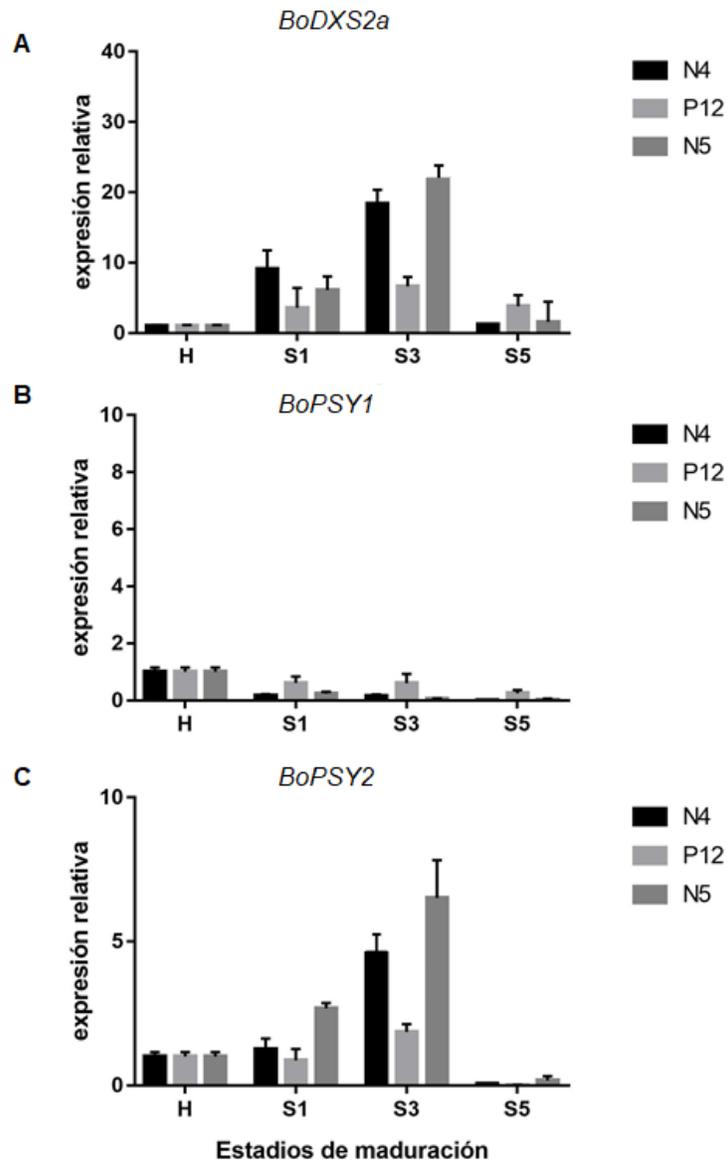
### 3.2 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR TIEMPO REAL.

Como primer paso para investigar si los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* están involucrados en la síntesis de bixina, se cuantificó sus niveles de expresión por medio de RT-qPCR durante el proceso de maduración de la semilla de tres variantes de *Bixa orellana*, con valores de acumulación de bixina distintos (Trujillo-Hernández *et al.*, 2016).

En todas las plantas el patrón de expresión de los genes analizados fue el mismo: expresión alta en las primeras etapas de maduración (S1 y S3) y una drástica disminución de la expresión en la última etapa de maduración (S5). Con lo que respecta a la expresión de los genes, la expresión de *BoDXS2a* y *BoPSY2* fue mucho más alta en todas las plantas con respecto al gen *BoPSY1* (**Figura 3.3**).

Adicionalmente, cuando se analizó la expresión individual que presentó cada gen en las plantas analizadas, se observó que la expresión de *BoDXS2a* y *BoPSY2* fue mayor en las plantas N5 y N4 las cuales se caracterizan por contener mayor bixina en sus semillas, en comparación con la planta P12. Por el contrario, aunque la expresión *PSY1* fue poco abundante en comparación con el resto de los genes analizados, la mayor expresión de este gen se presentó en la planta P12, esta planta se caracteriza por tener el menor contenido de bixina en comparación con el resto de las plantas empleadas en este estudio (**Figura 3.3**).

En conclusión los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1*, *BoPSY2* presentan un patrón de expresión análogo durante el proceso de maduración de las semillas. Adicionalmente, los genes *BoDXS2a* y *BoPSY2* se expresan en mayor abundancia en las plantas mejor productoras de bixina, en comparación de *BoPSY1* que se expresa en mayor abundancia en la planta con baja producción de bixina, lo que sugiere que de los genes analizados en este estudio, únicamente *BoPSY1* parece no participar en la biosíntesis de bixina.



**Figura 3.3** Cuantificación de la expresión de *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* por medio de RT-qPCR. En la figura **A** se muestra la expresión de *BoDXS2a*, en la figura **B** la expresión de *BoPSY1* y en la figura **C** la expresión de *BoPSY2*. La expresión de los genes se cuantifico durante el proceso de maduración de las semillas de tres variantes de *Bixa orellana*. Los valores graficados corresponde al promedio de tres replicas independientes, como gen normalizador se empleó el 18S.

### 3.3 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.

Continuando con el análisis de *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* era importante contestar si el mRNA de estos genes codifica para una enzima funcional. Para probar esta posibilidad, las secuencias de nucleótidos de los mRNA y las secuencias de aminoácidos de sus proteínas codificadas, se analizaron a través de bioinformática con el objetivo de caracterizar los transcritos y predecir la función de la proteína de cada uno.

Por medio del programa ProtParam se realizó el análisis de la secuencia de los mRNA de cada gen, por medio del cual se identificó el ORF y los parámetros de la proteína traducida de cada uno (Tabla 3.1).

Tabla 3. 1. Valores de *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* encontrados a través de ProtParam.

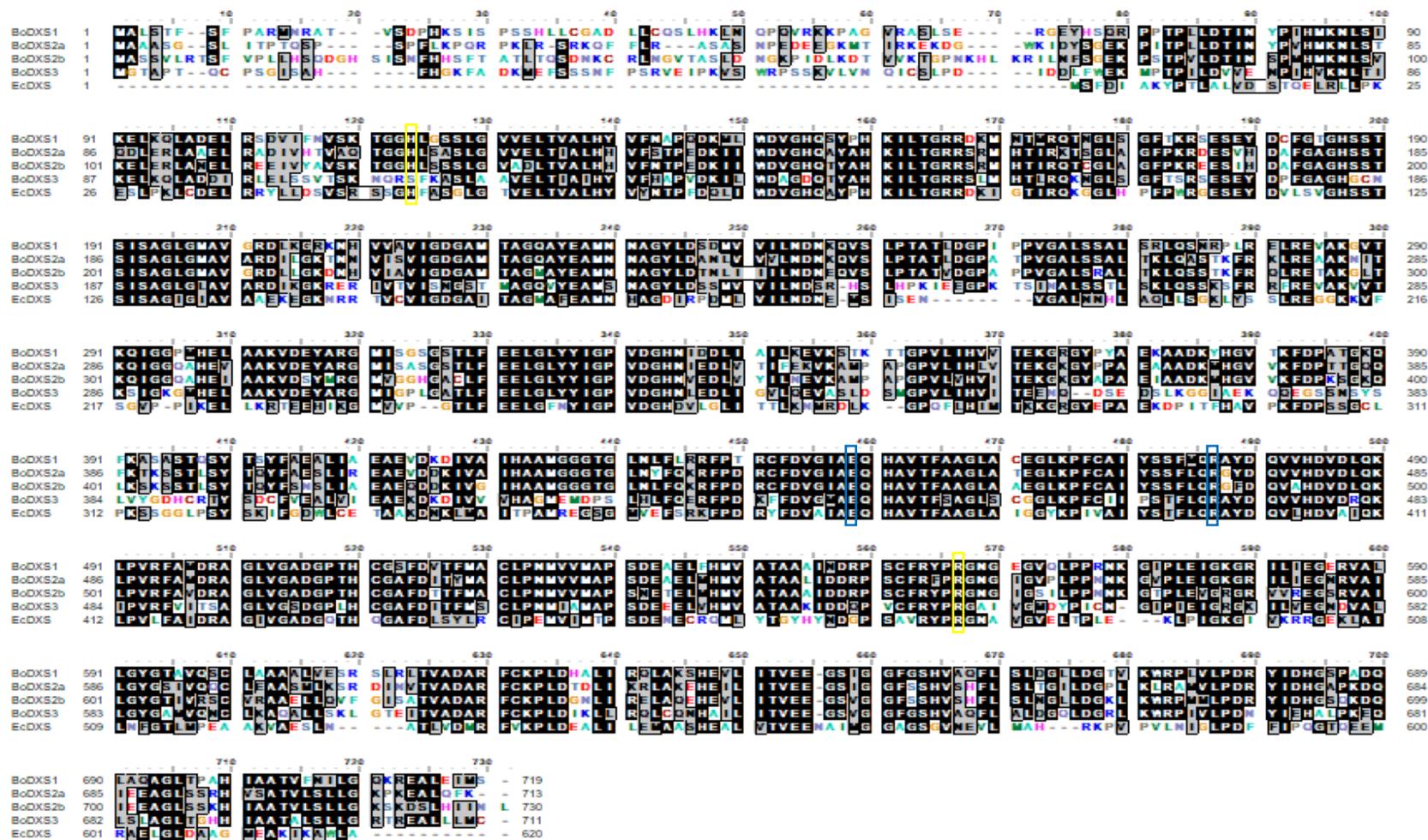
| Nombre del transcrito | ORF  | Secuencia de aminoácidos (aa) | Mw ( KDa) | pl   | GRAVY  |
|-----------------------|------|-------------------------------|-----------|------|--------|
| <i>BoDXS2a</i>        | 2142 | 713                           | 76.84     | 7.12 | -0.120 |
| <i>BoPSY1</i>         | 1320 | 439                           | 49.29     | 8.37 | -0.267 |
| <i>BoPSY2</i>         | 1182 | 393                           | 44.52     | 8.83 | -0.298 |

Por otro lado, si la proteína *BoDXS2a* tiene función 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa y las proteínas *BoPSY1* y *BoPSY2* función fitoeno sintasa, en la secuencia de sus aminoácidos se deben conservar, los aminoácidos indispensables para su función enzimática. Para localizar aminoácidos de importancia en la función enzimática, se realizaron alineamientos múltiples para ambas proteínas de manera independiente empleando el algoritmo Clustal W por medio del editor de secuencias, BioEdit. Las secuencias de aminoácidos de las DXSs de *Bixa orellana* incluida *BoDXS2a* fueron alineadas con la secuencia de aminoácidos de la proteína DXS de *Escherichia coli*, una DXS a la cual se le han realizado análisis de función y mutagénesis en busca de aminoácidos importantes para su función 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (Xiang S. *et al.*, 2007). El alineamiento evidenció que las DXSs de *Bixa orellana* excluyendo la secuencia del péptido señal, son proteínas con longitud similar a la DXS de *Escherichia coli* (620-650

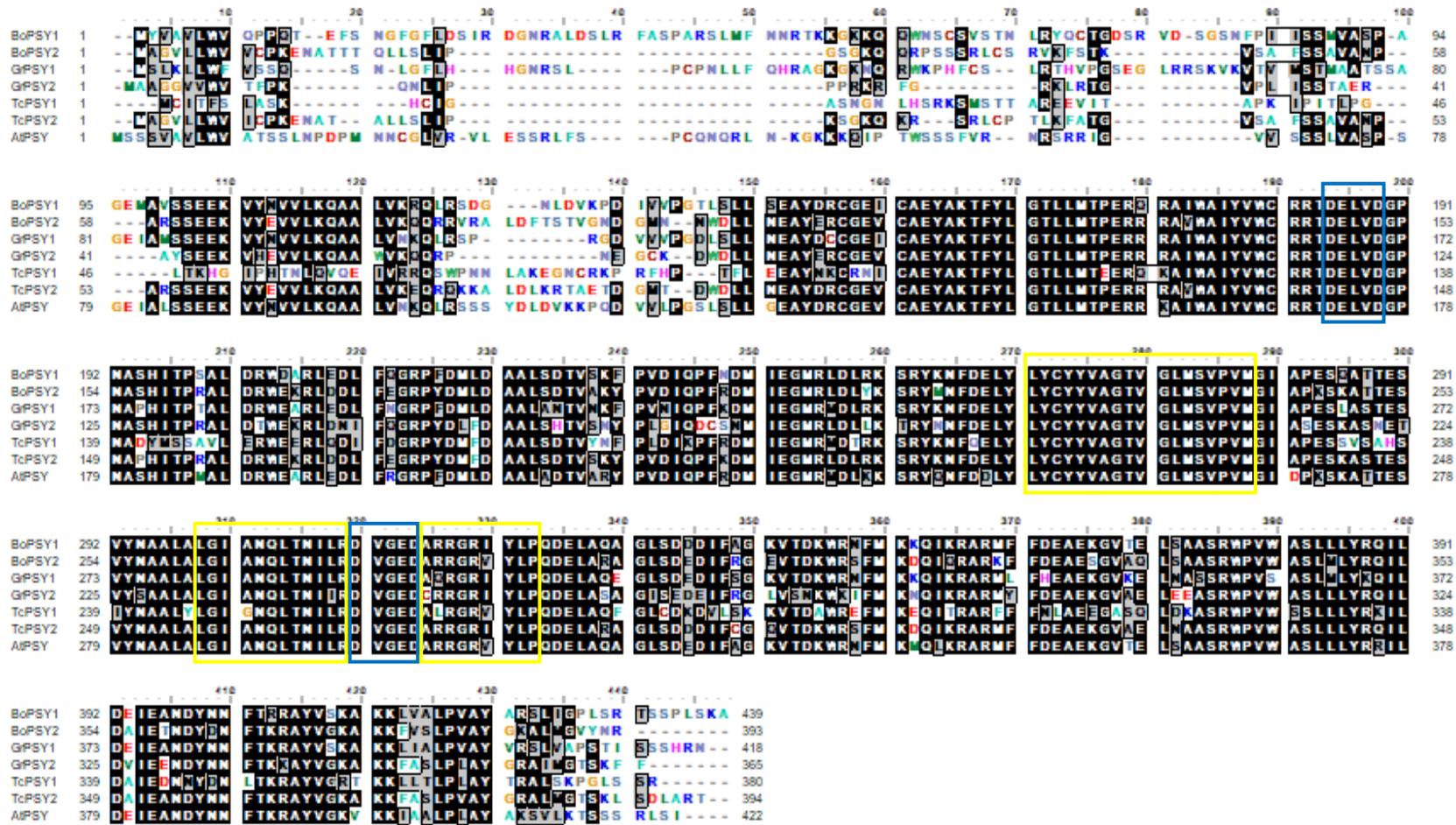
aa). Adicionalmente, cuando se analizó las secuencias, residuos de aminoácidos importantes para la función enzimática de la proteína EcDXS se encontraron conservados en la secuencias de casi todas las DXSs de *Bixa orellana* (**Figura 3.4**). Un residuo de His109, se localizó en BoDXS1, BoDXS2a y BoDXS2b pero no en BoDXS3, y un residuo de Arg552 se localizó en todas las DXS de *Bixa orellana*. Los anteriores residuos permitan la unión de la proteína EcDXS con su sustrato GAP y es muy probable que en las DXSs de *Bixa orellana* tengan la misma tarea. Así también, se identificó en todas las DXS de *Bixa orellana* residuos que participan en la unión de EcDXS con su cofactor TPP, como los residuos de Glu444 y Arg472 (Xiang S. *et al.*, 2007).

De manera similar las secuencia de aminoácidos de las PYS de *Bixa orellana*, se alinearon con las PSY funcionales de otras plantas como *Arabidopsis thaliana*. El alineamiento demostró que las PSY de *Bixa orellana* son proteínas de longitud similar a las proteínas PSY de otras plantas (380-440 aa) (Scolnik P.A. and Bartle, 1994; Cai C. *et al.*, 2014 y Motamayor *et al.*, 2013). Adicionalmente, el análisis de las secuencias de aminoácidos, permitió la identificación de dos dominios conservados ricos en aspartato que se localizan en todas las prenil transferasas tipo I y que son indispensables para la actividad catalítica (**DELVD** y **DVGED**), así también se identificó dos dominios SQS-PSY conservados (Pandit J. *et al.*, 2000; Fu *et al.*, 2014) (**Figura 3.5**).

Con base en los resultados *In silico* que señalan que *BoDXS2a* codifica una proteína DXS de longitud similar a las DXS funcional de otras plantas, y que los residuos de aminoácidos indispensables para la función 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa, se localizan en la proteína BoDXS2a. Es probable que la proteína codificada por este gen tenga función 1-desoxi-D-xilulosa-5- fosfato sintasa, al igual que las otras proteínas DXS codificadas por el resto de parálogos DXS de *Bixa orellana*, con excepción de *BoDXS3*, que es probable que codifique una proteína no funcional debido a un cambio del aminoácido: **His109** por **Ser109**. De manera similar, la coincidencia de longitud de las proteínas PSY de *Bixa orellana*, con las PSY funcionales de otras plantas, así como la localización de los dominios de aspartato indispensables para la actividad prenil transferencia en estas proteínas, indica que es probable que los genes *PSY* de achote codifiquen proteínas con función fitoeno sintasa.



**Figura 3.4** Alineamiento múltiple de las proteínas DXS. Los cuadros amarillos muestran residuos de aminoácidos conservados, que participan en la unión de la enzima con el GAP. Los cuadros azules muestran residuos de aminoácidos conservados que participan en la unión de la enzima con su cofactor tiamina pirofosfato.



**Figura 3.5 Alineamiento múltiple de las proteínas PSY.** En los cuadros azules se muestran los dominios ricos en aspartato y en los cuadros amarillos los dominios SQS-PSY.

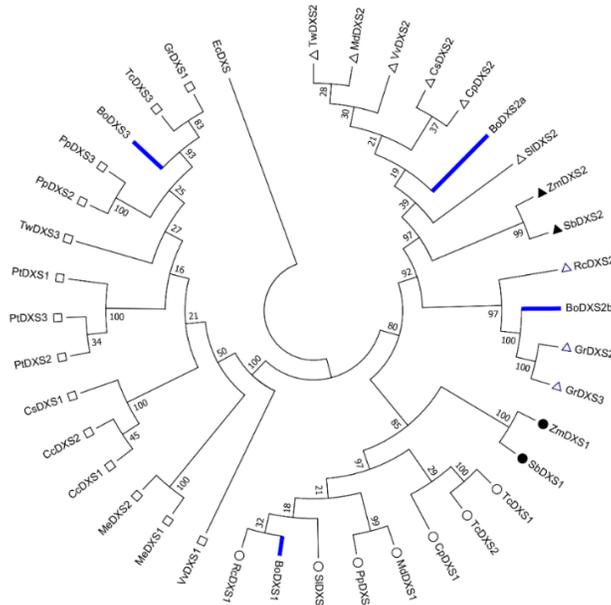
Con el objetivo de clasificar las proteínas *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* y conocer parte de su historia evolutiva, se realizó árboles filogenéticos de manera independiente, por medio del programa MEGA7. La posición evolutiva de *BoDXS2a* y de las otras tres proteínas DXS de *Bixa orellana*, junto con 34 proteínas DXS de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, se mostraron en un árbol filogenético (**Figura 3.6**). Las DXS se agruparon en tres grandes clados que se clasificaron como clado I: *BoDXS1*, clado II: *BoDXS2a* y *BoDXS2b*, y clado III: *DXS3*. Este resultado es similar a la clasificación de las DXS en otras especies (Saladie M. *et al.*, 2014). En el clado II una sub-ramificación se presentó, dividiéndolo este clado en los subclados: IIa (*DXS2a*) y IIb (*DXS2b*). Así mismo, las DXSs de *Bixa orellana* eran más idénticas a las DXS de plantas dicotiledóneas que a las DXS de monocotiledóneas. La *BoDXS2a* se localizó en el clado II, subclado IIa y es más idéntica a la *DXS2* de *Carica papaya* y *Citrus sinensis*.

Por otro lado, la posición evolutiva de *BoPSY1* y *BoPSY2*, junto con 44 proteínas PSY de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, se mostró en un árbol filogenético (**Figura 3.7**). Las PSY se agruparon en clados etiquetados como clado I: *PSY1*; Clado II: *PSY2*; clado III: *PSY3* de dicotiledóneas, y clado IV: *PSY3* de monocotiledóneas. Los clados I y II se sub-ramificaron en *PSY1* y *PSY2* de monocotiledóneas y dicotiledóneas. *BoPSY1* se agrupó en el clado I, con las *PSY1* de dicotiledóneas y presentó más identidad con la *PSY2* de *Carica papaya* y la *PSY1* de *Gossypium raimondii* y *Cucumis melo*. Asimismo, *BoPSY2* se agrupó en el clado II, con las *PSY2* de dicotiledóneas y presentó más identidad con la *PSY2* de *Teobroma cacao* y *Gossypium raimondii*.

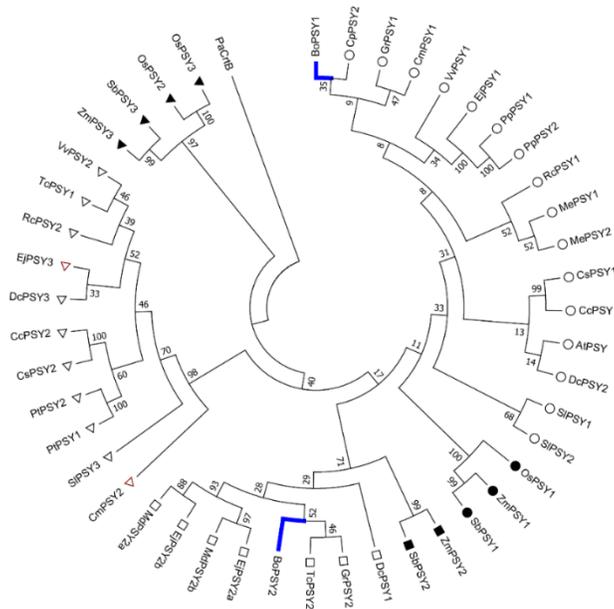
Por último, con el objetivo de conocer la estructura terciaria de las proteínas DXS y PSY de *Bixa orellana* e identificar su centro activo, se realizó un modelado por homología por medio del programa UCSF Chimera, empleando información tridimensional de enzimas que comparten dominios proteínicos conservados y catalizan reacciones similares.

Al igual que la DXS de las plantas, la DXS de bacterias catalizan la reacción de condensación entre el piruvato y el GAP para formar 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DOXP). De forma similar, al igual que la PSY, la escualeno sintasa cataliza reacciones de cabeza-cabeza de los fenil difosfatos para formar terpenos lineales.

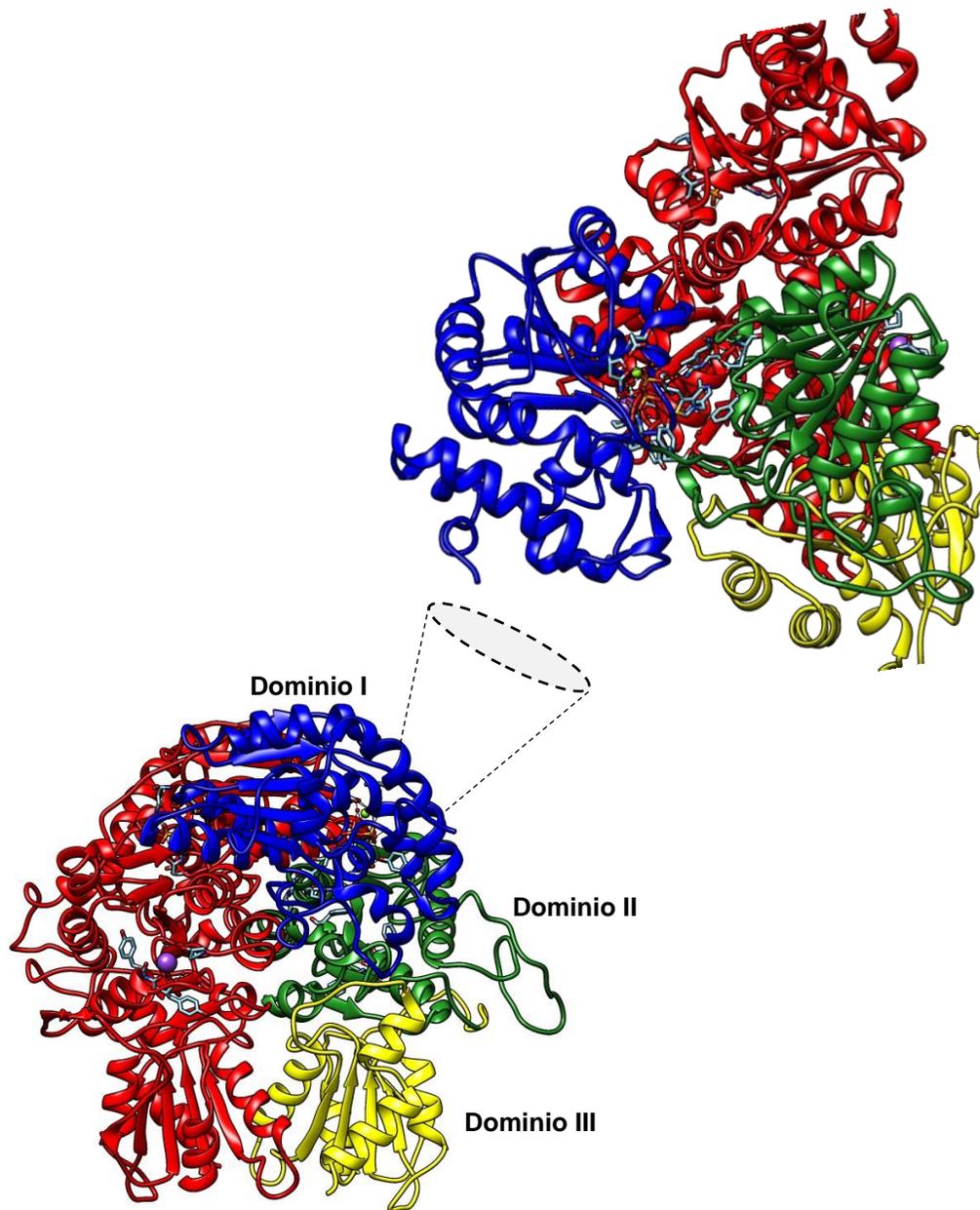
Nuestras predicciones sobre el modelado de la proteína BoDXS2a mostraron que es un homodímero con tres dominios en cada monómero, cada dominio presenta alfa-hélices que envuelven láminas beta. La región putativa del sitio catalítico de BoDXS2a se localizó entre el dominio I y II, donde se ubicaron los residuos de aminoácidos identificados a través del alineamiento múltiple (Glu444 y Arg472) y que participan en la unión del cofactor tiamina pirofosfato (**Figura 3.8**). En el caso del modelado de las proteínas PSY de *Bixa orellana*, nuestras predicciones, mostraron que son estructuras ricas en alfa hélices, con alfa hélices antiparalelas que forman una cavidad central. Los dos dominios ricos en aspartato conservados e identificados a través del alineamiento múltiple ((DELVD y DVGED) se localizaron en alfa-hélices opuestas dentro de la cavidad central, donde se predice que ocurre la condensación cabeza-cabeza de las moléculas GGPP (**Figura 3.9**). No se registraron importantes cambios de aminoácidos en la secuencia de BoDXS2a, BoPSY1 y BoPSY2 que pudiera afectar la estructura de la región putativa de sus sitios catalíticos.



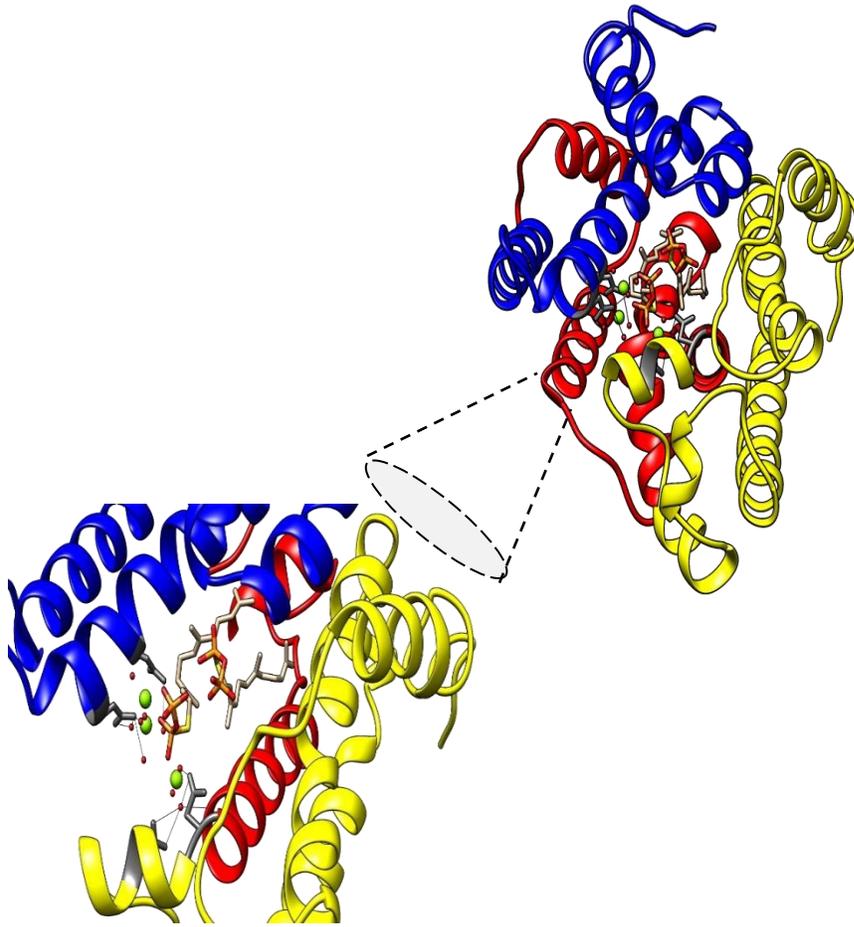
**Figura 3.6 Análisis filogenético de las proteínas DXS.** La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de la matriz JTT. El análisis involucró 38 secuencias de aminoácidos: *Bixa orellana* (*BoDXS1*; AMJ39459.1, *BoDXS2a*; AMJ39460.1 *BoDXS2b*; AMJ39461.1, *BoDXS3*; AMJ39462.1), *Theobroma cacao* (*TcDXS1*; EOY06358.1, *TcDXS2*; EOY06359.1, *TcDXS3*; EOY31425.1), *Gossypium raimondii* (*GrDXS1*; XP\_012474408.1, *GrDXS2*; XP\_012473158.1, *GrDXS3*; XP\_012473159.1), *Tripterygium wilfordii* (*TwDXS2*; AKP20998.1, *TwDXS3*; AKP20999.1), *Citrus sinensis* (*CsDXS1*; XP\_006483308.1, *CsDXS2*; XP\_006466336.1), *Vitis vinifera* (*VvDXS1*; XP\_002282428.1, *VvDXS2*; XP\_002266925.1), *Malus domestica* (*MdDXS1*; XP\_008340868.1, *MdDXS2*; XP\_008338474.1), *Zea Mays* (*ZmDXS1*; AAX49359.1, *ZmDXS2*; AAX49358.1), *Sorghum bicolor* (*SbDXS1*; XP\_002441088, *SbDXS2*; XP\_002459488.1), *Carica papaya* (*CpDXS1*; XP\_021904955.1, *CpDXS2*; XP\_021897429.1), *Prunus pérsica* (*PpDXS1*; XP\_007225144.2, *PpDXS2*; XP\_020410722.1, *PpDXS3*; XP\_020410723.1), *Populus trichocarpa* (*PtDXS1*; XP\_024445464.1, *PtDXS2*; XP\_024445465.1; *PtDXS3* XP\_024445466.1), *Citrus clementina* (*CcDXS1*; XP\_006450503.1, *CcDXS2*; XP\_024033824.1), *Ricinus communis* (*RcDXS1*; XP\_015573388.1, *RcDXS2*; XP\_002533688.1), *Manihot esculenta* (*MeDXS1*; XP\_021607979.1, *MeDXS2*; XP\_021607981.1), *Solanum lycopersicum* (*SIDXS1*; NP\_001234672.1, *SIDXS2*; CAZ66649.1), *Escherichia coli* (*EcDXS*; 2O1S). Los círculos sin relleno representa el clado de las DXS tipo I de dicotiledóneas y los círculos rellenos el mismo clado de DXS pero de especies monocotiledóneas, en cambio los triángulos con contorno negro sin relleno representan a las DXS del clado IIa y los triángulos con contorno azul sin relleno a las DXS del clado IIb, por último los cuadros representan el clado de las DXS tipo III. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA7.



**Figura 3.7 Análisis filogenético de las proteínas PYS.** La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de la matriz JTT. El análisis involucró 46 secuencias de aminoácidos: *Bixa orellana* (BoPSY1: AMJ39471.1, BoPSY2:AMJ39472.1), *Gossypium raimondii*, (GrPSY1: AIJ00007.1, GrPSY2: XP\_012459972.1), *Manihot esculenta* (MePSY1: ACY42666.1, MePSY2: ACY42670.1) *Theobroma cacao* (TcPSY1: EOY32351.1, TcPSY2: XP\_007048944.1), *Populus trichocarpa* ( PtPSY1: XP\_024452991.1, PtPSY2: XP\_002304008.2), *Citrus sinensis* (CsPSY1: XP\_006481943.1, CsPSY2: XP\_006492716.1), *Carica papaya* (CpPSY2: XP\_021910865.1), *Ricinus Communis* (RcPSY1: EEF29412.1, RcPSY2: XP\_002527067.1), *Citrus clementina* (CcPSY1: AIU48701.1, CcPSY2: XP\_006445819.1), *Vitis vinifera* (VvPSY1: AFP28795.1, VvPSY2: XP\_010651361.1), *Prunus pérsica* (PpPSY1: AIU48724.1, PpPSY2: XP\_007215407.1), *Zea mays* (ZmPSY1: NP\_001108124.2, ZmPSY2: NP\_001108117.1, ZmPSY3: ABD17618.1), *Sorghum bicolor* (SbPSY1: AAW28996.1, SbPSY2: XP\_002442578.1, SbPSY3: AAW28997.1), *Oryza sativa* (OsPSY1: AAS18307.1, OsPSY2: XP\_015611707.1, OsPSY3: ACI62767.1), *Solanum lycopersicum* (SIPSY1: ABU40773.1, SIPSY2: ABV68559.1, SIPSY3: Solyc01g005940), *Arabidopsis thaliana* (AtPSY: AED92400.1), *Daucus carota* (DcPSY1: DQ192186.1, DcPSY2: DQ192187.1, DcPSY3: XP\_017217851.1), *Cucumis melo* (CmPSY1: JF745118.1, CmPSY3 JF745117.1), *Eriobotrya japónica* (EjPSY1: KF922363.1, EjPSY2a: KF922364.1, EjPSY2b: KF922366.1, EjPSY3: KF922367.1), *Malus domestica* (MdPSY2a: MDP0000151924, MdPSY2b: MDP0000237124), *Pantoea ananatis* (paCrtB: BAA14128.2). Los círculos, cuadros y triángulos sin color representan a el grupo de las PSY1, PSY2 y PSY3 de dicotiledóneas, respectivamente, en cambio los anteriores símbolos a color representan los mimos clados pero de especies monocotiledóneas. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA7.



**Figura 3.8 Estructura de BoDXS2a modelado por homología.** El dominio I se muestra en color azul, el dominio II en verde y el dominio III en amarillo, la parte de la estructura en rojo, corresponde al otro monómero. La figura muestra el sitio activo putativo de la proteína BoDXS2a y su interacción con la molécula de TPP, que se muestra forma de bastones. El modelado se realizó en UCSF Chimera

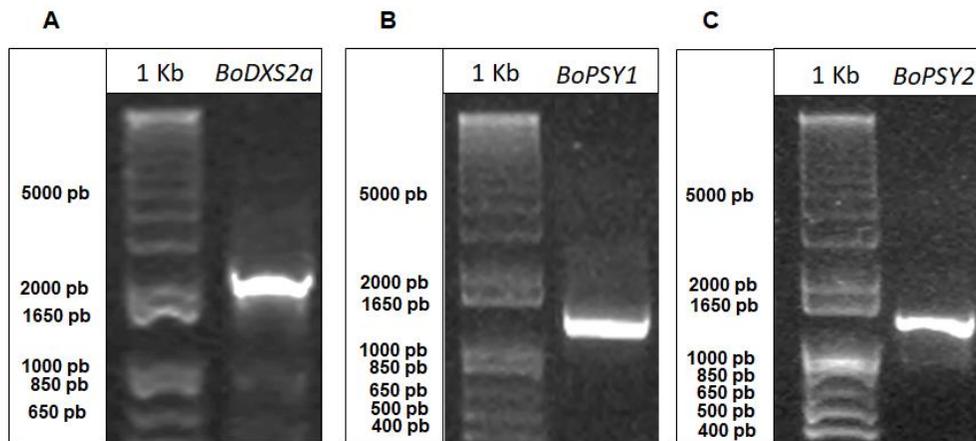


**Figura 3.9 Estructura de BoPSY2 modelado por homología.** En la figura se observan las alfa hélices que conforman la proteína PSY de *Bixa orellana*. Estos residuos forman una cavidad en donde se observa la localización de los residuos de aspartato, señalados en forma de bastones de color gris, así como los iones de magnesio (esferas verdes) que permiten la interacción de la proteínas PSY con su sustrato el GGPP ( moléculas en forma de bastón de color blanco con extremos amarillo-rojo). El modelado se realizó en UCSF Chimera

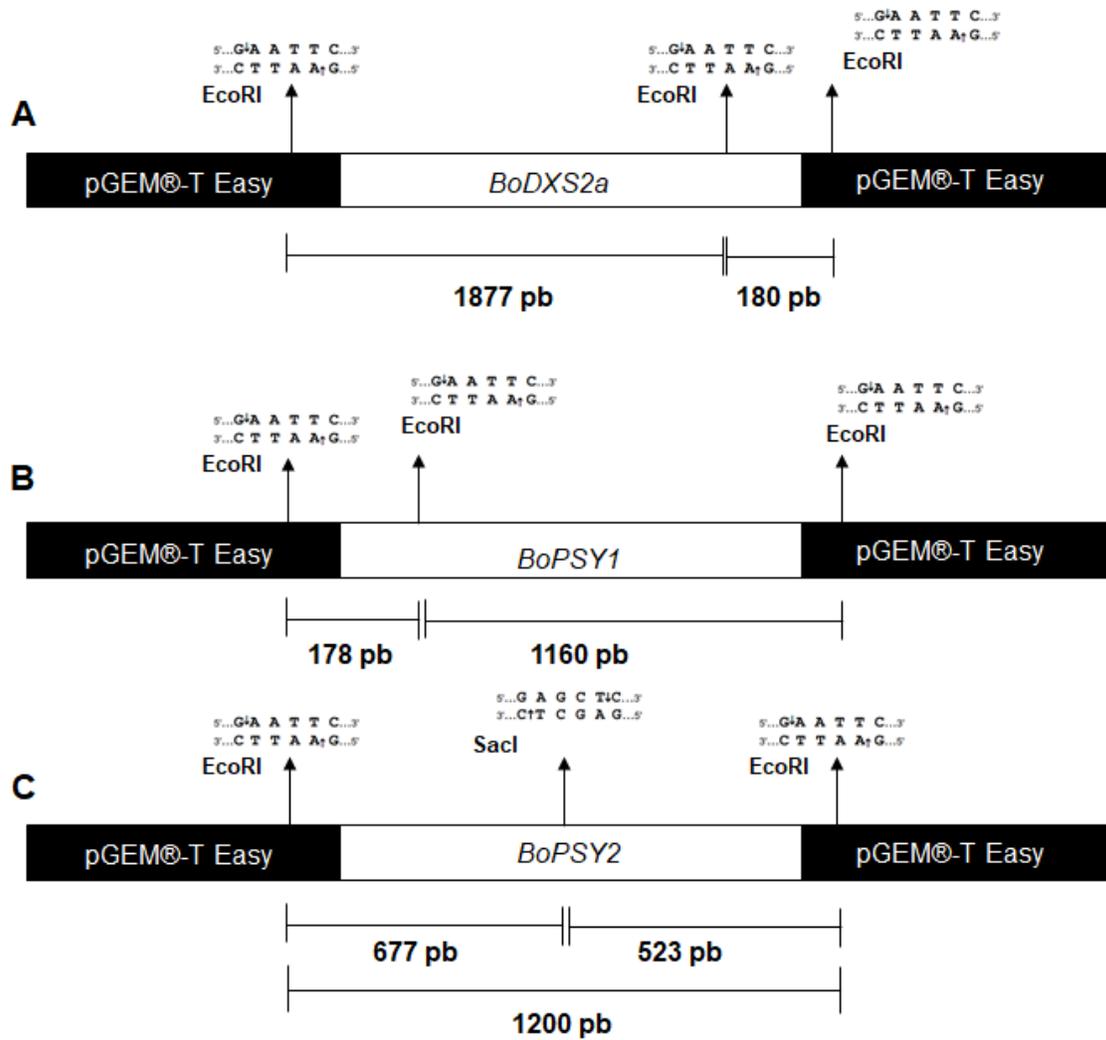
### 3.4 AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DEL ORF DE *BoDXS2a*, *BoPSY1* Y *BoPSY2*.

Con el objetivo de verificar la función enzimática de *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* mediante el análisis de complementación de color, se procedió a aislar y clonar el ORF de los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2*. Los ORF fueron aislados mediante PCR usando cebadores OR específicos, diseñados para cada gen. Los fragmentos que coincidieron con el tamaño de banda esperado (**Figura 3.10**), se clonaron en el vector pGEM y los constructos se analizaron con enzimas de restricción.

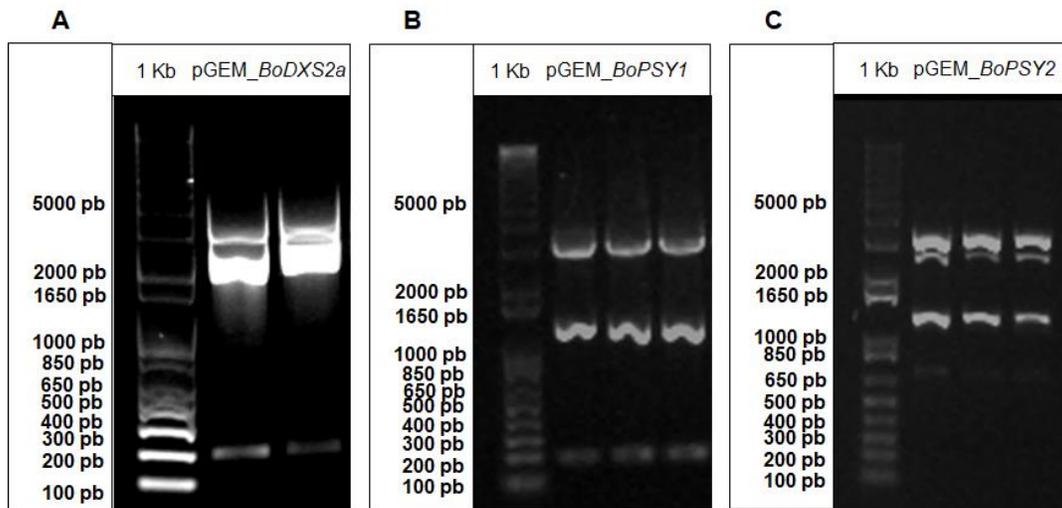
Los resultados de las digestiones sobre los constructos: pGEM\_*BoDXS2a*, pGEM\_*BoPSY1* y pGEM\_*BoPSY2* indicaron la realización de cortes por digestión en las posiciones predichas por computadora (**Figura 3.11**) y que se pudieron visualizar por el patrón de bandeo que presentó cada constructo digerido (**Figura 3.12**).



**Figura 3.10 Amplificación del ORF de *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2*.** En la figura **A** se muestra la banda que corresponde al ORF de *BoDXS2a*, en la figura **B** la banda que corresponde al ORF de *BoPSY1* y por último, en la figura **C** la banda que corresponde al ORF de *BoPSY2*. Las muestras se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con Red-Gel, después de la electroforesis a 90V por 35 min.



**Figura 3.11 Predicción de cortes por medio de enzimas de restricción sobre los constructos pGEM.** En la figura **A** se puede observar los cortes que realiza la enzima EcoRI sobre pGEM\_BoDXS2a, en la figura **B** los cortes que realiza esta misma enzima sobre pGEM\_BoPSY1 y por último, en la figura **C** se muestran los cortes que realizan las enzimas EcoRI/SacI sobre el constructo pGEM\_BoPSY2.



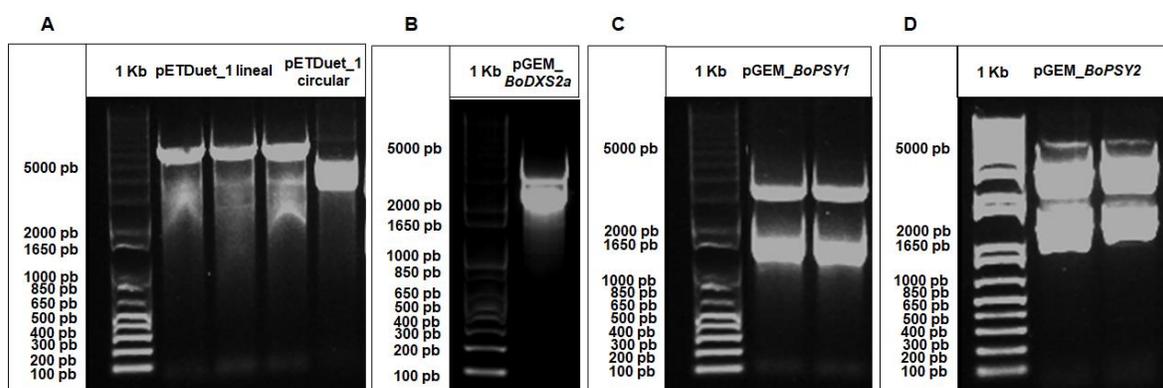
**Figura 3.12 Digestión de los constructos pGEM\_BoDXS2a, pGEM\_BoPSY1 y pGEM\_BoPSY2 con enzimas de restricción.** La figura **A** muestra el patrón de bandeo que se generó después de digerir el constructo pGEM\_BoDXS2a con la enzima EcoRI, en la figura **B** el patrón de bandeo que generó después de digerir el constructo PGEM\_BoPSY1 con la misma enzima anterior, y por último, en la figura **C** se muestra el patrón de bandeo que se generó después de digerir el constructo pGEM\_BoPSY2 con las enzimas EcoRI/SacI. Las muestras se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con Red-Gel, después de la electroforesis a 90V por 35 min.

Con base en los resultados anteriores podemos confirmar que el ORF de los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* fue aislado y clonado correctamente.

### 3.5 ELABORACIÓN DE LOS CONSTRUCTOS: pET\_*BODXS2a*, pET\_*BoPSY1* Y pET\_*BOPSY2*.

La expresión de genes eucariotas en bacterias valiéndose de plásmidos, ha facilitado el análisis de su función y de su producto proteínico. Para analizar la función de la proteína de los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2*, el ORF de cada gen se colocó en el plásmido de expresión pETDuet\_1, mediante la formación intencionada de extremos cohesivos en los ORFs, complementarios a los extremos del pETDuet\_1 lineal.

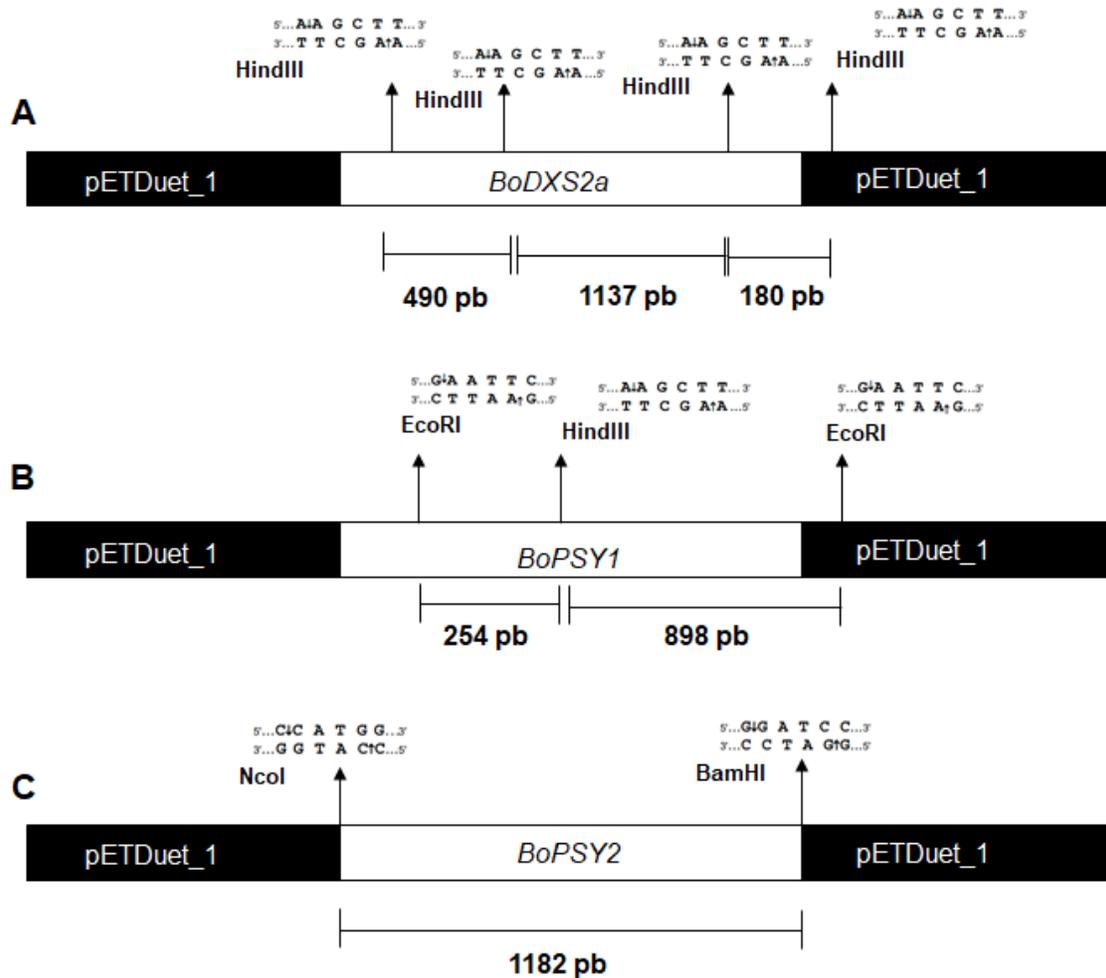
La digestión sobre el constructo pGEM\_*BoDXS2a* y pETDuet\_1 con las enzimas BamHI/Sall, y la digestión sobre los constructos pGEM\_*BoPSY1*, pGEM\_*BoPSY2* y sobre el plásmido de expresión pETDuet\_1 con las enzimas NcoI/BamHI, permitió la liberación de los ORFs del vector pGEM y linearizó el vector pETDuet\_1, logrando adicionalmente la formación de extremos cohesivos en las moléculas de DNA (Figura 3.13).



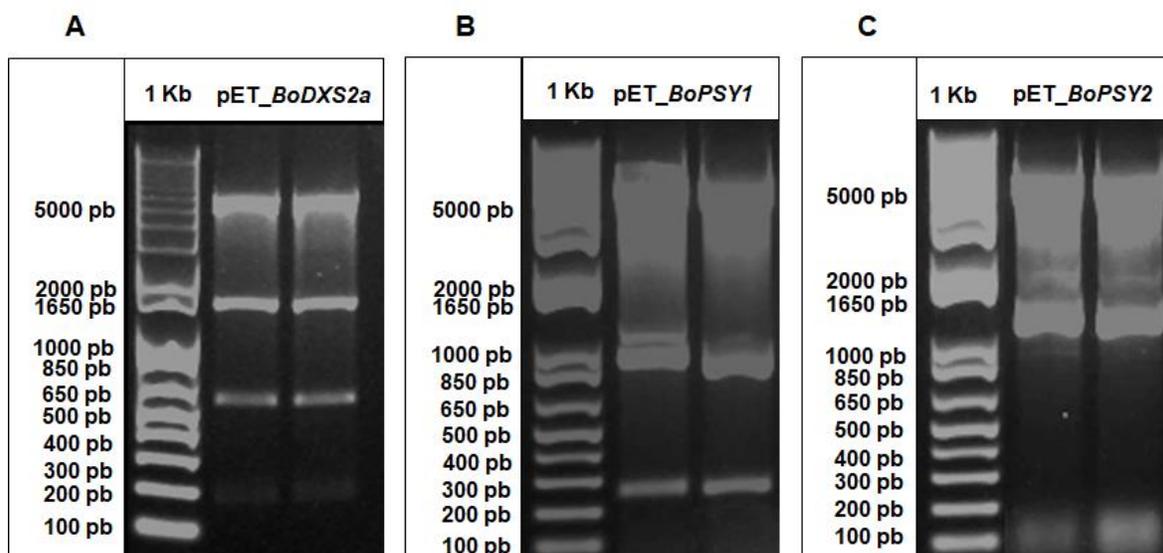
**Figura 3.13 Liberación de los ORFs y linearización del plásmido pETDuet\_1 por medio de enzimas de restricción.** En la figura A se puede observar el plásmido pETDuet\_1 linearizado, en la figura B se muestra el ORF de *BoDXS2a*, en la figura C el ORF de *BoPSY1* y por último, en la figura D el ORF de *BoPSY2*. Todos los ORFs fueron liberados del plásmido de clonación pGEM por medio de enzimas de restricción. Las muestras se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con Red-Gel, después de la electroforesis a 90V por 35 min.

Los constructos: pET\_*BoDXS2a*, pET\_*BoPSY1* y pET\_*BoPSY2* que se generaron después de ligar cada ORF al vector de expresión pETDuet\_1, fueron analizados con enzimas de restricción. Un primer análisis se realizó empleando la enzima de restricción HindIII sobre el constructo pET\_*BoDXS2a*, un segundo análisis empleando las enzimas EcoRI/HindIII

sobre el constructo pET\_*BoPSY1* y un último tercer análisis se realizó empleando las enzimas de restricción NcoI/BamHI sobre el constructo pET\_*BoPSY2*. Los resultados de la digestión indicaron cortes realizados por las enzimas de restricción, en los sitios de los constructos pET, predichos por el análisis en computadora (**Figura 3.14**), y que pudieron ser visualizados por el patrón de bandeo que presentó cada constructo digerido (**Figura 3.15**).



**Figura 3.14 Predicción de cortes por medio de enzimas de restricción sobre los constructos pET.** En la figura **A** se muestran los cortes realizados por HindIII sobre el constructo pET\_*BoDXS2a*, en la figura **B** se muestran los cortes realizados por las enzimas EcoRI/HindIII sobre el constructo pET\_*BoPSY1* y por último, en la figura **C** se muestran los cortes realizados por las enzimas NcoI/BamHI sobre el constructo pET\_*BoPSY2*.



**Figura 3.15 Constructos pET digeridos con enzimas de restricción.** En la figura **A** se muestra el patrón de bandeo generado después de digerir el constructo pET\_BoDXS2a con la enzima HindIII, en la figura **B** se muestra el patrón de bandeo generado después de digerir el constructo pET\_BoPSY1 con las enzimas de restricción EcoRI/HindIII y por último, en la figura **C** se muestra el patrón de bandeo generado después de digerir el constructo pET\_BoPSY2 con las enzimas de restricción NcoI/BamHI. Las muestras se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con Red-Gel, después de la electroforesis a 90V por 35 min.

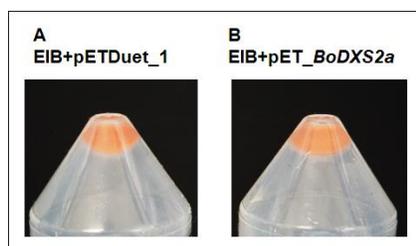
Con base en los resultados anteriores, confirmamos que la sub-clonación del ORF de cada gen, en el plásmido de expresión pETDuet\_1 fue de forma correcta.

### 3.6 COMPLEMENTACIÓN DE COLOR

La elaboración del transcriptoma, permitió identificar moléculas de mRNA implicados en la ruta: MEP, carotenoides y bixina, como los mRNA de *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2*. Sin embargo, la pregunta de que si estos mRNA codifican proteínas funcionales aún no estaba resuelta. Para responder esta cuestión, se elaboraron los plásmidos constructos: pET\_*BoDXS2a*, pET\_*BoPSY1* y pET\_*BoPSY2* y se emplearon en el desarrolló la metodología de complementación de color.

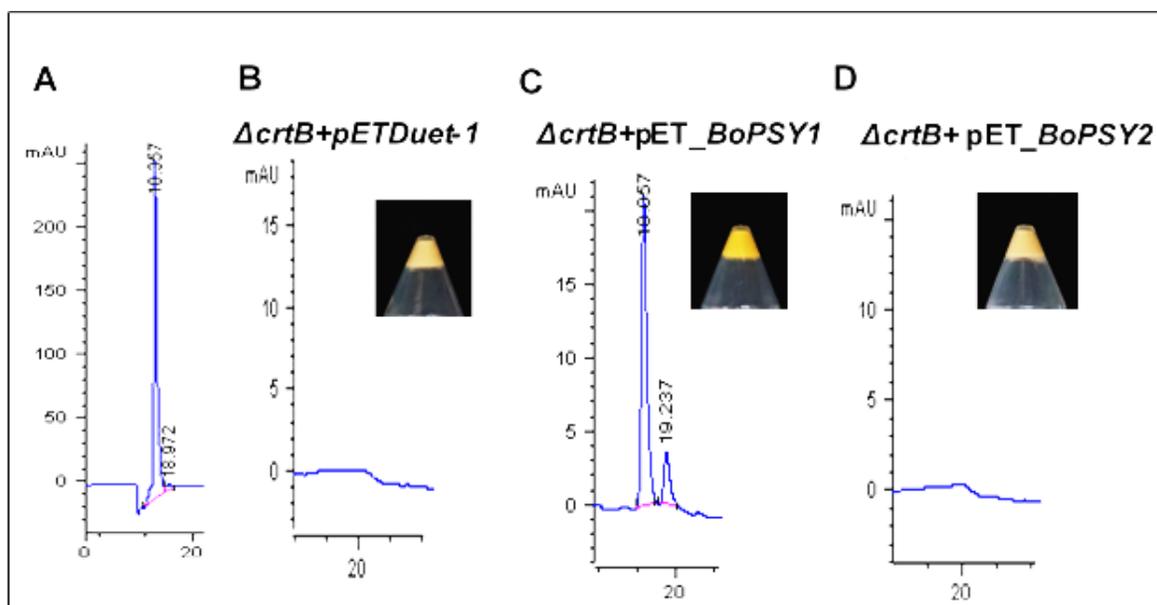
A continuación, se cotransformaron con el constructo pET\_*BoDXS2a* cepas de *E. coli* que albergan el plásmido pACCRT-EIB, para probar la actividad 1-desoxi-D-xilulosa-5 fosfatosa sintasa, siguiendo el criterio de los experimentos de Yuru Tong *et al.*, (2015). De manera similar, se cotransformaron con los constructos pET\_*BoPSY1* y pET\_*BoPSY2* de forma individual, en cepas de *E. coli* que albergan el plásmido pACCAR25 $\Delta$ crtB, para probar la actividad fitoeno sintasa.

Las células de *Escherichia coli* que albergan el plásmido pACCRT-EIB produjeron el carotenoide licopeno, como se esperaba, aun cuando se cotransformaron con el constructo pETDuet\_1 vacío, estas células sirvieron como control negativo. Las células de *Escherichia coli* que albergan el plásmido pACCRT-EIB y se cotransformaron con el constructo pET\_*BoDX2a*, de igual manera fueron capaces de producir licopeno, pero no se observó un aumento en el flujo del carotenoide que se le pudiera atribuir a *BoDXS2a* (**Figura 1.16**).



**Figura 3.16** Análisis de la función de *BoDXS2a* por complementación de color. Células de *Escherichia coli* que albergan el plásmido pACCRT-EIB fueron transformadas con el constructo pET\_*BoDXS2a*. La transformación de las células con el pETDuet\_1 vacío se empleó como control. El análisis de la función fue con base en aumento del flujo del licopeno como se propone en el trabajo de Yuru Tong *et al.*, (2015).

Con respecto a la función de las PSY, las células de *Escherichia coli* que albergan el plásmido pACCAR25 $\Delta$ crtB no produjeron el producto final de la ruta, la zeaxantina, cuando se cotransformaron con el plásmido pETDuet\_1 vacío, estas células sirvieron como control negativo. Las células de *Escherichia coli* que albergan el plásmido pACCAR25 $\Delta$ crtB y se cotransformaron con el plásmido pET\_BoPSY1, fueron capaces de producir zeaxantina, pero no produjeron el carotenoide cuando se cotransformaron con el plásmido pET\_BoPSY2. El análisis por HPLC de extractos de carotenoides de los cultivos celulares de *Escherichia coli*, mostró un pico de zeaxantina que coincidía con el tiempo de retención y espectro del estándar de zeaxantina, en el extracto de bacterias que se cotransformaron con el plásmido pET\_BoPSY1, pero el pico no estaba presente en los extractos de bacterias que se cotransformaron con el plásmido pET\_BoPSY2, así como tampoco en el control (Figura 3.17).



**Figura 3.17 Análisis de la función de BoPSY1 y BoPSY2 por complementación de color.** Células de *Escherichia coli* que albergan el plásmido pACCAR25 $\Delta$ crtB fueron transformadas con los constructos de PSY. Como control se tiene el plásmido pETDUET\_1 vacío. La presencia de zeaxantina se detectó a 450 nm y se determinó en los extractos, por comparación de los tiempos de retención con el estándar comercial de Zeaxantina marca Sigma (CAS: 144-68-3).

Con base en los resultados anteriores, se confirmó en bacterias: que el mRNA de *BoDX2a* codifica una proteína sin función 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa. Así mismo de los dos mRNA de *PSY* analizados, se confirmó que únicamente la proteína codificada por el gen *BoPSY1* tiene función fitoeno sintasa.

## CAPITULO IV

### DISCUSIÓN GENERAL

*Bixa orellana* L. es un cultivo de importancia agronómica por ser la fuente natural de la bixina, un apocarotenoide que procede del licopeno. La bixina se sintetiza y acumula en las semilla de *Bixa orellana*, además este apocarotenoide es empleado como pigmento natural en los productos de la industria alimentaria, cosmética y textil (Vilar et al 2014; Raddatz-Mota et al., 2017). Los estudios indican que la ruta de biosíntesis de bixina se coordina con las rutas metileritritol fosfato (MEP) y carotenoides (Cárdenas-Conejo et al., 2015), por lo tanto es necesario estudiar los genes de estas últimas dos rutas con el objetivo de comprender el mecanismo bioquímico implicado en la biosíntesis de bixina.

Se sabe que el paso donde participa la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa y fitoeno sintasa desempeña un papel importante en la ruta metileritritol fosfato y carotenoides, respectivamente: debido a la posición que ocupan estas enzimas como el primer paso comprometido y que controla la ruta a la que pertenece (Toledo Ortiz et al., 2010; Estévez et al., 2001). Se sabe que muchas especies de plantas superiores tienen múltiples genes *DXS* y *PSY* (López-Emparán et al., 2014; Fu X. et al., 2014; Yuru Tong et al., 2015), incluida *Bixa orellana*. Los múltiples genes *DXS* y *PSY* resaltan el problema de la diversidad funcional debido al potencial para adquirir subfuncionalización o incluso perder la función original (Kramer et al., 2004). Anteriormente la expresión de los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* fueron estudios en tejidos de *Bixa orellana*. Por lo tanto, continuando con el estudio de estos genes mencionados anteriormente, el objetivo de este estudio fue determinar si están involucrados en la biosíntesis de bixina.

Para la biosíntesis de cualquier tipo de isoprenoide, es necesario la disponibilidad de moléculas de IPP que pueden provenir de la ruta MVA o MEP (Rodríguez-Concepción et al., 2012). Los estudios señalan que las moléculas de IPP sintetizadas por medio de la ruta MEP se emplean como bloques en la producción de carotenoides (Lichtenthaler et al., 1997; Rohmer et al., 1999). La biosíntesis del IPP por la vía MEP comienza con la producción de 1-Desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP). Esta reacción es catalizada por la enzima *DXS* (Sprenger et al., 1997; Lois et al., 1998), que está codificada por al menos cuatro genes nucleares en *Bixa orellana*, este número de genes coincide con el número de genes *DXS*

encontrados en *Cucumis melo* (Saladie *et al.*, 2014). Por otro lado, la biosíntesis de carotenoides comienza con la producción de fitoeno, un carotenoide incoloro. Esta reacción es catalizada por PSY (Dogbo *et al.*, 1988), que está codificada por al menos dos genes nucleares en *Bixa orellana*, este mismo número de genes PSY coincide con los encontrados en el genoma de *Nicotiana tabacum L.* y *Daucus carota L.* (Busch y Seuter, 2002; Rodríguez-Concepción y Stange, 2013).

La familia de genes *DXS* de *Bixa orellana* codifica enzimas con motivos *DXS* característicos, y la estructura tridimensional de la proteína codificada por el gen *BoDXS2a* contiene un sitio activo *DXS* putativo. Adicionalmente, con excepción del gen *BoDXS3*, las proteínas que se codifican a partir del resto de los genes *DXS* contiene en su secuencia de aminoácidos, residuos de aminoácidos indispensables para la unión de la enzima con su cofactor tiamina pirofosfato (TPP) y para la interacción con su sustrato el gliceraldehído-3-fosfato (GAP). Asimismo, la familia de genes *PSY* de *Bixa orellana*, codifican enzimas con motivos *PSY* característicos, como son los dos motivos ricos en aspartato (DELVD y DVGED). La estructura tridimensional de la proteína *PSY* tienen un sitio activo *PSY* putativo. El nivel más alto de variabilidad entre las secuencia de aminoácidos de las proteínas *DXS* y *PSY* de *Bixa orellana* se encontró en la región correspondiente al péptido señal.

Desde otro ángulo, los arboles filogenéticos señalaron que las proteínas *DXS* y *PSY* de *Bixa orellana* evolucionaron bajo restricción funcional y se agrupan con base en su función y no a la especie a la cual pertenecen, reforzando la teoría de que las duplicaciones de los genes *DXS* y *PSY* ocurrieron antes de la división de los primeros linajes de plantas (Walter *et al.*, 2002). Adicionalmente, todas las *DXS* y *PSY* de *Bixa orellana* presentaron mayor cercanía evolutiva con las *DXS* y *PSY* de especies dicotiledóneas, en comparación con las monocotiledóneas, esto podría indicar que los procesos de divergencia funcional continúan aun después de la separación de dicotiledóneas/monocotiledóneas.

Aunque las predicciones en *in silico* indicaron que los genes *DXS* y *PSY* de *Bixa orellana* codifican probablemente enzimas activas, solo su caracterización funcional podría confirmar la capacidad de cada uno de estos genes para actuar como 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa y fitoeno sintasa, respectivamente. Los análisis de la función de *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* con el uso de un sistema de complementación heterólogo confirmaron que el gen *BoDXS2a* no tiene función 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa al no poder

augmentar el flujo de licopeno en las bacterias. Así también se confirmó que de los dos genes *PSY*, únicamente *BoPSY1* podría complementar las cepas de *E. coli* deficientes en fitoeno sintasa y producir zeaxantina. Sin embargo, se debe tener en cuenta que si bien la expresión heteróloga de genes de plantas en bacterias es un método ampliamente utilizado, el entorno plástico en el que funcionan estas enzimas está ausente, lo que puede afectar la actividad catalítica debido a la localización inadecuada de la enzima por falta de sus interacción con membranas y/o la formación de complejos de proteínas unidos a membranas. Por ejemplo en *Sinapsis alba* la actividad fitoeno sintasa de *PSY*, únicamente fue detectado en fracciones del pellet membranosos de los plastos, siendo mucho más alto en cloroplastos que en etioplastos, confirmando que la asociación a membranas es esencial para la actividad de esta enzima (Welsch et al., 2000). Por lo tanto aún queda por verse si la actividad de las proteínas *BoDXS2a* y *BoPSY2* se ve afectada por la formación de complejos de proteínas unidos a membranas.

*La expresión de BoDXS2a y BoPSY2 se correlaciona con la presencia de bixina*

Sumado a esto, examinamos los niveles de transcripción de *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* para averiguar si estos genes están implicados en la biosíntesis de bixina. Los resultados indicaron que los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* presentan alta expresión en las primeras etapas del desarrollo de las semillas de *Bixa orellana*. Sin embargo, los genes *BoDXS2a* y *BoPSY2* presentaron mayor expresión respecto a *BoPSY1* en las variantes con mayor producción de bixina, además *BoDXS2a* y *BoPSY2* mostraron un mismo patrón de expresión. Los resultados de la alta expresión de los genes analizados, en las primeras etapas del desarrollo de la semilla, concuerda con la mayor presencia de bixina en las semillas en estas mismas etapas de maduración (Carballo-Uicab, 2013). Además, el hecho de que los genes *DXS2a* y *BoPSY2* presenten mayor expresión en las variantes con alta bixina, sugiere que estos genes están directamente involucrados en la ruta MEP y carotenoides, que se coordinan con la ruta de biosíntesis de bixina durante la producción del apocarotenoide en las semillas. Aun cuando los análisis de complementación de color indiquen que estas proteínas no tienen función en bacterias.

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

#### **5.1. CONCLUSIONES**

De los genes *BoDXS2a*, *BoPSY1* y *BoPSY2* analizados en este estudio, se concluye que los genes *BoDXS2a* y *BoPSY2* podrían estar involucrados en la biosíntesis de bixina. Sin embargo, la función de sus proteínas es escasa en bacterias por lo que es muy probable que la función dependa de un ambiente celular distinto al que se localiza en estas células.

## 5.2. PERSPECTIVAS

La confirmación del papel de los genes *BoDXS2a* y *BoPSY2* en la biosíntesis de bixina, incentiva a continuar estudiándolos. Entre nuestras perspectivas está:

1. Analizar la función de las proteínas codificadas por los genes *BoDXS2a* y *BoPSY2* en un sistema heterólogo vegetal, y al mismo tiempo identificar su localización celular.
2. Purificar y estudiar los parámetros de la actividad enzimática de estas proteínas de forma *in vitro*.
3. Cuantificar los carotenoides totales y la bixina durante el proceso de maduración de la semilla de las tres variantes de *Bixa orellana* empleadas en este estudio, con el objetivo de entender mejor la diferencia de expresión que presentaron los genes *BoDXS2a* y *BoPSY2* en estas variantes.

Por último, de manera paralela hemos analizado la expresión y la función en bacterias de la pequeña familia de *PSY* de *Bixa orellana* (*BoPSY1* y *BoPSY2*), por lo que consideramos interesante, utilizar los experimentos empleados en este estudio, para analizar la función de la pequeña familia de genes *DXS* de *Bixa orellana*, así como de otros genes que pudieran estar implicados en la biosíntesis de bixina.

## BIBLIOGRAFIA

- Alba-Aguayo D.R. and Rueda A. (2013). Problema bioquímico. Determinación del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real. *Rev. educ. Bioquím*, vol.32. 1665-1995
- Ampomah-Dwamena C., Driedonks N., Lewis D., Shumskaya M., Chen X., Wurtzel E.T., Espley R.V. and Allan A.C. (2015). The phytoene synthase gene family of apple (*Malus x domestica*) and its role in controlling fruit carotenoid content. *BMC Plant Biology*, 15:185. doi: 10.1186/s12870-015-0573-7
- Arango, J., Wüst, F., Beyer, P., and Welsch, R. (2010). Characterization of phytoene synthases from cassava and their involvement in abiotic stress-mediated responses. *Planta*, 232: 1251–62.
- Araki N, Kusumi K, Masamoto K, Niwa Y, Iba K. (2000). Temperature-sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Physiol Plant*, 108: 19–24
- Avendano-Vazquez, Córdoba E., Llamas E., San Román E., Nisar N., Torre S., Ramos-Vega, Gutiérrez-Nava, Cazzonelli C., Pogson B., León P. (2014). An uncharacterized apocarotenoid-derived signal generated in  $\zeta$ -carotene desaturase mutants regulate leaf development and the expression of chloroplast and nuclear genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26, pp. 2524-2537
- Bastos ARR, Carvalho JG, Assis RP, Filho ABC. (1999). Marcha de absorção de nutrientes em urucum (*Bixa orellana L.*) tipo cultivado piave vermelha em fase de viveiro. *Cerne*, 5:76–85
- Bartley, G. E., & Scolnik, P. a. (1995). Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell*, 7(7), 1027–1038
- Blas A.L., Ming R., Liu Z., Veatch O.J., Paull R.E., Moore P.H., Qingyi Yu. (2010). Cloning of the papaya chromoplast-specific lycopene  $\beta$ -cyclase, CpCYC-b, controlling fruit flesh color reveals conserved microsynteny and a recombination hot spot. *Plant Physiology*, 152, 2013-2022

- Bouvier, F., Dogbo, O., & Camara, B. (2003). Biosynthesis of the Food and Cosmetic Plant Pigment Bixin (Annatto). *Science*, vol. 300. 2089-2091
- Bouvier, F., Rahier, A., and Camara, B. (2005). Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res*, 44: 357–429
- Boucher, Y., Kamekura, M., and Doolittle, W.F. (2004). Origins and evolution of isoprenoid lipid biosynthesis in archaea. *Mol. Microbiol*, 52: 515–27
- Bohlmann, J. and Keeling, C.I. (2008). Terpenoid biomaterials. *Plant J*, 54: 656–69
- Bramley, P., Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2015). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids, (JUNE 2004). <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2003.10.002>
- Busch, M. and Seuter, A. (2002). Functional Analysis of the Early Steps of carotenoid Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiol*, 128: 439-453
- Cai C., Zhang X., Niu E., Zhao L., Li N., Wang L., Ding L., Guo W. (2014). GhPSY, a phytoene synthase gene, is related to the red plant phenotype in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Mol Biol Rep*, 41(8):4941-52. doi: 10.1007/s11033-014-3360-x
- Carballo-Uicab, V. (2013). Análisis de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides en variantes de *Bixa orellana* L. por RT-PCR. Tesis de maestría. *Centro de Investigación Científica de Yucatán*. México. pp.62
- Cárdenas-Conejo, Y., Carballo-Uicab, V., Lieberman, M., Aguilar-Espinosa, M., Comai, L., & Rivera-Madrid, R. (2015). De novo transcriptome sequencing in *Bixa orellana* to identify genes involved in methylerythritol phosphate, carotenoid and bixin biosynthesis. *BMC Genomics*, 16, 877. <http://doi.org/10.1186/s12864-015-2065-4>
- Carretero-Paulet L., Cairo A., Botella-Pavia P., Besumbes O., Campos N., Boronat A., et al. (2006). Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Mol. Biol*, 62 683–695. doi: 10.1007/s11103-006-9051-9

- Carretero-Paulet L., Cairó A, Talavera D, Saura A, Imperial S, Rodríguez-Concepción M, Campos N, Boronat A. (2013). Functional and evolutionary analysis of DXL1, a non-essential gene encoding a 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase like protein in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, vol. 524. 40-53
- Carrie, C., Murcha, M.W., Millar, A.H., Smith, S.M., and Whelan, J. (2007). Nine 3-ketoacyl-CoA thiolases (KATs) and acetoacetyl-CoA thiolases (ACATs) encoded by five genes in *Arabidopsis thaliana* are targeted either to peroxisomes or cytosol but not to mitochondria. *Plant Mol. Biol*, 63:97-108
- Chaudhary, N., Nijhawan, A., Khurana, J.P., and Khurana, P. (2010). Carotenoid biosynthesis genes in rice: structural analysis, genome-wide expression profiling and phylogenetic analysis. *Mol Genet Genomics*, 283: 13–33
- Chen, Y., Li, F., and Wurtzel, E.T. (2010). Isolation and characterization of the Z-ISO gene encoding a missing component of carotenoid biosynthesis in plants. *Plant Physiol*, 153: 66–79
- Chen, B., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2013). Design of Foods with Bioactive Lipids for Improved Health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 35–56. <http://doi.org/10.1146/annurev-food-032112-135808>
- Christianson D. W. (2017). Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. *Chemical reviews*, 117(17), 11570-11648.
- Corrêa MP. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Vol. 4. Rio de Janeiro, Brasil: Ministério da Agricultura/IBDF; 1978
- Cordoba E, Porta H, Arroyo A, San Román C, Medina L, Rodríguez-Concepción M, León P. (2011). Functional characterization of the three genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in maize. *Journal of Experimental Botany*, 62, 2023–2038
- Cordoba E., Salmi M., León P. (2009). Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 60, 2933–2943

- Cunningham FX Jr, Sun Z, Chamovitz D, Hirschberg J, Gantt E. (1994). Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the *cyanobacterium Synechococcus* sp strain PCC7942. *Plant Cell*, 6:1107–1121
- Cunningham, F. X., & Gantt, E. (2001). One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene epsilon-cyclases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), 2905-10.
- Cunningham, F.X. & Gantt, E. (2007). A portfolio of plasmids for identification and analysis of carotenoid pathway enzymes: *Adonis aestivalis* as a case study. *Photosynth Res*, 92(2), 92: 245
- Dalla Costa L., Emanuelli F., Trenti M., Moreno-Sanz P., Lorenzi S., Coller E., Moser S., Slaghenaufi D., Cestaro A., Larcher R., Gribaudo I., Costantini L., Malnoy M., and Stella Grando M. (2017). Induction of Terpene Biosynthesis in Berries of Microvine Transformed with VvDXS1 Alleles. *Front Plant Sci*, 8, 2244. doi: 10.3389/fpls.2017.02244
- Dale, S., Arró, M., Becerra, B., Morrice, N.G., Boronat, A., Hardie, D.G., and Ferrer, A. (1995). Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by *Brassica oleracea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *Eur J Biochem*, 233: 506–13.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A. M., & Adams, W. W. (1996). In vivo functions of carotenoids in higher plants. *Faseb*, 10, 403–412
- Deruère, J., Römer, S., D’Harlingue, A., Backhaus, R. A., Kuntz, M., & Camara, B. (1994). Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *The Plant Cell*, 6(1), 119–33
- Dogbo, O., Laferrière, A., D’Harlingue, A., and Camara, B. (1988). Carotenoid biosynthesis: Isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of

- phytoene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 7054–8
- Dong, H., Deng, Y., Mu, J., Lu, Q., Wang, Y., Xu, Y., Chu, C., Chong, K., Lu, C., and Zuo, J. (2007). The *Arabidopsis* Spontaneous Cell Death1 gene, encoding a zeta-carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. *Cell Res*, 17: 458–70
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D.A., and Orlova, I. (2006). Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci*, 25: 417–440
- Enfissi E. M., Fraser P. D., Lois L. M., Boronat A., Schuch W., Bramley P. M. (2005). Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnol J*, 3 17–27. doi:10.1111/j.1467-7652.2004.00091.x
- Eroglu, A., & Harrison, E. H. (2013). Carotenoid metabolism in mammals, including man: formation, occurrence, and function of apocarotenoids. *Journal of lipid research*, 54(7), 1719-30.
- Estévez JM, Cantero A, Romero C, Kawaide H, Jimé'nez LF, Kuzuyama T, Seto H, Kamiya Y, Leon P. (2000). Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-Cmethyl-d-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 124: 95–103
- Estévez J. M., Cantero A., Reindl A., Reichler S., León P. (2001). 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem*, 276, 22901-22909. doi: 10.1074/jbc.M100854200
- Fantini, E., Falcone, G., Frusciante, S., Giliberto, L., and Giuliano, G. (2013). Dissection of tomato lycopene biosynthesis through virus-induced gene silencing. *Plant Physiol*, 163: 986–98
- Fraser, P.D., Truesdale, M.R., Bird, C.R., Schuch, W., and Bramley, P.M. (1994). Carotenoid Biosynthesis during Tomato Fruit Development (Evidence for Tissue-Specific Gene Expression). *Plant Physiol*, 105: 405–413

- Franco CO, Fabri EG, Barreiro Neto M, Manfiolli MH, Harder MNC, Rucker NC. Urucum: Sistema de Produção para o Brasil. João Pessoa, Brazil: Emepa-Pb, Apta; 2008
- Franco CF. O Agronegócio do urucum na região Nordeste. 1 Reunião Nacional da Cadeia Produtiva de Urucum, CD-Rom, 2007
- FOOD-INFO. (2014). Achiote (*Bixa orellana*). URL: <http://www.food-info.net/es/products/spices/annatto.htm#top> (14 de Agosto de 2014)
- Fu, X., Feng, C., Wang, C., Yin, X., Lu, P., Grierson, D., Chen, K. (2014). Involvement of multiple phytoene synthase genes in tissue-and cultivar-specific accumulation of carotenoids in loquat. *Journal of Experimental Botany*, 65(16), 4679-4689
- Giorio, G., Stigliani, A.L., and D'Ambrosio, C. (2008). Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum L.*)-new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *FEBS J*, 275: 527–35
- Grassi, S., Piro, G., Lee, J. M., Zheng, Y., Fei, Z., Dalessandro, G., Giovannoni, J. J.,... Lenucci, M. S. (2013). Comparative genomics reveals candidate carotenoid pathway regulators of ripening watermelon fruit. *BMC genomics*, 14, 781. doi: 10.1186/1471-2164-14-781
- Grotewold E. (2006). The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 761–780. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105248
- Gong Y., Liao Z., Guo B. (2006). Molecular cloning and expression profile analysis of Ginkgo biloba DXS gene encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate pathway. *Planta Med*, 72:329–335. doi: 10.1055/s-2005-916234
- Harker, M., Hellyer, A., Clayton, J.C., Duvoix, A., Lanot, A., and Safford, R. (2003). Coordinate regulation of sterol biosynthesis enzyme activity during accumulation of sterols in developing rape and tobacco seed. *Planta*, 216:707-15
- Henriquez M. A., Soliman A., Li G., Hannoufa A., Ayele B. T., Daayf F. (2016). Molecular cloning, functional characterization and expression of potato (*Solanum tuberosum*) 1-

deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase 1 (StDXS1) in response to *Phytophthora infestans*. *Plant Sci*, 243 71–83. doi:10.1016/j.plantsci.2015.12.001

Hunter WN. (2007). The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 21573–21577

Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D., and Hirschberg, J. (2002). Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell*, 14: 333–42

Jako C, Coutu C, Roewer I, Reed DW, Pelcher LE, Covello PS. (2002). Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (*Bixaceae*) through expressed sequence tag analysis. *Plant Sci*, 163:141–5. doi: 10.1016/S0168-9452(02)00083-3

Jones D.T., Taylor W.R., and Thornton J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*, 8:275-282

Kaur N., Pandey A., Shivani, Kumar P., Pandey P., Kesarwani A., Mantri S., Awasthi P. and Tiwari S. (2017). Regulation of Banana Phytoene Synthase (MaPSY) Expression, Characterization and Their Modulation under Various Abiotic Stress Conditions. *Frontier in Plant Science*, 8, 462

Kim SM, Kuzuyama T, Chang YJ, Song KS, Kim SU. (2006a). Identification of class 2 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase genes from *Ginkgo biloba* and their transcription in embryo culture with respect to ginkgolide biosynthesis. *Planta Medica*, 72, 234–240

Kim, J. and DellaPenna, D. (2006b). Defining the primary route for lutein synthesis in plants: the role of Arabidopsis carotenoid beta-ring hydroxylase CYP97A3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 3474–9

Kim S-M, Kuzuyama T, Kobayashi A, Sando T, Chang Y-J, Kim S-U. (2008). 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase (IDS) is encoded by multicopy genes in gymnosperms *Ginkgo biloba* and *Pinus taeda*. *Planta*, 227, 287–298

- Kim Y-B, Kim S-M, Kang M-K, Kuzuyama T, Lee JK, Park S-C, Shin S-C, Kim S-U. (2009). Regulation of resin acid synthesis in *Pinus densiflora* by differential transcription of genes encoding multiple 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase and 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase genes. *Tree Physiology*, 29, 737–749
- Kramer, E. M., Jaramillo, M. A., & Di Stilio, V. S. (2004). Patterns of gene duplication and functional evolution during the diversification of the AGAMOUS subfamily of MADS box genes in angiosperms. *Genetics*, 166(2), 1011-23.
- Korth, K.L., Jaggard, D.A., and Dixon, R.A. (2000). Developmental and light-regulated post-translational control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase levels in potato. *Plant J*, 23: 507–16
- Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33:1870-1874
- Kuzuyama, T. (2002). Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66: 1619–27
- Lange, B. M., Wildung, M. R., McCaskill, D., & Croteau, R. (1998). A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2100–2104
- Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W., and Croteau, R. (2000). Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 13172–7
- Lewinsohn E., Sitrit Y., Bar E., Azulay Y., Ibdah M., Meir A., Yosef E., Zamir D., Tadmor Y. (2005). Not just colors – carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma in tomato and watermelon fruit. *Trends Food Sci Technol*, 16, pp. 407-415
- Leal Freddy y Michelangeli de Clavijo Claret. (2010). About the history, taxonomy, botany and uses of *Bixa orellana* L. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnologia*.28: 78-86

- Leivar, P. and Quail, P.H. (2011). PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends Plant Sci.* 16: 19–28
- Lichtenthaler HK. (1999). The 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50: 47–65
- Lichtenthaler HK, Rohmer M, Schwender J. (1997). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 101: 643–652
- Li, F., Vallabhaneni, R., and Wurtzel, E.T. (2008a). PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiol*, 146: 1333–45
- Li, F., Vallabhaneni, R., Yu, J., Rocheford, T., and Wurtzel, E.T. (2008b). The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiol*, 147: 1334–46
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods*, 25(4): p. 402-8.
- Lois LM ,Campos N ,RosaPutra S , Danielsen K , Rohmer M , Boronat A . (1998). Cloning and characterization of an *Escherichia coli* gene that encodes a transketolase-type enzyme that catalyzes the synthesis of D -1-deoxoxilulose 5-phosphate, a common precursor for the biosynthesis of isoprenoid, thiamin and pyridoxol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 2105 – 2110
- Lois, L.M., Rodríguez-Concepción, M., Gallego, F., Campos, N., and Boronat, A. (2000). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J*, 503–13
- López-Emparán A., Quezada-Martínez D., Zúñiga-Bustos M., Cifuentes V., Iñiguez-Luy F., and Laura Federico M. (2014). Functional Analysis of the *Brassica napus* L. Phytoene Synthase (PSY) Gene Family. *PLoS one*, 15; 9(12)

- Malkin, R. and Niyogi, K. (2000). Photosynthesis. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, B.B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones, eds (*Am. Soc. Plant Physiol.: Rockville*), pp. 568–628
- Mandel MA, Feldmann KA, Herrera-Estrella L, Rocha-Sosa M, León P. (1996). CLA1, a new gene required for the development of the chloroplast, is largely preserved in evolution. *Plant J*, 9: 649-658
- Matilla, A.J., Carrillo-Barral, N. & Rodríguez-Gacio, M.C. (2015). An Update on the Role of NCED and CYP707A ABA Metabolism Genes in Seed Dormancy Induction and the Response to After-Ripening and Nitrate. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34: 274
- Manzano, D., Fernández-Busquets, X., Schaller, H., Gonzáles, V., Boronat, A., Arró, M., and Ferrer, A. (2004). The metabolic imbalance underlying lesion formation in *Arabidopsis thaliana* overexpressing farnesil diphosphate synthase (isoform 1s) leads to oxidative stress and is triggered by the developmental decline of endogenous HMGR activity. *Planta*, 2019: 982-92
- McGarvey, D.J. and Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1015–26
- Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., & Harashima, K. (1990). Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172 (12), 6704–6712
- Motamayor, J. C., Mockaitis, K., Schmutz, J., Haiminen, N., Livingstone, D., Cornejo, O., Findley, S. D., Zheng, P., Utró, F., Royaert, S., Saski, C., Jenkins, J., Podicheti, R., Zhao, M., Scheffler, B. E., Stack, J. C., Feltus, F. A., Mustiga, G. M., Amores, F., Phillips, W., Marelli, J. P., May, G. D., Shapiro, H., Ma, J., Bustamante, C. D., Schnell, R. J., Main, D., Gilbert, D., Parida, L., ... Kuhn, D. N. (2013). The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. *Genome biology*, 14(6), r53. doi: 10.1186/gb-2013-14-6-r53
- Morris W. L., Ducreux L. J., Hedden P., Millam S., Taylor M. A. (2006). Overexpression of a bacterial 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene in potato tubers perturbs the

isoprenoid metabolic network: implications for the control of the tuber life cycle. *J Exp Bot*, 57 3007–3018. doi: 10.1093/jxb/erl061

Moran, N. a, & Jarvik, T. (2010). Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science (New York, N.Y.)*, 328 (5978), 624–627

Moreira P.A., Lins J., Dequigiovanni G., Veasey E. A., Clement R.C. (2015). The domestication of Annatto (*Bixa orellana*) from *Bixa urucurana* in Amazonia. *Economic Botany*, 69, 127-135. doi: 10.1007/s12231-015-9304-0

Muñoz-Bertomeu J., Arrillaga I., Ros R., Segura J. (2006). Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender. *Plant Physiol*, 142, 890–900. doi:10.1104/pp.106.086355

Nath-Chowdhury, M., Sangaralingam, M., Bastien, P., Ravel, C., Pratlong, F., Mendez, J., Ndao, M. (2016). Real-time PCR using FRET technology for Old World *cutaneous leishmaniasis* species differentiation. *Parasites & Vectors*, 9, 255. doi: <http://doi.org/10.1186/s13071-016-1531-4>

Newman, J.D. and Chappell. (1999). Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. *Crit Rev Biochem Mol Bio*, 34: 95-106

Park, H., Kreunen, S.S., Cuttriss, A.J., DellaPenna, D., and Pogson, B.J. (2002). Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. *Plant Cell*, 14: 321–32

Pandit J., Danley D.E., Schulte G. K., Mazzalupo S., Pauly T.A, Haywardi C.M, Hamanakai E.S., Thompsoni J.T., and H. James Harwood H.J, Jr. (2000). Crystal Structure of Human Squalene Synthase A KEY ENZYME IN CHOLESTEROL BIOSYNTHESIS. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 30610–30617

Paetzold H., Garms S., Bartram S., Wieczorek J., Urós-Gracia E.M., Rodríguez-Concepción M., Boland W., Strack D., Hause B., Walter M.H. (2010). The isogene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 2 controls isoprenoid profiles, precursor pathway

allocation, and density of tomato trichomes. *Mol Plant*, 3(5):904-16. doi: 10.1093/mp/ssq032

Pecker, I., Gabbay, R., Cunningham, F.X., and Hirschberg, J. (1996). Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Mol. Biol*, 30: 807–19

Peng G, Wang C, Song S, Fu X, Azam M, Grierson D, Xu C. (2013). The role of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase and phytoene synthase gene family in *citrus* carotenoid accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 71, 67–76.

Perry, K. L., Simonitch, T. A., Harrison-Lavoie, K. J., & Liu, S. T. (1986). Cloning and regulation of *Erwinia herbicola* pigment genes. *Journal of Bacteriology*, 168(2), 607–612

Phillip, D. and Young, A.J. (1995). Occurrence of the carotenoid lactucaxanthin in higher plant LHC II. *Photosynth Res*, 43: 273–82

Phillips M.A., Walter MH, Ralph S., Dabrowska P., Luck K., Urós E.M., Boland W., Strack D., Rodríguez-Concepción, Bohlmann J and Gershenzon J. (2007). Functional identification and differential expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in induced terpenoid resin formation of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Molecular Biology*, 65, 243–257

Phillips M.A., León P., Boronat A. Rodríguez-Concepción M. (2008). The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends in Plant Science*, 13, 619-623

Poulter, C.D. and Rilling, H.C. (1976). Prenyltransferase: the mechanism of the reaction. *Biochemistry*, 15: 1079-83

Pulido, P., Perello, C., and Rodriguez-Concepcion, M. (2012). New insights into plant isoprenoid metabolism. *Mol Plant*, 5: 964–77

Qin, G., Gu, H., Ma, L., Peng, Y., Deng, X.W., Chen, Z., and Qu, L.-J. (2007). Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Res*, 17: 471–82

- Querol J, Rodríguez-Concepción M, Boronat A, Imperial S. (2001). Essential role of residue H49 for activity of *Escherichia coli* 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase, the enzyme catalyzing the first step of the 2-Cmethyl-d-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 289: 155–160
- Raddatz-Mota, D., Pérez-Flores, L. J., Carrari, F., Mendoza-Espinoza, J. A., de León-Sánchez, F. D., Pinzón-López, L. L., Rivera-Cabrera, F. (2017). Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1729–1741. doi: <http://doi.org/10.1007/s13197-017-2579-7>
- Rivera-Madrid R., Escobedo-Gm R. M., Balam-Galera E., Vera-Ku M., Harries H. (2006). Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). *Scientia Horticulturae*, 109 165–172. doi: 10.1016/j.scienta.2006.03.011
- Rivera-Madrid, R., Aguilar-Espinosa, M., Cárdenas-Conejo, Y., & Garza-Caligaris, L. E. (2016). Carotenoid Derivates in Achiote (*Bixa orellana*) Seeds: Synthesis and Health Promoting Properties. *Frontiers in plant science*, 7, 1406. doi:10.3389/fpls.2016.01406
- Rodríguez-Ávila, N. L., Narváez-Zapata, J. A., Aguilar-Espinosa, M., y Rivera-Madrid, R., (2009). Full-length gene enrichment by using an optimized RNA isolation protocol in *Bixa orellana* recalcitrant tissues. *Mol Biotechnol*, 42: 84-90
- Rodríguez-Ávila, N. L., Narváez-Zapata, J. A., Aguilar-Espinosa, M., & Rivera-Madrid, R. (2010). Regulation of Pigment-related Genes during Flower and Fruit Development of *Bixa orellana*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29, 43–50
- Rodríguez-Concepción M., Campos N., Ferrer A., Boronat A. (2012). Biosynthesis of Isoprenoid Precursors in *Arabidopsis*. In: Bach T., Rohmer M. (eds) Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms. *Springer, New York, NY*
- Rodríguez-Concepcion, M. and Stange, C. (2013). Biosynthesis of carotenoids in carrot: An underground story comes to light. *Arch. Biochem Biophys*, 539: 110–6

- Rodríguez-Villalón, A., Gas, E., and Rodríguez-Concepción, M. (2009). Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in darkgrown *Arabidopsis* seedlings. *Plant J*, 60: 424–35
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., and Sahn, H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J*, 295 Pt 2: 517–24
- Rohmer M, Seemann M, Horbach S, Bringer-Meyer S, Sahn H .(1996). Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 118: 2564-2566
- Rohmer M. (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep*, 16: 565-574
- Rohdich, F., Hecht, S., Gärtner, K., Adam, P., Krieger, C., Amslinger, S., Arigoni, D., Bacher, A., and Eisenreich, W. (2002). Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 1158-63
- Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D., and Hirschberg, J. (1999). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *Plant J*, 17: 341-51
- Ruiz-Sola, M.Á. and Rodríguez-Concepción, M. (2012). Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. *Arabidopsis Book* 10: e0158
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I.A., and Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol*, 5: 301–7
- Saladie M, Wright I, Garcia-Mas J, Rodríguez-Concepción, Philips M. (2014). The 2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway in melon is regulated by specialized isoforms for the first and last steps. *J Exp Bot*, 65(17): 5077–5092

- Schwartz S, Qin X y Zeevaart J. (2001). Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase. *J Biol Chem*, 276(27): 25208-25211
- Scolnik P.A. and Bartle C.E. (1994). Nucleotide Sequence of an *Arabidopsis* cDNA for Phytoene Synthase. *Plant Physiol*, 104: 1471-1472
- Shoemaker RC, Schlueter J, Doyle JJ. (2006). Paleopolyploidy and gene duplication in soybean and other legumes. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 104–109
- Simpson K, Quiroz L, Rodríguez-Concepción M, Stange C. (2016). Differential Contribution of the First Two Enzymes of the MEP Pathway to the Supply of Metabolic Precursors for Carotenoid and Chlorophyll Biosynthesis in Carrot (*Daucus carota*). *Front Plant Sci*, 7: 1344
- Simpson, K., Fuentes, P., Quiroz-Iturra, L. F., Flores-Ortiz, C., Contreras, R., Handford, M., & Stange, C. (2018). Unraveling the induction of phytoene synthase 2 expression by salt stress and abscisic acid in *Daucus carota*. *Journal of experimental botany*, 69(16), 4113-4126
- Simkin, A.J., Guirimand, G., Papon, N., Courdavault, V., Thabet, I., Ginis, O., Bouzid, S., Giglioli-Guivarc'h, N., and Clastre, M. (2001). Peroxisomal localization of the final steps of the mevalonic acid pathway in planta. *Planta*, 234: 903-14
- Sprenger GA , Schorken U , Wiegert T , Grolle S , De Graaf AA , Taylor SV , Begley TP , Bringer-Meyer S , Sahm H. ( 1997 ). Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 12857-12862
- Stauder R., Welsch R., Camagna M., Kohlen W., Balcke G.U., Tissier A., and Walter M.H. (2018). Strigolactone Levels in Dicot Roots Are Determined by an Ancestral Symbiosis-Regulated Clade of the PHYTOENE SYNTHASE Gene Family. *Front Plant Sci*, 9: 255. doi: 10.3389/fpls.2018.00255

- Sugden, C., Donaghy, P.G., Halford, N.G., and Hardie, D.G. (1999). Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase *in vitro*. *Plant Physiology*, 120: 257–74
- Sun, Z., Gantt, E., and Cunningham, F.X. (1996). Cloning and functional analysis of the beta-carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem*, 271: 24349–52
- Ohmiya A., Kishimoto S., Aida R., Yoshioka S., Sumitomo K. (2006). Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in *chrysanthemum petals*. *Plant Physiol*, 142, pp. 1193-1201
- Tian, L., DellaPenna, D., and Zeevaart, J. a. D. (2004). Effect of hydroxylated carotenoid deficiency on ABA accumulation in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 122: 314–320
- Trujillo-Hernández J., Cárdenas-Conejo Y., Escobar-Turriza P., Aguilar-Espinosa M., Carballo-Uicab V., Garza-Caligaris L., Luca-Comai., Rivera-Madrid R. (2016). Functional polymorphism in lycopene beta-cyclase gene as a molecular marker to predict bixin production in *Bixa orellana* L. (achiote). *Mol Breeding*, 36:135. doi: 10.1007/s11032-016-0555-y.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., and Rodríguez-Concepción, M. (2010). Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 11626–31
- Tuveson, R. W., Larson, R. A., & Kagan, J. (1988). Role of cloned carotenoid genes expressed in *Escherichia coli* in protecting against inactivation by near-UV light and specific phototoxic molecules. *Journal of Bacteriology*, 170(10), 4675–4680
- Valdez-Ojeda, Hernández-Stefanoni, Aguilar-Espinosa and Renata-Rivera.(2008). Assessing Morphological and Genetic Variation in Annatto (*Bixa orellana* L.) by Sequence-related Amplified Polymorphism and Cluster Analysis. *HortScience*, 43(7):20

- Vallabhaneni R, Wurtzel ET. (2009). Timing and biosynthetic potential for carotenoid accumulation in genetically diverse germplasm of maize. *Plant Physiology*, 150, 562–572
- Van- Norman, Zhang J., Cazzonelli C., Pogson B., Harrison J., Bugg T., Chan K., Thompson A.J., Benfey P.N. (2014). Periodic root branching in *Arabidopsis* requires synthesis of an uncharacterized carotenoid derivative. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, pp. E1300-E1309
- Verhoeven, A. S., Adams, W. W., Demmig-Adams, B., Croce, R., & Bassi, R. (1999). Xanthophyll Cycle Pigment Localization and Dynamics during Exposure to Low Temperatures and Light Stress in *Vinca major*1. *Plant Physiology*, 120(July), 727–738
- Veitia RA, Bottani S, Birchler JA. (2008). Cellular reactions to gene dosage imbalance: genomic, transcriptomic and proteomic effects. *Trends in Genetics* 24, 390–397
- Vilar, D., Vilar, M. S., de Lima e Moura, T. F., Raffin, F. N., de Oliveira, M. R., Franco, C. F., de Athayde-Filho, P. F., Diniz, M., ... Barbosa-Filho, J. M. (2014). Traditional uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa orellana* L.: a review. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 857292
- Walter MH, Hans J, Strack D. (2002). Two distantly related genes encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *The Plant Journal*, 31, 243–254
- Walter, M.H., y D. Strack (2011). Carotenoids and their cleavage products; biosynthesis and functions. *Natural Product Reports*, 28(4), 663-692
- Welsch, R., Beyer, P., Hugueney, P., Kleinig, H., and von Lintig, J. (2000). Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta*, 211: 846–54
- Welsch, R., Wüst, F., Bär, C., Al-Babili, S., and Beyer, P. (2008). A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in *rice* and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiology*, 147: 367–80

- Wright L. P., Rohwer J. M., Ghirardo A., Hammerbacher A., Ortiz-Alcaide M., Raguschke B., et al. (2014). Deoxyxylulose 5-Phosphate synthase controls flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 165 1488–1504. doi: 10.1104/pp.114.245191
- Xiang S., Usunow G., Lange G., Busch M., Tong L. (2007). Crystal Structure of 1 Deoxy-d-xylulose 5-Phosphate Synthase, a Crucial Enzyme for Isoprenoids Biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 2676-2682; doi: 10.1074/jbc.M610235200
- Yao, D., Wang, Y., Li, Q., Ouyang, X., Li, Y., Wang, C., Ding, L., Hou, L., Luo, M., Xiao, Y. (2018). Specific Upregulation of a Cotton Phytoene Synthase Gene Produces Golden Cottonseeds with Enhanced Provitamin A. *Scientific reports*, 8(1), 1348. doi: 10.1038/s41598-018-19866-1
- Yang, Y., Zhang, X., Chen, Y., Guo, J., Ling, H., Gao, S., Xu, L. (2016). Selection of Reference Genes for Normalization of MicroRNA Expression by RT-qPCR in *Sugarcane Buds* under Cold Stress. *Frontiers in Plant Science*, 7, 86. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00086>
- Yong Wang, Kankan Yang, Caixia Bai, Dongdong Yin, pandilla Li, Kezong Qi, Guijun Wang y Yongdong Li. (2017). Development of a SYBR Green I real-time PCR for the detection of the orf virus. *AMB Express*, 7: 21. doi: 10.1186/s13568-016-0322-9
- Yuru Tong, Ping Su, Yujun Zhao, Meng Zhang, Xiujuan Wang, Yujia Liu, Xianan Zhang, Wei Gao and Luqi Huang. (2015). Molecular Cloning and Characterization of DXS and DXR Genes in the Terpenoid Biosynthetic Pathway of *Tripterygium wilfordii*. *Int. J. Mol. Sci*, 16, 25516-25535. doi: 10.3390/ijms161025516
- Zhang J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 292–298
- Zhang M., Li K., Zhang C., Gai J., Yu D. (2009). Identification and characterization of class 1 DXS gene encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the MEP pathway from soybean. *Mol Biol Rep*. 36 879–887. doi: 10.1007/s11033-008-9258-8

Zhang F., Liu W., Xia J., Zeng J., Xiang L., Zhu S., Zheng Q., Xie H., Yang C., Chen M., and Liao Z. (2018). Molecular Characterization of the 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate Synthase Gene Family in *Artemisia annua*. *Front Plant Sci*, 9, 952. doi:10.3389/fpls.2018

