



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE GENES
POTENCIALMENTE INVOLUCRADOS EN LA
BIOSÍNTESIS DE BIXINA EN *Bixa orellana* L.**

Tesis que presenta

M.C Víctor Manuel Carballo Uicab

En opción al título de

DOCTOR 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 Victor Manuel Carballo Uicab titulado Análisis y caracterización de genes potencialmente involucrados en la biosíntesis de bixina en *Bixa orellana* L. fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Renata Rivera Madrid, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dra. Clelia De la Peña Seaman
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 15 abril 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:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Victor', is written over a horizontal line. The signature is stylized with a large, looping initial 'V'.

Nombre: MC. M.C Víctor Manuel Carballo Uicab

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y forma parte del proyecto titulado Análisis y caracterización de genes potencialmente involucrados en la biosíntesis de bixina en *Bixa orellana* L. bajo la dirección de la Dra. Renata Rivera Madrid. Proyecto financiado por CONACYT con número 220259. (Análisis del genoma y transcriptoma de achiote (*Bixa orellana*) para su mejoramiento y su exploración como alimento funcional).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada No. 265369, que me permitió alcanzar a culminar mis estudios de doctorado y al CICY por todas sus instalaciones y apoyo.

A la Dra. Renata Rivera Madrid por todo su apoyo y confianza para realizar este trabajo y mi formación profesional.

MC. Margarita Aguilar Espinosa por su apoyo y enseñanzas en mis tareas de laboratorio.

MC. Angela Kú G por su apoyo en la técnica de RT-PCR *in situ*.

A mis compañeros de laboratorio: Claudine, Andira, Angélica, Nayeli, Rocio, Rodolfo, Pedro, Jonathan, Ricardo, C. Jesús, Dra. Luz Elena por su amistad y apoyo.

Agradezco al comité tutorial y revisores de tesis conformado por el Dr. Felipe Vázquez Flota, Dr. Gregorio Godoy Hernández, Dra. Luisa López Ochoa, Dr. Luis Sáenz Carbonell, Dr. Arturo Guevara García y Dr. Yair Cárdenas Conejo por todo el apoyo, consejos y comentarios.

DEDICATORIAS

A mi familia:

Mi mamá: María Elena Uicab Pacheco por mostrarme el camino a la superación.

Mis hermanos:

Lucelly, Gregorio, María Elena, Alicia y Fabiola por ser mi inspiración.

Y a todas esas personas que han estado y están a mi lado durante mi camino en la vida y en mi formación académica.

Gracias

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	5
CAPÍTULO I	6
ANTECEDENTES	6
1. Generalidades de <i>Bixa orellana</i> L. o achiote	6
1.1 Descripción botánica.....	6
1.2. La bixina.....	10
1.3 Usos de la bixina.....	11
1.3.1 Alimentación.....	11
1.3.2 Medicinal	11
1.3.3 Industrial.....	12
1.3.4 Uso ornamental.....	12
1.4 Compuestos Isoprenoides	12
1.5 Rutas de Biosíntesis de los Isoprenoides	14
1.5.1 Vía del Mevalonato (MVA)	14
1.5.2 Vía del 2C-metil-D-eritrol 4-fosfato (MEP)	16
1.6 Carotenoides	18
1.7 Biosíntesis de carotenoides en Plantas	21
1.7.1 Biosíntesis de carotenoides apartir de licopeno	24
1.8 Apocarotenoides	28
1.9 Biosíntesis de bixina	30

HIPÓTESIS	33
OBJETIVO GENERAL	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
JUSTIFICACIÓN	34
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	35
CAPÍTULO II	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
2.1 Material vegetal.....	36
2.1.1 Caracterización de semillas inmaduras	36
2.1.2 Cortes histológicos de las semillas y PCR <i>in situ</i>	36
2.2 Contenido de bixina	37
2.4 Extracción de RNA Total.....	38
2.4.1 Tratamiento con DNAsas	38
2.4.2 Síntesis de cDNA.....	39
2.4.3 Diseño de oligonucleótidos	39
2.5 Análisis de expresión de los genes <i>BoCCDs</i> por RT-PCR en tiempo real	40
2.6 Análisis de secuencias de los genes <i>BoCCDs</i>	42
2.7 Análisis de la función de los genes <i>BoCCDs</i> en <i>E. coli</i>	43
2.7.1 Selección de genes <i>BoCCDs</i> candidatos para el análisis de la función en <i>E. coli</i>	43
2.7.2 Diseño de oligonucleótidos para amplificar los marcos de lectura abiertos	44
2.8 Amplificación de ORF y Clonación de los genes <i>BoCCDs</i> en pCR™8/GW/TOPO	45

2.8.1 Ligación de ORF de los genes <i>BoCCDs</i> en el vector pCR™8/GW/TOPO	45
2.8.1.1 Transformación por choque térmico	46
2.8.1.2 Verificación de colonias recombinantes	47
2.9 Subclonación de los genes <i>BoCCDs</i> en el vector de expresión pDEST™17Getaway®	47
3.1 Análisis de los productos generados por las <i>BoCCDs</i> en <i>E. coli</i>	49
3.2 Análisis de absorbancia y fluorescencia.....	49
3.3 Análisis por UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS	49
3.4 Análisis por FTIR.....	50
CAPÍTULO III	51
RESULTADOS.....	51
3 Caracterización de las etapas de desarrollo de semillas y contenido de bixina	51
3.1 Material vegetal.....	51
3.1.1 Etapas de las semillas en desarrollo	52
3.1.2 Cortes histológicos de las semillas	53
3.1.3 Cuantificación de bixina durante el desarrollo de las semillas	54
3.2 Extracción de RNA total.....	55
3.2.1 Síntesis de cDNA.....	56
3.3 Cuantificación de la expresión de genes <i>BoCCDs</i> por RT-PCR	57
3.3.1 Análisis de expresión de los genes <i>BoCCD4</i>	57
3.3.2 Análisis de expresión del gen <i>BoCCD1</i>	58
3.3.3 Análisis de expresión de los genes β y ε - ciclasas	59

3.4 Análisis <i>in silico</i> de las secuencias de los genes <i>BoCCDs</i>	62
3.4.1 Análisis de secuencias y modelo por homología de <i>BoCCD</i>	62
3.5 RT-PCR <i>in situ</i> de <i>BoCCD1-1</i> , <i>BoCCD4-1</i> , <i>BoCCD4-3</i>	64
3.6 Análisis de la función de los genes <i>BoCCDs</i> en <i>E. coli</i>	66
3.6.1 Clonación de los genes <i>BoCCDs</i> en <i>E. coli</i>	66
3.6.2 Amplificación de los ORFs de las <i>BoCCDs</i> seleccionadas y su clonación en el vector pCR™8/GW/TOPO.....	66
3.6.2.1 Selección de colonias de bacterias transformadas	67
3.6.3 Movilización de los genes <i>BoCCDs</i> al vector de expresión pDEST™17Gateway®	67
3.6.3 Expresión de genes <i>BoCCDs</i> en la cepa de <i>E. coli</i> BL21 productora de licopeno.	68
3.6.3.1 Análisis de la función de los genes <i>BoCCD1-1</i> y <i>BoCCD4-3</i> por complementación de color	69
3.6.5 Análisis de absorbancia y fluorescencia de <i>BoCCD1-1</i> , <i>BoCCD4-3</i> y bixina	70
3.6.4 Análisis de productos generados en cultivos de <i>E. coli</i> : pACCRT-EIB, pACCRT-EIB + pDEST17 <i>BoCCD1-1</i> y pACCRT-EIB + pDEST17 <i>BoCCD4-3</i> por UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS ...	71
3.6.5 Análisis de FTIR, absorbancia y fluorescencia de <i>BoCCD1-1</i> , <i>BoCCD4-3</i> y bixina	73
CAPÍTULO IV	76
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	76
4.1 Discusión.....	76
4.2 Conclusiones.....	84
4.2.1 Modelos propuestos para la biosíntesis de bixina	84
4.3 Perspectivas.....	87
Bibliografía	89

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS.

Figura 1.1. Árbusto de achiote. (Tomada de da Silva et al. 2018)	7
Figura 1.2. Flores de achiote	8
Figura 1.3. Frutos de achiote	9
Figura 1.4. Semilla de achiote. a) semilla inmadura. b) semilla madura	10
Figura 1.5 Vía del Mevalonato. (Tomada de Miziorko, 2011).....	16
Figura 1.6 Vía metabólica de la síntesis de carotenoides en plantas.	21
Figura 1.7. Estrategia experimental.....	35
Cuadro 2.1. Oligonucleótidos para el análisis de la expresión de los genes BoCCDs y 18S.....	39
Cuadro 2.2. Mezcla de reacción para RT-PCR en tiempo real	41
Cuadro 2.3. Program de amplificación para RT-PCR en tiempo real	41
Cuadro 2.4. Diseño de oligonucleótidos para amplificación de ORF de BoCCDs	45
Figura 3.1. Características morfológicas de dos accesiones de <i>Bixa orellana</i> L.	51
Figura 3.2. Frutos y Semillas en etapas de desarrollo.	52
Figura 3.3. Cortes histológicos de semillas inmduras de achiote.	54
Cuadro 3.1. Caracterización de semillas inmaduras.....	54
Figura 3.4 RNA total de semillas en diferentes etapas de desarrollo de <i>Bixa orellana</i> L.	55
Cuadro 3.2. Concentraciones del RNA total y relación Abs 260/280	56
Figura 3.5. cDNA obtenido de semillas en diferentes etapas de desarrollo de <i>Bixa orellana</i> L.	57
Figura 3.6. Análisis de la expresión por qRT-PCR de los genes BoCCDs, β y ϵ - ciclasas en dos accesiones de <i>Bixa orellana</i> L.....	60
Cuadro 3.3. Análisis de correlación entre la expresión de los genes referidos y la acumulación de bixina.....	60
Figura 3.7. Análisis <i>In silico</i> de BoCCDs.....	63
Figura 3.8. PCR <i>in situ</i> de semillas inmaduras de achiote en etapa S4.....	66
Figura 3.9 Productos de la amplificación de los ORFs de los genes <i>BoCCDs</i>	66
Figura 3.10. Verificación de los productos de recombinación entre pCR™8/GW/TOPO y los genes BoCCD1-1, BoCCD4-1 y BoCCD4-3.	67
Figura 3.11. Clonas seleccionadas que llevan funciones traduccionales de los genes a) BoCCD1-1, b) BoCCD4- 1, c) BoCCD4-3 en el vector de expresión pDEST17TM Gateway.	68
Figura 3.12. Diferencia entre las cepas bacterianas a) pACCRT-EIB (control) y b) pDES17BoCCDs (experimental).	69
Figura 3.13. Análisis de la expresión de BoCCDs en <i>E. coli</i> . a) pACCRT-EIB, b) pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD1- 1, c) pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD4-3.	69

Fig. 3.14 Espectros de absorbancia y fluorescencia de los extractos.	70
Figura 3.15 Espectros ESI-TOF-MS por inyección directa de A) pACCRT-EIB, B) pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD1-1, C) pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD4-3.	73
Figura 3.16. Espectros de FTIR para A) BoCCD4-3, B) BoCCD1-1 y C) STD de Bixina.	74

ABREVIATURAS

ABA: ácido abscísico

BSC: Bixina Cell Storage

CCD: Carotenoide dioxigenasa

cDNA: Ácido desoxiribonucleico complementario

DMAPP: Dimetil alil pirofosfato

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DXS: 1-Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa

E. coli.: *Escherichia coli*

EST's: Biblioteca de secuencias expresadas

FDA: Food and Drug Administration

FTIR: Fourier Transform infrared absorption spectra

GGPP: Geranilgeranildifosfato

GPP: Geranil difosfato

HPLC-ESI-QTOF-MS/MS: Ultrahigh pressure liquid chromatography accurate mass quadrupole time-of-flight mass spectrometry with electrospray ionization

IPP: Isopentenilpirofosfato

m/z: Relación masa/ carga de iones

ORF: Marco de lectura abierto

PDB: Protein Data Bank

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDS: Fitoeno desaturasa

PGs: Plastoglóbulos

PSY: Fitoeno sintasa

RNA: Ácido ribonucleico

RNAm: Ácido ribonucleico mensajero

RT-PCR: Retrotranscriptasa reversa-Reacción en cadena de la polimerasa

ZDS: ζ -Caroteno desaturasa

β -LCY: Licopeno- β ciclasa

ϵ -LCY: Licopeno ϵ -ciclasa

RESUMEN

Bixa orellana L. es una planta que produce bixina, el segundo pigmento apocarotenoide más importante apocarotenoide en la industria alimenticia. La bixina se acumula principalmente en las semillas. La biosíntesis de la bixina involucra la actividad de una Carotenoide dioxigenasa (CCD) la cual ha sido confirmada *in vitro*. Sin embargo, la biosíntesis de la bixina aún es un proceso no clarificado del todo.

Las Carotenoide dioxigenasa (CCDs) son enzimas implicados en la biosíntesis de una amplia diversidad de metabolitos secundarios (apocarotenoides) con alto valor económico como la bixina. En el análisis del transcriptoma de *B. orellana* L. se identificó un nuevo grupo de genes CCDs (*CCD4s* y *CCD1s*) como potencialmente involucrados en la biosíntesis de la bixina (Cárdenas-Conejo et al. 2015). Para confirmar esta propuesta se realizó el análisis por RT-PCR en cinco etapas de desarrollo de las semillas de dos accesiones con contenido de bixina diferente (P13, bajo contenido de bixina y N4, alto contenido de bixina) de *B. orellana* L. Los resultados del análisis de expresión mostraron que sólo tres *BoCCDs* (*BoCCD1-1*, *BoCCD4-1*, *BoCCD4-3*) mostrarón un patrón consistente con la acumulacion de la bixina durante el desarrollo de la semilla. La expresión de estos genes fue analizada por PCR *in situ*.

Adicionalmente, se analizó la expresión de *Boβ-LYC1* y *BoεLCY*, enzimas regulatorias clave en la biosíntesis de la bixina, los resultados fueron consistentes con la conversión del licopeno en bixina. Por otro lado, un alineamiento y análisis por homología de proteína fue realizado para confirmar que las *BoCCs* son CCDs *bona fide*, esto reveló que las tres enzimas tienen caracterisiticas preservadas y pertenecen a la familia de las CCDs. Adicionalmente la actividad enzimática de las *BoCCDs* seleccionadas fue determinada mediante su expresión en cepas de *E. coli*. y el análisis subsecuente de los productos generados fue analizado mediante HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. El producto generado (bixina aldehído) fue

identificado por HPLC-ESI-QTOF-MS/MS y FTIR; sugiriendo que en condiciones *in vitro* las enzimas BoCCD1-1 y BoCCD4-3 pueden cortar al licopeno en la posición 5,6-5',6'. Este resultado indica que las enzimas BoCCDs tienen diversos modos de acción para la producción de bixina.

ABSTRACT

Bixa orellana L. is a plant that produces bixin, the second most important apocarotenoid pigment in the food industry. Bixin accumulates mainly in the seeds. The biosynthesis of bixin involves a Carotenoid dioxygenase (CCD) activity which has been confirmed *in vitro*. However, the biosynthesis of bixin is still a process not fully clarified.

Carotenoid dioxygenases (CCDs) are enzymes involved in the biosynthesis of a wide variety of secondary metabolites (apocarotenoids) with high economic value such as bixin. In the analysis of the transcriptome of *B. orellana* L., a new group of CCD genes (*CCD4s* and *CCD1s*) was identified as potentially involved in the biosynthesis of bixin (Cárdenas-Conejo et al., 2015). To confirm this proposal, the RT-PCR expression analysis was carried out in five stages of development of *B. orellana* L. seeds from two accessions (P13, low bixin content and N4, high content of bixin) with different bixin content. The results of the expression analysis showed that only three *BoCCDs* (*BoCCD1-1*, *BoCCD4-1*, *BoCCD4-3*) display a pattern consistent with the accumulation of bixin during development and the expression of these genes were analyzed by *in situ* PCR.

Additionally, the expression of *Boβ-lyc1* and *Boεlcγ*, both key regulatory enzymes in the biosynthesis of bixin, were analyzed. The results were consistent with the conversion of lycopene into bixin. On the other hand, an alignment and analysis by protein homology of *BoCCDS* was performed to confirm that the *BoCCDs* are *bona fide* CCDs, this revealed that the three enzymes have preserved characteristics and belong to the family of the CCDs. Additionally, the enzymatic activity of the selected *BoCCDS* enzymes was determined by their expression in strain of *E. coli* and the subsequent analysis of the products generated was analyzed by means of UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS. The generated product (bixin aldehyde) was identified by UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS and FTIR, suggesting that *BoCCD1-1* and *BoCCD4-3* can cleave lycopene in the position 5,6-5', 6' *in vitro*. This result suggests that the

BoCCDs enzymes have different modes for the production of bixin.

INTRODUCCIÓN

Bixa orellana L. es una planta tropical perenne que produce considerables cantidades del pigmento apocarotenoide bixina, el cual se acumula principalmente en el arilo de la semilla. La bixina es un pigmento de valor cultural y económico, ocupa el segundo lugar entre los colorantes naturales en el mundo. La producción mundial anual de semillas de achiote es de 14500 toneladas (peso seco) (Raddatz-Mota et al. 2017). La bixina, representa el 80% del total de los carotenoides de la semilla de *B. orellana* L. (Rivera-Madrid et al. 2006).

La biosíntesis de bixina se ha demostrado utilizando un sistema de expresión en un organismo heterólogo, *Escherichia coli* (Bouvier et al. 2003b). Así se demostró por Bouvier y colaboradores que la biosíntesis de la bixina comienza con el corte oxidativo del licopeno en la posición del doble enlace 5,6 (5',6') por la enzima licopeno carotenoide dioxigenasa (BoLCD), seguidamente la síntesis de la bixina requiere de la actividad de dos enzimas adicionales: la bixina aldehído deshidrogenasa (BoBADH) y la norbixina metil transferasa (BonMET). Sin embargo, esta investigación no ha podido ser reproducida en ni siquiera usando los genes reportados en el Gen Bank por este grupo de investigación (Sergeant et al., 2009; Walter and Strack, 2011, Rodríguez-Ávila et al. 2011a).

Con la obtención y el análisis del transcrito de *B. orellana* L. en nuestro grupo de investigación se encontraron nuevos genes *CCDs* que podrían estar potencialmente involucrados en la biosíntesis de la bixina (Cárdenas-Conejo et al. 2015).

El análisis de la expresión de los genes *CCDs* durante el desarrollo de las semillas (órganos donde se acumula más bixina), en dos accesiones con características contrastantes tanto en color de flor y fruto, como en contenido de bixina, ayudarán a elucidar la síntesis de este pigmento, lo cual eventualmente permitirá llevar a cabo su síntesis en otros organismos o manipular su producción en la planta.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. Generalidades de *Bixa orellana* L. o achiote

1.1 Descripción botánica

Bixa orellana L. con número cromosómico diploide $n=14$ (da Silva et al. 2018), es conocida como achote, achote de la montaña, achioti, bixa, bija, bijol, bijo, urucú, onoto, annatto orellana, orlean, pumacua, bicha caituco, chacangaricua, entre otros nombres (Raddatz-Mota et al. 2017). Pertenece a la clase: *Magnoliopsida*; subclase: *Dilleniidae*; Orden: *Malvales*; Familia: *Bixaceae*; Género: *Bixa* (Cárdenas-Conejo et al. 2015). Recientemente se ha reportado que *Bixa urucurana* es el ancestro silvestre de *B. orellana*, *B. arborea*, *B. excelsa*, *B. platycarpa* (Moreira et al. 2015). *B. orellana* es un arbusto perenne, que generalmente mide de 3 a 5 m de altura y llega a medir hasta 10 m. Presenta una copa baja y extendida; tallo pardo, ramifica a poca altura del terreno. Sus hojas son simples, palmatinervias y con estípulas, grandes de 10-20 x 5-10 cm y base redondeada o subtruncada, verdosas claras, persistentes, alternas, márgenes lisos, cordadas, de largos pecíolos delgados y pubescentes de 3-8 cm de largo, engrosado en los extremos. Tanto las hojas como el tallo contienen una savia rojiza (Leal y de Clavijo 2010, Villar et al. 2014). Figura 1.1.



Figura 1.1. Árbusto de achiote. (Tomada de da Silva et al. 2018)

Las flores son simétricas, poseen ambos sistemas de reproducción en inflorescencias paniculares; de 5-10 cm de longitud con cinco pétalos imbricados y retorcidos en la yema; blanquecinas a rosadas según variedades, flores de 3-6 cm de diámetro, en pedicelos de 7-16 mm de largo, y un anillo de glándulas debajo del cáliz; éste con sépalos anchos, ovados a orbiculares, de 1 a 2 cm de largo, caducos; corola de pétalos muy obovados, de 1-2 cm de largo, rosados a blancos; muchos estambres, y anteras violáceas. *B. orellana* L. florece escalonadamente, comenzando por los capullos terminales (Leal y Michelangeli, 2010., Rivera y Flores 1988). Figura 1.2.

Los estambres son numerosos con filamentos libres, dos tecas, que se abren en el ápice por dos hendiduras. El ovario es súpero, con dos a cuatro carpelos fundidos en un lóculo

y dos placentas parietales con numerosos óvulos. El estilo es delgado, el cual termina en un estigma bilobado (que tiene dos lóbulos). Figura 1.2.



Figura 1.2. Flores de achote

El fruto es una cápsula roja, verde, pardos, o morados de 2 a 6 cm de largo. La cápsula presenta espinas cortas o sin ellas, de color verdoso oscuro a morado, (según la accesión), dehiscente (fruto abierto), y que al madurar se separan en dos valvas de simetría bilateral, aunque pueden encontrarse accesiones indehiscentes (fruto cerrado); que al madurar pasa a pardo rojizo oscuro. Figura 1.3.



Figura 1.3. Frutos de achiote

La semilla es considerada la parte de la planta con mayor valor comercial, ya que es la principal fuente de almacenamiento del pigmento natural, la bixina (Villar et al. 2014).

En cada valva hay semillas en número variable (30-45, en relación con el tamaño capsular) (Raddatz-Mota et al. 2017). La semilla puede medir de 0.3-0.5 cm de largo y 0.2-0.3 cm de diámetro y varia de forma piramidal a cónica (Villar et al. 2014), tiene un tegumento recubierto de una sustancia viscosa rojiza intensa (Zotyén, 2002). Las semillas contienen un embrión grande rodeado por un endospermo granular, con almidón abundante (Leal y Michelangeli, 2010). Figura 1.4.

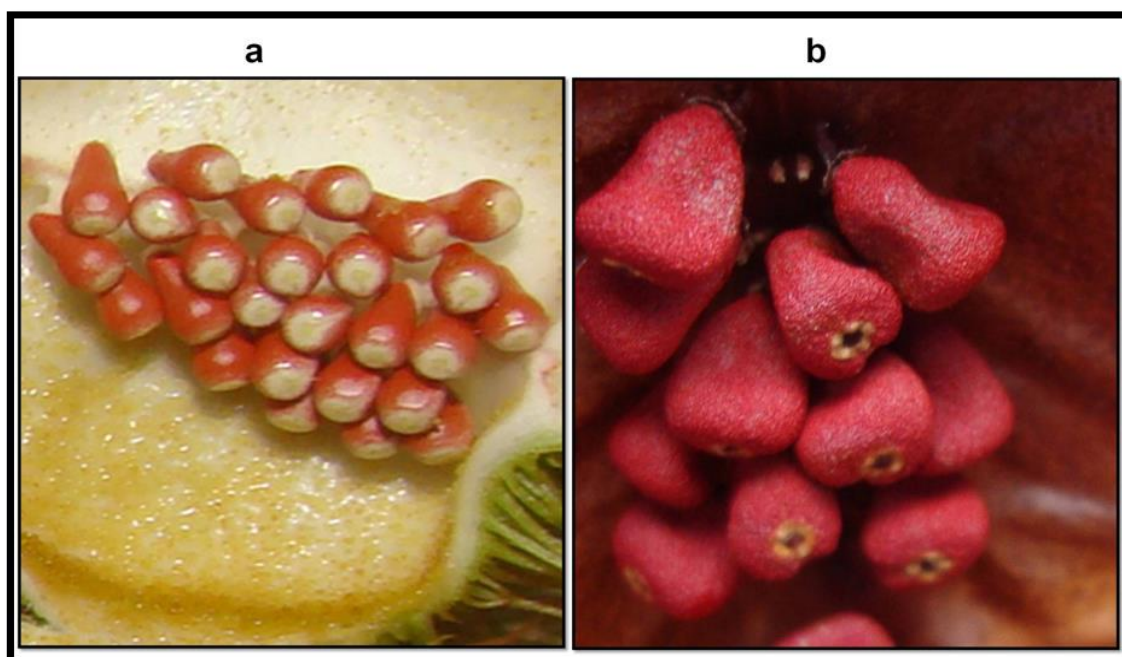


Figura 1.4. Semilla de achiote. a) semilla inmadura. b) semilla madura

1.2. La bixina

La bixina es la forma *cis* del monometil éster del ácido norbixina dicarboxílico, el cual se encuentra en todos los tejidos de la planta de achiote y principalmente en el arilo de la semilla (3.4-5.3%) donde representa del 80% al 90% de los colorantes totales (Akshatha et al. 2011, da Silva et al. 2018). La bixina es un carotenoide carboxílico con una estructura básica, con un grupo carboxílico libre y otro esterificado, los cuales le confieren las características de un ácido orgánico, en especial en lo referente a solubilidad y estabilidad.

Gracias al radical esterificado, la bixina es soluble en aceites y grasas, además de en solventes como el cloroformo, piridina, ácido acético glacial y propilenoglicol; bajo condiciones normales tiene gran estabilidad, pero tiende a degradarse en presencia de la luz y de las temperaturas altas; es resistente a ácidos, alcoholes y a la acción microbiana (Akshatha et al. 2011).

1.3 Usos de la bixina

La bixina ha sido utilizada desde la época precolombina como colorante y especia con propósitos medicinales. La bixina es un colorante natural (E 106b) que se utiliza en la industria de los alimentos, farmacéutica, cosmética y recientes estudios han encontrado propiedades medicinales y biológicas (Rivera-Madrid et al. 2016, Raddatz-Mota et al. 2017, da Silva et al. 2018).

1.3.1 Alimentación

La bixina ahora se valora comercialmente por la industria alimentaria, ya que reemplaza los colorantes sintéticos desarrollados en el siglo pasado (Moreira et al. 2015). La bixina es muy utilizada como condimento o como sazónador de carnes, cereales y más como colorante natural en lácteos, grasas y helados, alimentos de aves de corral, preparación de pescado, surimi, panadería, varios postres, mermelada, gelatinas, crema y glaseado para pasteles, salsas, condimentos, dulces, y bebidas como aperitivos, refrescos, jugos y emulsiones (Venugopalan et al. 2011, Raddatz-Mota et al. 2017, da Silva et al. 2018).

1.3.2 Medicinal

Hay una gran cantidad de literatura que apoya el uso de la bixina como un componente con propiedades bioactivas, además de su uso como colorante alimentario (Rivera-Madrid et al. 2016, da Silva et al. 2018).

Se ha documentado el uso de diferentes partes de la planta, especialmente las hojas, semillas y raíces contra la viruela, enfermedades digestivas como la diarrea, dolor abdominal, indigestión, dolor de cabeza, dolor de garganta, así como para curar enfermedades urinarias y como agente abortivo (Rivera-Madrid et al. 2016).

El arilo de la semilla se utiliza para el tratamiento en quemaduras y sangrado, disentería, gonorrea, constipación y fiebre. La semilla y hojas del achiote también tiene propiedades anti-inflamatorias (Zarza-García et al. 2017), la decocción de las hojas es utilizada para detener el vómito, problemas en la próstata, hipertensión, colesterol, obesidad e insuficiencias renales (Dike et al. 2012, Raddatz-Mota et al. 2017).

La bixina también tiene efecto anti-oxidante, protege a la célula contra los radicales libres

(Rios et al. 2007); se ha estudiado sus propiedades anticancerígenas y apoptóticas (Kumar et al. 2009, Coronado-Cáceres et al., 2014). Se ha reportado que sus propiedades anticancerígenas se atribuyen a compuestos como el geranilgeraniol, escualeno y beta-sistosterol (Kumar et al. 2009).

Por otro lado, se ha estudiado su actividad antimicrobial apartir de los extractos de etanol de las hojas y semillas contra los microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Salmonella typhi*, *Escherichi coli*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* (Fleischer et al. 2003, Abayomi et al. 2014).

1.3.3 Industrial

A nivel indutrial, la bixina ha sido utilizada en la industria textil, en la tinsión de madera, cuero y principalmente en la insudtria cosmética (Guiliano et al. 2003). Por otro lado, también se utiliza en la fabricación de pinturas, lacas, colorante para mantequilla, helados, productos relaciondaos a la repostería (Villar et al. 2014, Raddatz-Mota et al. 2017). Los extractos de bixina solubles en agua son utilizados en la elaboración de aperitivos y tratamiento de bebidas; como emulsificante es utilizado en la preparación de alimentos, tales como helados, dulces y otros productos (Raddatz-Mota et al. 2017).

1.3.4 Uso ornamental

Como planta ornamental el achiote es muy decorativa, en especial aquellos tipos que tienen cápsulas de colores encendidos que pueden estar entre el rosado fuerte al rojo oscuro (Álvarez y Gómez 1990, da Silva et al. 2018).

1.4 Compuestos Isoprenoides

Los isoprenoides son un grupo de moléculas biológicamente activas (Walter y Strack, 2011). Constituyen uno de los más diversos grupos de los productos en la naturaleza y participan en una amplia variedad de funciones biológicas, como ejemplos claros son la fotosíntesis, donde los componentes esenciales del aparato fotosintético son las clorofilas y los carotenoides. Los esteroles y carotenoides son más abundantes en las células vegetales, están involucrados en el mantenimiento de la fluidez de la membrana (función desempeñada por los esteroles en la mayoría de las eucariotas), así como en la estabilización de las membranas tilacoidales y protección de los componentes

fotosintéticos contra el daño foto-oxidativo (función desempeñada por los carotenoides) (Hirschberg 2001, Fraser y Bramley 2004). Otros isoprenoides intervienen en procesos de modificación post-traducciona de proteínas como la prenilación (grupos prenil) y la glucosilación (dicoles) y forman parte de las cadenas de transporte electrónico (la cadena lateral de los tocoferoles y de las quinonas, ubiquinonas, plastoquinona y filoquinona), señalización intra-celular, mecanismos de defensa y degradación de proteínas (Hannoufa y Hossain 2012, Frank y Groll 2016).

Los isoprenoides participan también como reguladores de crecimiento como el ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA), citocininas (CK), brasinosteroides (BR) y estrigolactonas (SL) (Cazzonelli y Pogson, 2010). Los isoprenoides participan en mecanismos de defensa de las plantas como por ejemplo la β -ionona; los productos del catabolismo de los carotenoides participan en interacciones planta-insecto (Hannoufa y Hossain 2012) y adaptación a las condiciones del ambiente; no obstante, la mayoría de los isoprenoides presentes en las plantas actúan como metabolitos secundarios en la interacción de las plantas con su entorno. Algunos terpenos como los monoterpenos o los sesquiterpenos, desempeñan un importante papel en la defensa de la planta frente a patógenos y herbívoros. Algunos monoterpenos volátiles son los responsables de participar en la atracción de insectos para favorecer la polinización, así también la acumulación de carotenoides en flores y frutos son responsables de la atracción de animales para la dispersión de las semillas (Chappell, 2002., Croteau et al. 2000). Además, varios grupos de isoprenoides son empleados comercialmente como fuente natural de pigmentos, aromas, fibras, o ceras, así como por sus aplicaciones farmacéuticas (artemisina y taxol) y agroquímicas (Walter y Strack, 2011).

A pesar de su enorme diversidad, todos los isoprenoides derivan de un precursor universal el isopentilpírofosfato (IPP), molécula formada de cinco carbonos (C₅) y su isómero dimetilalildifosfato (DMAPP). La clasificación de los isoprenoides está basada en el número de construcciones de residuos IPP o C₅. Todos los terpenos son múltiplos de isoprenos con la fórmula molecular (C₅H₈)_n, donde n es el número de unidades de isopreno en la molécula (Kumari et al. 2013). La enorme diversidad de los terpenos no sólo se limita a la estructura y a su función, también depende de los patrones de emisión

dentro y entre especies, los cuales pueden depender del clima, genes u otros factores (Kumari et al. 2013).

1.5 Rutas de Biosíntesis de los Isoprenoides

La vía de biosíntesis de los isoprenoides fundamentalmente se basa en tres etapas; la primera etapa resulta en la formación de IPP y DMAPP, la base de unidades de IPP (isopreno). La segunda etapa involucra la condensación de dos o tres unidades de C_5 para formar prenil difosfatos (PDPs) de C_{15} y C_{20} , catalizados por una pequeña cadena enzimática de prenil transferasas (PT). Al final de la etapa de la biosíntesis del terpeno los PDPs son convertidos en diversos compuestos a través de múltiples pasos de ciclización catalizados por una amplia familia de enzimas únicas llamadas terpeno sintasas (TPSs) (Kumari et al. 2013).

Actualmente se conoce la existencia de dos rutas biosintéticas para la formación de precursores de isoprenoides, la vía del mevalonato (MVA) y la vía del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) (Rohmer et al. 1993; Lichtenthaler et al. 1997). Las plantas utilizan ambas vías para sintetizar los precursores de sus isoprenoides, aunque ellas se localizan en compartimientos celulares diferentes (Withers y Keasling, 2007). Claramente las vías MVA y MEP representan dos diferentes estrategias empleadas por la naturaleza para sintetizar precursores de cinco carbonos. Además, existe una distribución bien definida de las vías entre diferentes reinos (Zhao et al. 2013).

1.5.1 Vía del Mevalonato (MVA)

La vía de mevalonato para la biosíntesis de isoprenoides representa el paso inicial en una serie de reacciones enzimáticas que han sido establecidas para la producción de poliisoprenoides y esteroides en hongos, citoplasma de células vegetales, animales, la mayoría de los eucariotes, arqueas y algunas bacterias Gram-positivas (Miziorko, 2011; Rohmer et al. 1996). Sin embargo, existen algunas excepciones con este patrón, se sabe que algunas eubacterias utilizan la vía del mevalonato en lugar de la ruta MEP, con alguna especie que lleva genes en ambas vías, donde el protozario parásito *Plasmodium falciparum* se basa en la vía MEP (Kirby y Keasling, 2009).

En la vía del ácido mevalónico (MVA), tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP) en el citoplasma (donde sesquiterpenos (C_{15}) y triterpenos (C_{30}) así como esteroides son producidos) (Estévez et al. 2001; Zhao et al. 2013).

La vía de mevalonato consiste en seis pasos que transforman acetil-CoA a IPP (Isopentenildifosfato), seguido por una isomerasa de IPP que mantiene un balance entre el IPP y su isómero DMAPP (Kirby y Keasling, 2009), Figura 1.5.

Para la síntesis de isoprenoides por la vía MVA, el precursor acetil-CoA es derivado de un metabolismo intermediario, vía 3-hidroxi-3metilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintasa y el HMG-CoA reductasa. La producción de Mevalonato es reversible y la enzima HMG-CoA reductasa regula este paso limitante. El mevalonato es fosforilado, descarboxilado, e isomerizado a IPP, la base principal para la construcción de isoprenoides. La condensación de dos moléculas de IPP produce geranil difosfato (GPP), y una condensación adicional de IPP, mediante la farnesilpirofosfato (FPP) sintasa, produce FPP, que es el principal intermediario de todos los isoprenoides mayores. Particularmente, la subsecuente biosíntesis de geranilgeranildifosfato (GGPP) mediante la enzima GGPP sintasa, conduce a la ubiquinona, mientras que la biosíntesis de escualeno conduce a través de lanosterol, a colesterol (Miziorko, 2011; Kirby y Keasling, 2009).

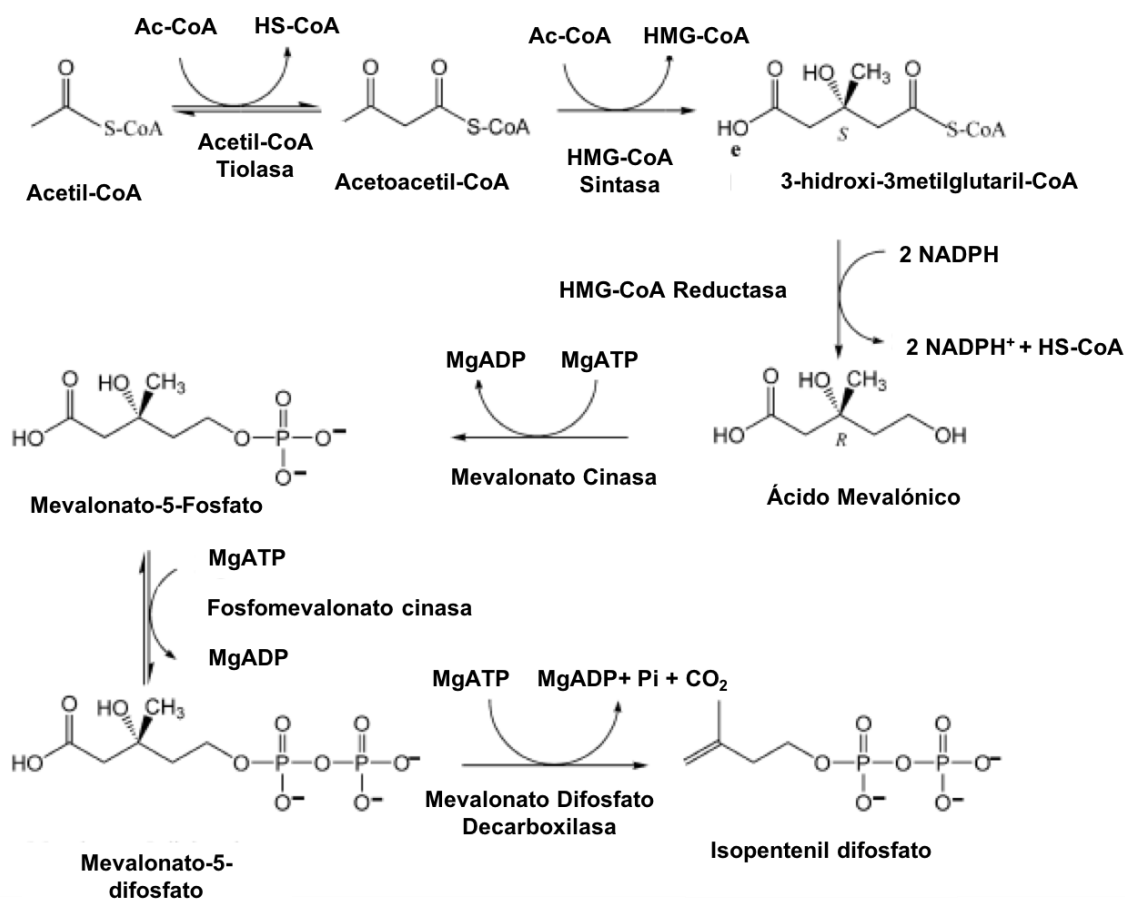


Figura 1.5 Vía del Mevalonato. (Tomada de Miziorko, 2011).

1.5.2 Vía del 2C-metil-D-eritrol 4-fosfato (MEP)

La vía MEP fue descubierta por Rohmer et al. (1993) con experimentos en *Escherichia coli* (*E. coli*). Por años se pensó que la única fuente de isoprenoides era la vía MVA, incluso el esquema biogenético había sido establecido para muchos eucariotes y algunas arqueobacterias, poco se conocía sobre la biosíntesis de isoprenoides en eubacterias. Con la incorporación de acetatos y glucosa marcados con ^{13}C y ^2H en triterpenoides de la serie de hopanos y en la cadena lateral isoprénica de ubiquitina de *E. coli*, se descubrió que la biosíntesis de carotenoides iba en contradicción con el esquema clásico de la vía MVA, promoviendo que la vía MVA no operaba en todos los organismos y que el esqueleto isoprénico podía ser formado a partir de derivados de la triosa fosfato a través de otra vía (Rohmer et al. 1993, 1996).

Así se empezó a considerar la existencia de una ruta alterna concerniente a los primeros

pasos de la biosíntesis de isoprenoides.

En plantas, la ruta MEP (nombrada por la primera molécula comprometida en la vía 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato) se localiza en los plastidios donde se genera el IPP (Figura 1.6). En estudios filogenéticos el origen exacto de los genes de la vía MEP en plantas no es claro, porque la mayoría de los genes de plantas de esta vía no se ramifican con sus homólogos de cianobacterias. Se tiene una teoría sobre que los genes en plantas fueron adquiridos subsecuentemente del origen de los plastidios y la transferencia lateral de genes hacia eubacteria juega un papel importante (Lichtenthaler et al.1997; Lichtenthaler et al. 1999; Kirby y Keasling, 2009; Walter y Strack, 2011).

El IPP y DMAPP de los plastos son los precursores activos en la biosíntesis de fitohormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glucósidos cardiacos), látex y aceites esenciales, a través de reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a prenil bifosfatos como geranil difosfato (GPP), precursor de monoterpenos y geranilgeranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos (Walter y Strack, 2011).

La vía MEP comienza por la condensación de piruvato y gliceraldehído-fosfato para dar lugar a 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP); una reacción catalizada por 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS). Esto seguido por una reacción catalizada por 1-desoxi-D-xilulosa 5- fosfato reductoisomerasa (DXR) y una cascada de otras reacciones que llevan producción de las moléculas de isopentenil difosfato (IPP) y de dimetilalilpirofosfato (DMAPP). El IPP y el DMAPP constituyen los bloques de cinco carbonos esenciales a partir de los cuales se generará la gran variedad de isoprenoides (Figura 1.6). Las actividades de las enzimas DXS y DXR afectan la acumulación de carotenoides en plantas, presumiblemente a través del control del flujo de IPP y DAMPP (Hannoufa y Hossain 2012). El IPP y el DMAPP son sustrato para la geranil difosfato sintasa para la producción de Geranil difosfato (GPP), C₁₀, que a su vez actúa como sustrato para la enzima geranil-geranil difosfato sintasa, originándose el Geranil Geranil difosfato (GGPP), C₂₀. GGPP resulta ser el principal intermediario para la producción de fitoeno, C₄₀, que es el precursor carotenoide para la biosíntesis de bixina. Por tanto, la enzima fitoeno sintasa

(PSY), la cual actúa sobre GGPP para generar fitoeno, es una enzima clave para la biosíntesis de carotenoides y bixina (Hannoufa y Hossain, 2012), Figura 1.6.

1.6 Carotenoides

Los carotenoides son un grupo de pigmentos naturales distribuidos ampliamente en plantas, algas, hongos y bacterias. Algunas flores, frutos y raíces tienen colores vivos naranjas, amarillos y rojos debido a los carotenoides (Sun et al. 2017). Los carotenoides son un grupo de compuestos isoprenoides que comprenden más de 700 estructuras (Della Penna y Pogson, 2006). Se biosintetizan a partir de precursores de cinco carbonos, el IPP y su isómero DMAPP, precursores que comparten con el resto de los compuestos de naturaleza isoprenoide como giberelinas, tocoferoles, clorofilas y fitoquinonas (Walter y Strack, 2011). Los carotenoides son moléculas de 40 carbonos cuya principal característica es la presencia de una larga cadena de polieno (en donde la presencia de dobles enlaces puede variar de 3 a 15) responsable del color percibido por el ojo humano (Rodríguez 2010). Los cientos de estructuras conocidas de carotenoides se dividen en dos grupos: carotenos (moléculas no oxigenadas) y las xantofilas (carotenoides oxigenadas). El centro de la vía para la biosíntesis de la mayoría de los carotenoides en plantas ha sido bien establecido, son producidos en los plástidos por precursores de isopreno por la vía MEP (Rodríguez-Concepción y Stange 2013).

En plantas, la biosíntesis y almacenamiento de los carotenoides es en los plastidios; en plantas existen varios tipos de plastidios como son los proplastidios, amiloplastos, etioplastos, cloroplastos y cromoplastos. Todos los tipos de plastidios con excepción de los proplastidios poseen la capacidad de producir carotenoides (Sun et al. 2017).

Los cloroplastos se encuentran asociados a las proteínas que forman los complejos fotosintéticos contribuyendo a la captación de la luz y actuando como antioxidantes esenciales para la fotoprotección. En algunos tejidos no fotosintéticos, los carotenoides se acumulan en plastos especializados llamados cromoplastos. En estos plastos los carotenoides son acumulados en distintos tipos de estructuras lipoproteicas y cristalinas (Vishnevetsky et al. 1999). Además de colorear flores y frutos, los productos de degradación de los carotenoides proporcionan aromas y sabores característicos. Los carotenoides también son precursores de un grupo de metabolitos apocarotenoides que

actúan como moléculas señal. Los plastídios tienen funciones específicas y una única morfología única, lo que los lleva a tener capacidades diferentes de sintetizar y acumular carotenoides (Sun et al. 2017).

Los animales no pueden sintetizar carotenoides *de novo* por lo que necesitan ingerirlos a través de su dieta para la producción esencial de retinoides como el retinol o vitamina A. (Della Penna y Pogson, 2006; Águila y Rodríguez-Concepción, 2012). Algunos animales acumulan grandes cantidades de carotenoides de la dieta como, por ejemplo, los flamings y el salmón que tienen color bermellón causado por el carotenoide astaxantina. El consumo de alimentos ricos en carotenoides ha sido asociado a numerosos beneficios sobre la salud. Los carotenoides no sólo colorean el mundo, también tienen funciones fisiológicas como precursores de la vitamina A, antioxidantes y captadores de luz. Por lo tanto, los carotenoides a menudo se han sugerido como biomarcadores de enfermedades, ya que pueden indicar estados de salud y nutricional general de un individuo (Lintig y Sies 2013).

Recientemente se ha publicado que una ingesta diaria elevada de carotenoides en la dieta se correlaciona con la prevención de ciertos tipos de cánceres y enfermedades coronarias (Christen et al. 2003). Una dieta pobre en β -caroteno aumenta el riesgo de padecer cataratas y degradación macular (Christen et al. 2003), cáncer de pulmón (aunque dosis muy elevadas en pacientes de riesgo como fumadores presentan efectos adversos) del mismo modo que se relaciona con la aparición de enfermedades cardiovasculares (Kohlmeier, 1995). Diversos estudios relacionan dosis elevadas de licopeno con la prevención de cáncer de pecho (Dorgan et al. 1998), del cáncer de próstata (Giovannucci et al. 1995) y el caso de ingestas elevadas de luteína aún queda por determinar su efecto positivo en la disminución del riesgo del cáncer de colon (Slattery, 2000). Pero sin duda el mayor beneficio que presenta una dieta rica en carotenoides, en concreto en β -caroteno, es su papel como provitamina A, este hecho cobra relevancia en países en vías de desarrollo, donde el β -caroteno se encuentra ausente en la mayor parte de los alimentos que constituyen la dieta básica de la mayoría de la población causando una ligera incidencia de ceguera infantil (Hannoufa y Hossain, 2012).

Debido a sus propiedades antioxidantes beneficiosas para la salud humana y a sus

propiedades colorantes empleadas en el mundo de la industria como pigmentos naturales, se ha generado una fuerte demanda en la producción de carotenoides. Sin embargo, las técnicas empleadas hasta el momento, como son la síntesis química y la extracción a partir de fuentes naturales han demostrado ser insuficientes, por lo que aparece como alternativa la producción biotecnológica de carotenoides en sistemas bacterianos y vegetales (Kirby y Keasling, 2009, Zhao et al. 2013). En las últimas décadas se han realizado numerosos esfuerzos para manipular genéticamente microorganismos y plantas para enriquecerlos en su producción de carotenoides o su empleo como fábricas celulares (Giuliano et al. 2008). Especialmente notorio es el caso de “golden rice”, donde la introducción de los genes *psy*, *pds*, *zds*, *β -lyc* en arroz para la formación del β -caroteno permitió tener una variedad enriquecida con este pigmento (Beyer et al. 2002), cuya ingesta se considerará que puede ayudar a prevenir la ceguera infantil en los países en vías de desarrollo (Ye et al. 2000).

Sin embargo, pese a los avances realizados en esta área, aún son muchas las incógnitas por resolver en cuanto a cómo se regula la biosíntesis de estos pigmentos para la consecución de una producción biotecnológica de elevado rendimiento. El limitado conocimiento de los pasos limitantes en la biosíntesis de carotenoides, así como otros factores relacionados con su almacenamiento o su relación con otras vías biosintéticas impide la conversión de esta industria biotecnológica en una industria madura, constituyendo estos factores por su importancia, un área de estudio de elevado interés (Rodríguez, 2010, Nisar et al. 2015).

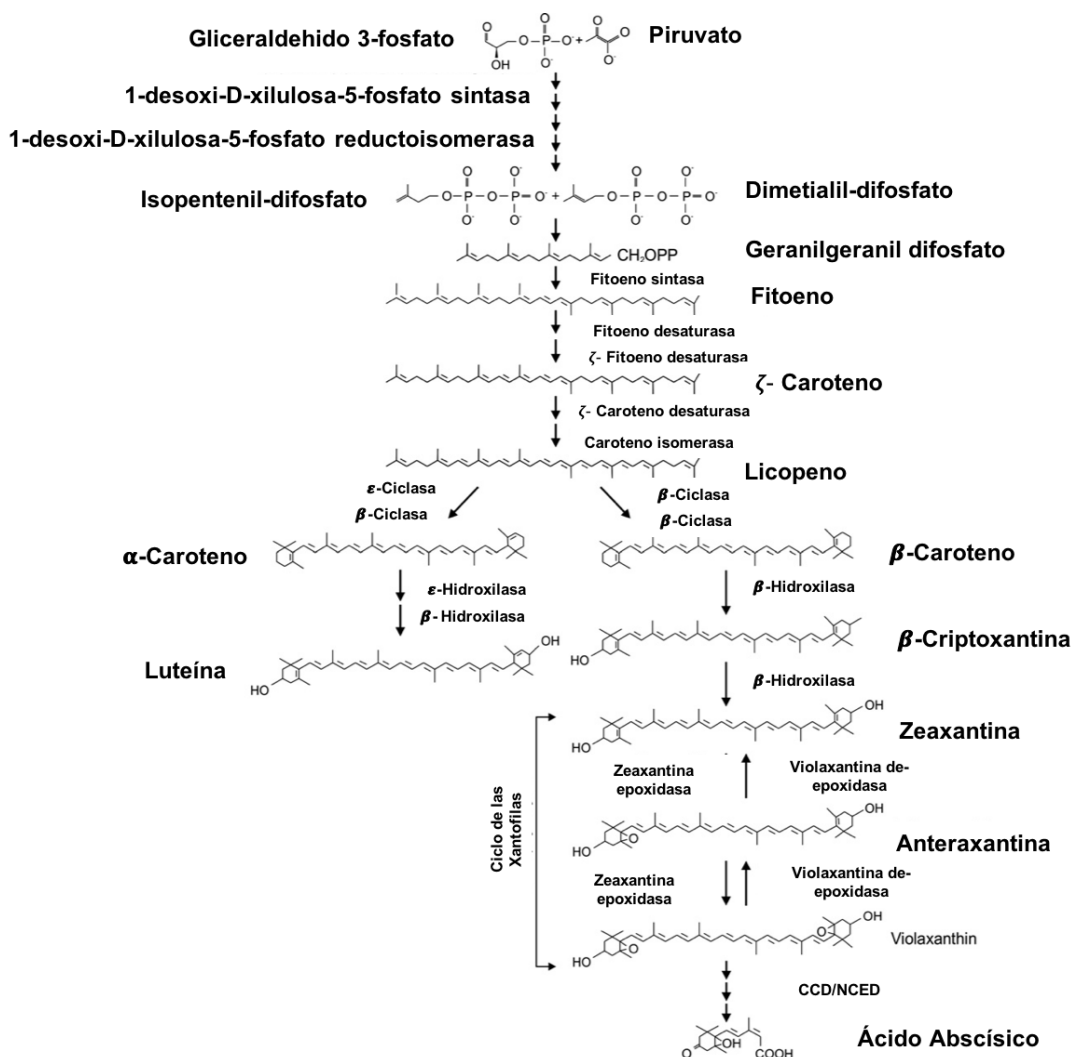


Figura 1.6 Vía metabólica de la síntesis de carotenoides en plantas.
(Tomada de Hannoufa y Hossain, 2012).

1.7 Biosíntesis de carotenoides en Plantas

Los carotenoides son derivados de la vía MEP localizada en los plastídios, en la cual el gliceraldehído 3 fosfato y piruvato actúan como substratos iniciales para llevar a la síntesis de geranilgeranil difosfato (GGPP), el primer paso en la biosíntesis de carotenoides en plantas (Figura 1.6). La condensación de dos moléculas de GGPPs por acción de la fitoeno sintasa (PSY) forman una molécula de fitoeno (Hirschberg, 1999), el primer carotenoide incoloro de la ruta biosintética (Cazzonelli y Pogson, 2010; Hannoufa y Hossain 2012; Han et al. 2014).

PSY cataliza dos reacciones: condensación cabeza-cabeza de dos moléculas de GGPP para formar la reacción intermedia pre-fitoeno difosfato seguida de la eliminación del grupo fosfato de este intermediario en un complejo rearrreglado que involucra una neutralización del carbocatión para la formación de fitoeno (Hannoufa y Hossain 2012). Las enzimas PSY de las plantas usualmente utilizan todo el trans GGPP como un sustrato para sintetizar 15-*cis* fitoeno, isómero normalmente encontrado en células (Walter y Strack, 2011; Águila y Rodríguez-Concepción, 2012). PSY es generalmente aceptada como la enzima reguladora más importante en la vía. Los genes que codifican para esta enzima han sido identificados y aislados variando en número entre las diferentes plantas. En *Arabidopsis* se ha identificado un único gen, mientras que dos fitoeno sintetas han sido descritas en tabaco (Busch et al. 2002), en jitomate (Fray y Grierson, 1993; Giorio et al. 2008), maíz, arroz, álamo, trigo (Cazzonelli y Pogson, 2010) y en *Bixa orellana* L. (Cárdenas-Conejo et al. 2015).

Los miembros de la familia del gen PSY son diferencialmente expresados en varios órganos de las plantas y también diferencialmente regulados por estímulos del ambiente (Arango et al. 2010; Li et al. 2008 a, b; Welsch et al. 2008). A este respecto, se ha observado que la expresión del gen PSY es regulada durante la formación de frutos y acumulación de carotenoides en plantas de tomate (Ray et al. 1992).

Todas estas enzimas se sitúan en los plastos, desde donde son importadas después de ser sintetizadas (Fraser y Bramley, 2004; Dogbo et al. 1988; Misawa et al. 1994). Se creía que la enzima PSY era una proteína integral de membrana, sin embargo, a partir de estudios bioquímicos llevados a cabo en fitoeno sintetas aisladas de cromoplastos (PSY1) y de cloroplastos (PSY2) de tomate (Fraser et al. 2000), se llegó a la conclusión de que esta enzima estaba asociada a membranas y se llegó a pensar en la formación de un complejo proteico soluble formado por Geranil geranil piriofosfato desaturasa (GDS) y PSY que catalizaría la formación de fitoeno en el estroma plastídico (Cunningham y Gantt, 1998). La actividad de enzimas múltiples parece redundante, pero su expresión es específica de tejido y muestra una única respuesta al estímulo ambiental en raíces de cereales (Arango et al. 2010; Li et al. 2008a, b; Welsch et al. 2008). En los siguientes pasos de la vía de síntesis de los carotenoides, una serie de cuatro desaturaciones y dos isomerizaciones incrementan la serie de dobles enlaces conjugados para transformar el

15-*cis* isómero fitoeno en all-*trans* licopeno, un carotenoide rosa/rojo (Águila y Rodríguez-Concepción, 2012; Isaacson et al. 2002) el cual requiere un complejo de cuatro reacciones catalizadas por fitoeneo desaturasa (PDS), ζ -caroteno isomerasa (Z-ISO), ζ -caroteno desaturasa (ZDS) y carotenoide isomerasa (CRTISO), así como una isomerización mediada por luz (Römer et al. 2000).

Los pasos de desaturación transforman fitoeno por fitoflueno en ζ -caroteno, neurosporeno y licopeno, incrementando el número de dobles enlaces conjugados a cinco, nueve y once, respectivamente. Este incremento en los cambios de los dobles enlaces de la cadena de polieno provoca una longitud de onda más larga, lo que lleva a obtener un color pálido/amarillo de ζ -caroteno, naranja/amarillo de neurosporeno y rosa/rojo de licopeno (Cunningham y Gantt, 1998). Las dos desaturaciones de fitoeno para producir ζ -caroteno vía fitoflueno son catalizadas por PDS y las dos desaturaciones de ζ -caroteno para producir licopeno vía neurosporeno son catalizadas por ZDS (Misawa et al. 1994).

Todos los genes que codifican para la PDS que han sido aislados e identificados en *Arabidopsis thaliana* (Lange y Ghassemian, 2003), jitomate (Pecker et al. 1996), maíz y tabaco (Busch et al. 2002), preservan un dominio conservado de unión a un dinucleótido FAD/NADP (flavina-adenina /nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), en el extremo amino terminal. Cada reacción de desaturación conlleva la desaparición de dos átomos de hidrógeno y la reducción de moléculas de plastoquinona que actúan como aceptoras. La generación de estas moléculas aceptoras tiene lugar gracias a la cadena de transporte de electrones de la fotosíntesis en cloroplastos. Los componentes de esta cadena redox en otros tipos de plastos han sido elucidados gracias a la caracterización de mutantes de *Arabidopsis* (Josse et al. 2000). En plastos no fotosintéticos como los cromoplastos o etioplastos de plántulas de *Arabidopsis* crecidas en la oscuridad, se vió como la reoxidación de las cinasas se llevaba a cabo por esta enzima empleando como aceptor final de electrones el oxígeno (Carol y Kuntz, 2001). Se observó que la actividad de esta enzima es crucial en los primeros estadios de desarrollo de las hojas, sin embargo, pese a continuar activa, va perdiendo relevancia a medida que la biogénesis de los cloroplastos se complementa (Carol y Kuntz, 2001). La conversión de la forma predominante en plantas de 15-*cis* fitoeno en todo *trans*-licopeno sugería la existencia de una isomerasa (CRTISO), que realizara la isomerización de carotenoides (Isaacson et al. 2002), junto con

la acción de la enzima ζ -caroteno isomerasa (Z-ISO). La existencia de esta enzima se ha corroborado en trabajos realizados en maíz. No obstante, no ha sido demostrada a nivel molecular (Li et al. 2007).

De manera sorprendente, todas las reacciones necesarias para la conversión de fitoeno en licopeno pueden ser realizadas por la fitoeno desaturasa bacteriana (CrtI), quien es capaz de realizar todas las reacciones de isomerización y desaturación antes mencionadas (Giuliano et al. 2008). Por esta razón, esta enzima bacteriana ha sido ampliamente utilizada en estudios de ingeniería genética que pretendiendo incrementar los niveles de carotenoides en diferentes especies de plantas (Fraser y Bramley, 2004). La coexpresión de los genes fitoeno sintasa (*psy*) en plantas y en bacterias (CrtB y CrtI) conlleva un aumento en los niveles de pigmentos (Diretto et al. 2007). Del mismo modo, la coexpresión de ambos genes en el endospermo del arroz, induce la acumulación de β -caroteno, un pigmento de color naranja, dando lugar al conocido “golden rice” (Ye et al. 2000; Beyer et al. 2002). Se ha postulado que la acumulación de fitoeno involucra una regulación de retroalimentación negativa. Por ejemplo, en mutantes de *pds3*, algunos genes que codifican en la etapa río abajo de la ruta metabólica de carotenoides, así como *zds* y *βlyc*, fueron negativamente regulados, lo mismo que los genes que codifican para enzimas que participan río arriba de la ruta, como IPI, GGPS y PSY (Cazzonelli y Pogson, 2010).

1.7.1 Biosíntesis de carotenoides apartir de licopeno

Por otro lado, la ciclización del licopeno constituye un punto central de ramificación en la ruta de biosíntesis de los carotenoides, conduciendo por una parte hacia la formación de pigmentos fotosintéticos con uno o dos ciclos tipo beta, y por otra a la de pigmentos con uno o dos anillos tipo alfa (Cunnigham y Gantt, 1998; Bartley y Scolink, 1995). Consecuentemente, las actividades relativas de la enzima ϵ - y β -licopeno ciclasa pueden determinar el flujo de carotenoides desde el licopeno, hacia la formación de carotenoides cíclicos o hacia la biosíntesis de compuestos lineales como bixina (Cazzonelli y Pogson, 2010; Hannoufa y Hossain, 2012).

El licopeno, que es una molécula lineal, sufre una reacción de ciclización que le genera un anillo de seis carbonos a cada uno de sus extremos. La formación de un anillo ϵ o un

anillo β en el primer paso de ciclación, únicamente depende del tipo de ciclasa que actúe sobre el licopeno, ya que la actividad de la enzima β -ciclasa (β -lcy) difiere de la actividad del enzima ϵ -ciclasa (ϵ -lcy) únicamente por la posición donde introduce el doble enlace en el anillo ciclohexano. Estos dos pasos de competición de licopeno ciclasa determinan la vía de ramificación de los carotenoides; β -caroteno y α -caroteno, ambos de color naranja. Las dos vías de ramificación resultan de la reacción de ciclación nombrada vía de β , β -carotenoides y la vía β , ϵ -carotenoides (Hannoufa y Hossain, 2012, Rodríguez-Concepción y Stange 2013).

Generalmente la actividad relativa de β -LCY y ϵ -LCY regulan la distribución de sustratos hacia las β , β -carotenoides y β , ϵ -carotenoides. En crisantemo, el cambio en la composición entre pétalos y hojas es causado por la expresión diferencial de β -LCY y ϵ -LCY (Kishimoto y Ohmiya 2006).

Estos y otros hallazgos han llevado a varios intentos de emplear la ciclación del licopeno como un medio de manipulación de las proporciones del α -caroteno y el β -caroteno en las plantas. En jitomate, para silenciar los genes β -lcy y ϵ -lcy por la técnica de RNA de interferencia, se construyeron vectores de expresión de los genes β -lcy y ϵ -lcy y se transformaron plantas vía *Agrobacterium tumefaciens*. En las plantas transgénicas se redujo el nivel de los transcritos de β -lcy y ϵ -lcy en comparación con las plantas tipo silvestres, sin embargo, también se incrementó el contenido de licopeno. El silenciamiento del gen β -lcy causó disminución del contenido de β -caroteno, luteína y carotenoides totales; en caso contrario, al silenciar el gen ϵ -lcy, el β -caroteno y los carotenoides totales incrementaron, no obstante, la luteína disminuyó (Ma et al. 2011). Experimentos realizados en cromoplastos de chiles (Cámara y Dogbo, 1986) y en jitomates (Fraser et al. 2000), demostraron que ambas ciclasas requerían de NADPH como cofactor para desarrollar su actividad de ciclasa (Beyer et al. 1991). A diferencia de β -lcy que es capaz de catalizar la conversión de licopeno en β -caroteno introduciendo dos anillos β , el cual posteriormente es convertido a zeaxantina vía criptoxantina; para la formación de α -caroteno se requiere la actuación consecutiva de ambas ciclasas. La incapacidad de la ϵ -ciclasa de añadir más de un anillo ϵ se ha sugerido como un mecanismo para controlar la formación de carotenoides cíclicos en *Arabidopsis*, ya que su homólogo en ciertas especies de la lechuga (*Lactuca sativa*) ha demostrado introducir dos anillos ϵ , pese a

presentar un 80% de homología proteica con enzimas β LCY (Pecker et al. 1996).

En frutos de cítricos, mandarina Satsuma (*Citrus unshiu* Marc.), naranja Valencia (*Citrus sinensis* Osbeck) y limón Lisbon (*Citrus limon* Burm.f.), se observó que existe una diferencia en la acumulación de carotenoides β , ϵ -caroteno entre el flavedo y en los sacos de jugo durante la maduración de los frutos (Kato et al. 2004). Este cambio es causado por la presencia de dos tipos de cilcasas tipo beta: *LYCb1* y *LYCb2*. Sin embargo, como el papel de los genes *LYCb1* y *LYCb2* en la producción de α -caroteno no fue claro, se analizó el cambio de expresión estos genes en el flavedo y los sacos de jugo en las tres variedades de frutos en diferentes etapas de maduración. Se aislaron y analizaron los genes β lcy y ϵ lcy (*CitLCYb1*, *CitLCYb2* y *CitLCYe*) por complementación de color en células de *E. coli*, el análisis funcional mostró que ambas enzimas de *CitLCYb1* y *CitLCYb2* participan en la formación de β -caroteno y cuando son co-expresados con *CitLCYe*, el α -caroteno puede ser producido en células de *E. coli*. Sin embargo, cuando *CitLCYb2*, está expresada el nivel de producción es muy bajo, por lo que se sugirió que *CitLCYb2* no participa en la formación de α -caroteno durante las primeras etapas de maduración del flavedo (Zhang et al. 2012).

Los carotenoides cíclicos pueden ser modificados para generar xantofilas, las cuales son moléculas derivadas de la oxidación de carotenos. La hidroxilación de α -caroteno y del β -caroteno produce la luteína y la zeaxantina, respectivamente (Fraser y Bramley 2004). Así, la hidroxilación del C-3 y posición C-3' de cada anillo del α -caroteno (β , ϵ -caroteno) y β -caroteno (β , β' -caroteno), produce la xantofila, luteína y zeaxantina. Otras oxidaciones en las posiciones C-5,6 y C-5',6' del anillo β -3-hidroxi de zeaxantina, producen violaxantina por la vía del mono-eopoxidado intermediario anteraxantina (Fraser y Bramley 2004). La violaxantina puede ser transformada nuevamente a zeaxantina por la de-eopoxidación (llamado ciclo de la xantofila) o convertida a neoxantina por la apertura del anillo del ciclohexano (Hirschberg, 2001; Águila y Rodríguez-Concepción, 2012), Figura 1.6. En plantas superiores, la reacción de hidroxilación es muy común (Zhu et al. 2010).

La hidroxilación redundante de estas enzimas puede llevarse a cabo a través de la acción de dos no-hemo hidroxilasas (CHY1 y CHY2) o bien a través de las hidroxilasas tipo citocromo P450, CYP97A y CYP97C (Giuliano et al. 2008). La hidroxilación del anillo β , la llevada a cabo tanto por CHY1 y CHY2, como por CYP97A, genera zeaxantina a partir de

β -caroteno. Sin embargo, la hidroxilación del anillo ϵ del α -caroteno para producir luteína tiene lugar gracias a la acción de la hidroxilasa CYP97C (Tian et al. 2004, Galpaz et al. 2006). El nivel de redundancia varía según el tejido (Galpaz et al. 2006).

Mientras la hidroxilación de α -caroteno produce un carotenoide como producto final que se acumula en altos niveles en los cloroplastos (luteína), la hidroxilación de β -caroteno produce una xantofila (zeaxantina), que bajo condiciones de luz y en la obscuridad, es realmente convertida a violaxantina a través de anteraxantina, por la reacción catalizada en dos pasos por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP) (Hirschberg, 2001).

Los carotenoides pueden ser catabolizados para la formación de apocarotenoides por la acción de dioxigenasas de carotenoides (CCD), que contribuyen al mantenimiento de los niveles de carotenoides (Auldrige et al., 2006a). La eoxantina y la violaxantina pueden ser catabolizadas por la 9-epoxicarotenoide dioxigenasa para la formación de xantoxina, el sustrato directo de la fitohormona ácido abscísico (ABA) (Schwartz et al. 2003), molécula implicada en regular numerosos procesos del crecimiento vegetal, así como en la coordinación de diferentes respuestas a estrés abiótico (De Smet et al. 2003, Nambara y Marion-Poll, 2005, Li et al. 2008a; Welsch et al. 2008). El conocimiento sobre cada una de las reacciones enzimáticas implicadas en la biosíntesis de carotenoides, ha sido esencial en el desarrollo de diferentes aproximaciones biotecnológicas intentando modificar el contenido de pigmentos en organismos bacterianos y vegetales.

La hidroxilación ha sido mencionada como un proceso importante para la esterificación de carotenoides, que a su vez es necesario para la secuestación y estabilización en el cromoplasto (Schweiggert y Carle, 2017, Giuliano 2017, Sun et al. 2017). En pétalos de Japanese morning (*Ipomoea sp.*) se analizó la expresión de los genes carotenogénicos en diferentes etapas de desarrollo en los pétalos, observado que la mayor diferencia fue en la expresión del gen *CHYB* (β -hidroxilasa), el cual incrementó en la etapa 2 y 3 de la accesión *Ipomoea sp.*, mientras que en las otras dos accesiones (*Ipomoea nil* L. e *Ipomoea obscura* L.) su expresión se vio reducida, evidenciando así que *CHYB* tiene un papel importante en la acumulación de carotenoides en los cloroplastos de varias plantas, y *GGPS*, *PSY* y *PDS*, están involucrados en la regulación de dicho proceso (Yamamizo et al. 2010).

En camote (*Ipomea batatas* Lam.), un importante cultivo y fuente de alimento, para incrementar el contenido de β -caroteno a través de la inhibición de hidroxilación de β -caroteno, se evaluó el efecto de silenciar β -caroteno hidroxilasa (β CHY) en la vía de biosíntesis de carotenoides en tres diferentes cultivares con tonalidades diferentes de color en la pulpa: blancas (Yulmi), morada (Shinzamil) y naranja (Shinhwangmi). Se evaluó la expresión de los genes *GGPS*, *PSY*, *ZDS*, *LCY- β* , *LCY- ϵ* , *CHY- β* , y *ZEP*, y se reportó que *PSY* fue fuertemente expresado en hojas y en tallos en las tres variedades, pero la mayor expresión en raíces se presentó en la variedad de coloración naranja (Kim et al. 2012). La expresión de los genes en diferentes tejidos en las tres variedades fue regulada diferencialmente. β -caroteno se identificó como el mayor carotenoide acumulado; sin embargo, hubo diferencias en la cantidad de acumulación de carotenoides en los cultivares, por lo que se sugirió que no existe una relación positiva entre la acumulación de carotenoides y en los niveles de expresión de esos genes. Se observó que la variedad blanca fue la que presentó menos acumulación de β -caroteno, por lo que se eligió para analizar el efecto de la inhibición de β CHY. Mostrando así un incremento de β -caroteno. Sin embargo, se observó que las plantas transgénicas tenían un incremento en zeaxantina y β -criptoxantina; y se identificó que este efecto era causado por una diferente hidroxilasa que puede agregar un grupo hidroxilo a los anillos β (Kim et al. 2012).

1.8 Apocarotenoides

Los apocarotenoides son una clase de compuestos derivados del corte oxidativo de los carotenoides por las enzimas carotenoide dioxigenasas (CCDs) involucradas en la biosíntesis de una gran diversidad de metabolitos secundarios (Schwartz et al. 1997). Los apocarotenoides en plantas incluyen pigmentos, aromas y esencias, moléculas regulatorias y otros compuestos con funciones desconocidas, que desempeñan funciones biológicamente esenciales en las plantas, animales, insectos y bacterias fotosintéticas (Britton, 2008). La familia de CCDs es antigua, con un largo número de miembros presentes en bacterias, animales y plantas (Ryle y Hausinger 2002).

Ejemplos de apocarotenoides biológicamente activos en las plantas incluyen las fitohormonas como el ácido abscísico (ABA) (Schwartz et al. 1997) y las estrigolactonas (SL) (Dun et al. 2009).

En plantas, las CCDs constituyen una familia de enzimas que cortan los dobles enlaces

de la estructura de los carotenoides y pueden clasificarse en seis subfamilias de acuerdo con la posición del corte a lo largo de la estructura / o el sustrato de preferencia: CCD1, CCD2, CCD4, CCD7, CCD8 y NECDs (Auldrige et al. 2006a, Kloer y Schulz 2006, Walter y Strack 2011, Frusciante et al. 2014).

Las NCEDs (9-cis-epoxy-carotenoide dioxigenasas) en plantas están involucradas en la biosíntesis de ABA; La NCED1 de *Zea mays* L. fue la primera enzima carotenoide dioxigenasa caracterizada bioquímicamente y cataliza el primer paso para la biosíntesis de ABA cortando en las posiciones 11, 12 (11', 12') del doble enlace de la 9-cis-violaxantina o 9-cis-neoxantina (Schwartz et al. 1997; Tan et al. 1997). El gen fue aislado de una mutante de maíz deficiente de ABA (VP14) en *Z. Mays* (Schwartz et al. 1997; Tan et al. 1997).

En contraste, las CCDs 1, 2, 4, 7 y 8 cortan diferentes carotenoides en un solo extremo o en ambos y están involucrados en la producción de diferentes compuestos (Simkin et al. 2004a, Schwartz et al. 2001, Vogel et al. 2008, Walter y Strack 2011).

La CCD1 se distingue de las otras CCDs debido a su localización citosólica requerida para la producción de esencias y aromas volátiles como la β -ionona (Schwartz et al. 2001, Tan et al. 2003).

Estas enzimas pueden cortar en la posición 5,6 (5',6'); 7,8 (7',8'); y 9,10 (9',10') del doble enlace en un rango de carotenoides cíclicos y no cíclicos para producir diversos apocarotenoides (Schwartz et al. 2001, Bouvier et al. 2003b; Schmidt et al. 2006, Rubio et al. 2008, Simkin et al. 2004a, Vogel et al. 2008).

Ortólogos de las CCD1s han sido identificadas en varias especies de plantas tales como petunia (Simkin et al. 2004b), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Simkin et al. 2004a), azafrán (*Crocus sativus*) (Bouvier et al. 2003a, Rubio et al. 2008), uvas (*Vitis vinifera* L.) (Mathieu et al. 2005), melón (*Cucumis melo* L.) (Ibdah, 2006), cítricos (Kato et al. 2006), arroz (Ilg et al. 2009), nectarina (*Prunus persica* L.) (Baldermann et al. 2005), rosa (*Rosa damascena* Mill.) (Huang et al. 2009), y *Medicago truncatula* var. (Floss et al. 2008), y *Bixa orellana* L. (Rodríguez-Ávila et al. 2011b, Cárdenas-Conejo et al. 2015).

En contraste con las CCD1s, que se localizan en el citoplasma, las demás CCDs se encuentran localizadas en los plastidios (Tan et al. 2003, Ytterberg et al., 2006, Rubio et al., 2008, Lashbrooke et al. 2013).

Las CCD7 y CCD8 han sido identificadas en mutantes de brotes axiliares en *Arabidopsis* (Booker et al. 2004) y están involucradas en la síntesis de SL (Dun et al. 2009). Cuando se encuentran presentes en el mismo tejido, estas enzimas actúan en conjunto; cortan β -caroteno en la posición 9,10, secuencialmente, CCD8 corta el producto generado por CCD7 (C_{27} aldehído) en la posición 13, 14 para producir 13-apo- β -caroteno (Schwartz et al. 2004a, Auldridge et al. 2006b).

La subfamilia de CCD4s pueden cortar simétricamente carotenoides cíclicos o lineales en la posición 9,10 (9',10'), para producir apocarotenoides de C_{13} (Ohmiya et al. 2009, Rubio et al. 2008, Huang et al. 2009). También se ha reportado que tienen actividad de corte en la posición 5,6 (5',6') en uvas (VcCCD4a y VcCCD4b) y en *Bixa orellana* L. (BoLCD) (Lashbrooke et al. 2013, Bouvier et al. 2003b). En azafrán se ha reportado que una CCD4 (ZCD), corta simétricamente a la zeaxantina en la posición 7,8 (7',8') (Bouvier et al. 2003a).

La CCD2 recientemente ha sido identificada y está involucrada en la producción de la crocetina en el azafrán, se encuentra en los plastidios y actúa cortando la zeaxantina en la posición 7,8 (7',8') (Frunciante et al. 2014, Ahrazem et al. 2015).

1.9 Biosíntesis de bixina

Jako y colaboradores (2002) fueron los primeros en plantear hipóticamente la biosíntesis de bixina; proponiendo que debía de existir sólo un número pequeño de genes estructurales involucrados en su biosíntesis, iniciando a partir de la ruta principal de los carotenoides, y que estos genes debían de tener cierta similitud a aquellos que codifican para dioxigenasas, aldehído deshidrogenasas y metil-transferasas, ya que estas enzimas suelen presentarse en rutas biosintéticas similares, como la del ácido abscísico.

Esto fue apoyado por su trabajo experimental, en el que generaron una biblioteca de marcadores de secuencias expresadas (EST's por sus siglas en inglés) construida a partir de arilos de semillas de *Bixa orellana* L. y seleccionando aquellas enzimas involucradas únicamente con el metabolismo de los isoprenoides, por ejemplo, las correspondientes a la ruta DOX/MEP, dentro de las cuales se encontrarían incluidas las implicadas en la biosíntesis de bixina (Jako et al. 2002).

Por otro lado, tomando en cuenta la similitud estructural entre bixina y el pigmento crocetina (del azafrán), Bouvier et al. (2003b) aislaron y expresaron en un organismo heterólogo (*E. coli* recombinante que produce licopeno) tres enzimas requeridas para la síntesis de la bixina: una dioxigenasa (BoLCD), una aldehído deshidrogenasa (BoBADH), y una metiltransferasa (BonBMT), en una serie de reacciones procedentes de forma secuencial, cuyo sustrato inicial fue el licopeno producido por la cepa de *E. coli* (Bouvier et al. 2003b). De esta manera, se propusieron encontrar los genes candidatos que estaban involucrados en la biosíntesis de bixina.

En el grupo de la Dra. Renta Rivera; Rodríguez-Ávila et al. (2011a) se identificó un gen que codifica para una CCD (*BoCCD1*) en *Bixa orellana* L., la cual es diferente en la secuencia del marco de lectura abierto con la BoLCD aislada por Bouvier et al. (2003b). La expresión de esta nueva *BoCCD1* fue documentada en diferentes estados de desarrollo de la planta, diferentes tejidos y durante la formación de las semillas. De manera importante se observó que *BoCCD1*, incrementa su expresión a través de la maduración de la semilla y disminuye la expresión en estadios más maduros. La fuerte señal del gen *BoCCD1* obtenida en las semillas, indica que la localización del mRNA *BoCCD1* concuerda con la producción del total de carotenoides y específicamente apocarotenoides como la bixina (Rodríguez-Ávila et al. 2011a).

Soares et al. (2011) identificó una nueva *BoCCD4* y una *BoOMT* a partir de etiquetas de cDNAs involucradas en la biosíntesis de bixina, los análisis de expresión revelaron que fueron más expresados durante el desarrollo de la semilla, reportando así un papel importante de estas enzimas en la acumulación de apocarotenoides en las semillas de *B. orellana* L.

Rivera-Madrid et al. (2013), intentando entender mejor la regulación de la biosíntesis de carotenoides y bixina, documentaron el efecto de tratar a las plántulas de *Bixa orellana* L. con diferentes concentraciones de norflurazón (NF), un inhibidor de carotenogenesis a través de la inhibición de fitoeno desaturasa (PDS). Los resultados obtenidos demostraron que licopeno no fue detectado en las plantas control, ni en las plantas con tratamientos de norflurazón. Este resultado es conflictivo, ya que se ha establecido y es aceptado que el licopeno es precursor de la bixina (Bouvier et al. 2003b), sin embargo, las plántulas tratadas acumularon bixina aún cuando no se detectó licopeno. Un resultado

similar se ha reportado en *Rosa damascense* L., donde se observó sólo una pequeña cantidad del MHO (6-methy-5-hepten-2-one), compuesto aromático primario de esta planta (Huang et al. 2009). Así, se sugiere que el licopeno no sea el único precursor de la bixina o que el licopeno se esté transformando rápidamente para producir bixina, lo que justificaría la dificultad para detectarlo (Rivera-Madrid et al. 2013).

Recientemente en el laboratorio y en colaboración con el Dr. Luca Comai de la Universidad de California Campus Davis, se obtuvo el transcriptoma de *Bixa orellana* L. a partir de tres tejidos: hoja, semilla inmadura y semilla madura de la accesión Peruana Roja (PR) (Cárdenas-Conejo et al. 2015). Durante el análisis del transcriptoma de achote no se encontraron los genes involucrados en la síntesis de la bixina previamente reportados por Bouvier et al. (2003b). Consecunetemente, Cárdenas-Conejo et al. (2015) proponen nuevos genes involucrados en la biosíntesis de la bixina que incluyen genes *CCD1s* y genes *CCD4s*, los cuales se encontraron sobreexpresados en las semillas inmaduras de *B. orellana* L. (Cárdenas-Conejo et al. 2015).

Dada la importancia de las CCDs en la síntesis de bixina, este trabajo de investigación se enfocó en la caracterización de los genes *CCD1* y *CCD4*, que potencialmente pudieran estar involucrados en la biosíntesis. La primera aproximación para la selección más precisa de las cuatro *BoCCD1s* y cuatro *BoCCD4s*, fue realizar el análisis de la expresión y función de estos genes obtenidos del transcriptoma de *B. orellana* L. y determinar su relación con la acumulación de la bixina durante el desarrollo de la semilla en dos accesiones con características contrastantes, en producción del pigmento. Más adelante, este análisis permitiría profundizar en el entendimiento de los mecanismos por los que este apocarotenoide se sintetiza en esta especie. Así también, más adelante se podrá avanzar en el conocimiento de la ruta de biosíntesis de bixina para eventualmente intentar manipular genéticamente dichas rutas metabólicas ya sea en *B. orellana* L. o en organismos heterólogos.

HIPÓTESIS

La acumulación de la bixina en diferentes accesiones de *Bixa orellana* L. está relacionada con la expresión diferencial de los genes *BoCCD4* y *BoCCD1s*, de ser así, ambas podrían estar involucradas en la biosíntesis de bixina. Alternativamente, se podría considerar que estos genes trabajan de manera coordinada o que sólo uno de ellos está involucrado en la biosíntesis de la bixina.

OBJETIVO GENERAL

Determinar que genes de la familia *CCDs 1* y *4*, están involucrados en la síntesis de bixina mediante la caracterización de su expresión durante el desarrollo de las semillas de dos accesiones de *B. orellana* L. con contenido de bixina contrastantes, así como mediante su expresión heteróloga en una cepa de *E. coli* productora de licopeno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Documentar las etapas de desarrollo de las semillas de dos accesiones de *B. orellana* L.
2. Analizar el contenido de bixina en diferentes etapas de desarrollo de las semillas de dos accesiones de *B. orellana* L.
3. Analizar la expresión génica de *BoCCDs 1* y *4*, durante el desarrollo de las semillas y determinar su relación con la síntesis de bixina en dos accesiones de *B. orellana* L.
4. Analizar las secuencias de los genes seleccionados *BoCCDs 1* y *4*.
5. Analizar la función de las proteínas *BoCCDs 1* y *4* en una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir licopeno.

JUSTIFICACIÓN

Bixa orellana L. es una planta con un potencial uso comercial para la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética, debido a la producción del colorante de color rojizo (bixina) que se obtiene de sus semillas. Sin embargo, el rendimiento de bixina, como de otros carotenos presentes en la semilla, varía considerablemente entre las diferentes accesiones de *B. orellana* L. tal y como sucede con el contenido de carotenoides entre diferentes variedades de las especies productoras de estos compuestos, como en jitomate (licopeno), zanahoria (β caroteno) y cempasúchil (luteína), en donde dichas variaciones se han asociado a la acumulación de transcritos de los genes involucrados en la síntesis de carotenoides.

Adicionalmente, de acuerdo con las investigaciones realizadas en el grupo de la Dra. Rivera, el mecanismo de la biosíntesis de la bixina resulta más complejo de lo demostrado por Bouvier y colaboradores (Bouvier et al. 2003b). Al respecto, basta decir, que la ruta propuesta por Bouvier et al. 2003b, mediante el uso de una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir licopeno, que involucra la actividad secuencial de tres proteínas: una dioxigenasa (BoLCD), un aldehído deshidrogenasa (ADH), y una metiltransferasa (MET) en una serie de reacciones secuenciales a partir de licopeno, no se ha podido reproducir por ningún otro grupo de investigación (Sergeant et al. 2009; Walter and Strack, 2011; Rodríguez-Ávila et al. 2011a). Adicionalmente, los genes de estas enzimas no se encontraron por en el transcriptoma de achiote (Cárdenas-Conejo et al. 2015). De tal manera, a partir del análisis del transcriptoma de *B. orellana* L., se plantea la posibilidad de que sean otros genes tipo CCDs 1 y 4 los que estén involucrados en la síntesis de bixina. Para demostrarlo, resulta necesario realizar un estudio más detallado de la expresión de estos genes en diferentes tejidos de las semillas inmaduras y en diferentes estados de desarrollo, donde se sabe que se presenta la máxima acumulación de bixina en achiote, así como tratar de demostrar la función de estas BoCCDs mediante su expresión en cepas de *E. coli* productoras de licopeno. Este estudio pretende la identificación de genes involucrados en la síntesis de bixina, cuya posterior caracterización funcional permitirá entender mejor los mecanismos de la síntesis de este apocarotenoide en *B. orellana* L.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

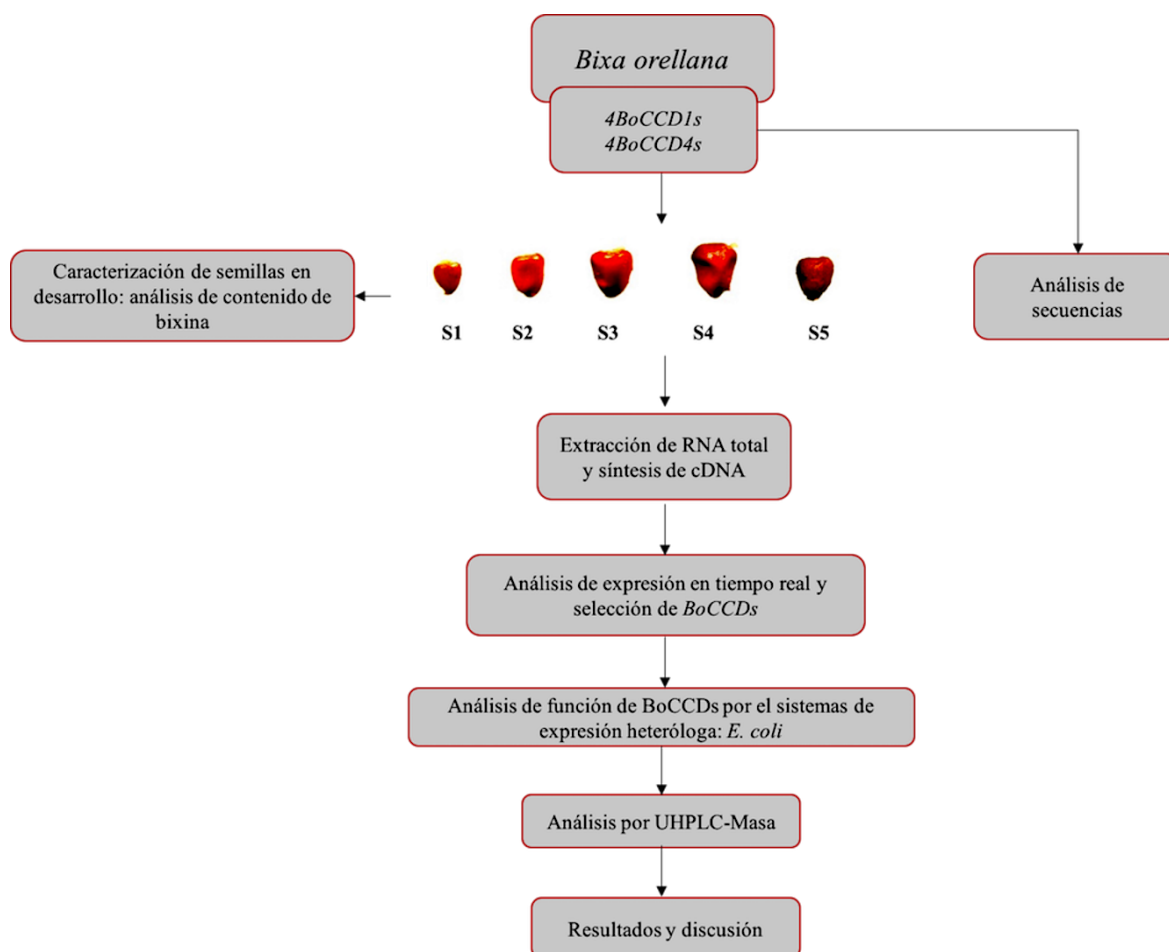


Figura 1.7. Estrategia experimental
Esquema general de la estrategia experimental planteada para cumplir con los objetivos de este trabajo.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

La colecta del material vegetal se realizó en las plantaciones de achiote de la compañía “La Extra”, localizada en el municipio Chicxulub Pueblo, ubicado en la región centro norte del estado de Yucatán, a 20 km de la ciudad de Mérida.

Se seleccionaron dos accesiones de *B. orellana* L.: N4 y P13, las cuales presentan características contrastantes; principalmente se consideró que produjeran diferentes cantidades de bixina, aunque también difieren en el color de la flor, color y dehiscencia del fruto. Apartir de aquí, serán nombradas como “Rosa” y “Blanca”. La accesión “Rosa” (N4) tiene las características siguientes: flores color rosa, frutos inmaduro color rojo y los frutos maduros abiertos, con un contenido de bixina (3.5%). La accesión “Blanca” (P13) tiene flores blancas, frutos inmaduros verdes y frutos maduros cerrados con un menor contenido de bixina (2.19%). Se colectaron semillas inmaduras y maduras de cada planta a analizar. Las muestras tomadas se depositaron en nitrógeno líquido al momento de la colecta y se almacenaron a -80 °C, hasta el momento de su procesamiento.

2.1.1 Caracterización de semillas inmaduras

Para los diferentes estadios de maduración, las semillas inmaduras fueron colectadas a intervalos de siete días después de la antesis, clasificándose como etapa 1: S1 (0 a 7 días), etapa 2: S2 (7 a 14 días), etapa 3: S3 (14 a 21 días), etapa 4: S4 (21 a 28 días) y etapa 5: S5 (28 a 42 días). Además de la etapa de desarrollo, la caracterización de las semillas consistió en el registro de su peso y tamaño.

Para una mayor precisión se registró el peso de cinco semillas de tres lotes para obtener el valor promedio de peso por estado de maduración de cada accesión. De la misma manera, se midió el largo y ancho de cada una de las cinco semillas de cada uno de los tres lotes. Como parte esencial de la caracterización de las semillas, se realizaron cortes histológicos para visualizar las partes de la semilla donde se acumula la bixina.

2.1.2 Cortes histológicos de las semillas y PCR *in situ*

Las semillas de las diferentes etapas de maduración se conservaron en FAA (formaldehído ácido acético alcohol) durante 24 h y posteriormente se sometieron a vacío por periodos de 15 min para promover la penetración del solvente. Al día siguiente, las semillas fueron deshidratadas utilizando diferentes concentraciones de alcohol (10, 30, 50, 70, 85, 95, 100 %) por períodos de 1 h en cada concentración, seguido de mezclas de etanol/histoclear (3:1; 1:1, 1:3 v/v) durante 1 h en cada solución y luego tres cambios con histoclear al 100 %. Posteriormente, las semillas se mantuvieron a lo largo de 3 días en un horno a 60 °C adicionándoles paraplast paulatinamente conforme se fue evaporando el histoclear (cada 4 h). Para los cortes, las semillas fueron embebidas en bloques de parafina que una vez que se solidificaron, se guardaron a 4 °C hasta su uso. Cortes de 10 micras se realizaron en un micrótopo (Microm GmbH, mod. HM340E, Lab Tech), los cuales se observaron en microscopio óptico con objetivos de 10 y 20X para ver la integridad del tejido y se utilizaron para la PCR *in situ* (Javelle et al., 2011).

Para la PCR *in situ* los cortes se lavaron con histo-clear dos veces durante 10 min, después se lavaron en diferentes concentraciones de alcohol (100 %) durante 1 min, y a continuación, sucesivamente por 30 s, continuando en soluciones alcohólicas de 95, 85, 70, 50, 30, y 10 % terminando con un lavado de agua con DEPC.

Estos tejidos, inmediatamente fueron tratados con PBS 1x (tapón fosfato salino) durante 2 min y proteasa (1 mg/ml) durante 20 min a 37 °C. Posteriormente, la proteasa se neutralizó con PBS + glicina (0.2 %) durante 2 min y se lavó con PBS 1x durante 2 min. Finalmente se trataron con DNasa a 37 °C por 30 min (DNasa I Grado Amplificación/Invitrogen, N° de Cat. 18068-015).

Para la reacción de PCR, los tejidos se procesaron de acuerdo con las indicaciones del sistema One step (Invitrogen Cat. No. 12574026), en una reacción de 25 µl con amortiguador 2x y DIG-dUTP (Roche, 11573179910). Inmediatamente, los tejidos se trataron de acuerdo con las indicaciones del sistema DIG Wash and Block Set (Roche, Cat. N° 1158576200), y se observaron en un microscopio equipado con el sistema Axioplan II (Zeiss).

2.2 Contenido de bixina

El contenido de bixina de las semillas se realizó por espectrofotometría, en base al

método reportado por Mckeown y Mark (1962), que está basado en el coeficiente de extinción molar del cloroformo y es específico para medir bixina de semillas basado.

Para ello, las semillas se liofilizaron e inmediatamente se maceraron hasta obtener un polvo fino, 20 mg de cada muestra se diluyó en 5 ml de cloroformo grado HPCL y la mezcla fue filtrada a través de microporos de 0.20 µm (Millex®-FG, Syringe Driven Filter Unit de Millipore Corporation). Posteriormente, se realizó una dilución de 10 µl de muestra en 2 ml de cloroformo grado HPLC para el análisis espectrofotométrico de las absorbancias a 680, 500nm, 480 y 404 nm.

El contenido de bixina se determinó utilizando la fórmula Mckeown y Mark (1962).

$$mg \text{ de pigmento por cada } g \text{ de semilla} \left(\frac{mg}{gDW} \right) = \frac{[(Abs \ 500 + Abs404)(0.256 \times Abs500) \times V \times 100 \times FD]}{282.6 \times 1000 \times W} = Total \text{ de pigmento} \left(\frac{g}{100g} \right)$$

Donde cada absorbancia representa: A500 es la absorción a 500 nm (bixina y sus isómeros). Abs404, es la absorción a 404 nm para norbixina y otros pigmentos amarillos. Por otra parte, V es el volumen final, W es el peso del ejemplar y FD es el factor de dilución (volumen final en la cubeta /volumen de extracto obtenido de las semillas).

2.4 Extracción de RNA Total

El RNA total fue obtenido para la síntesis de cDNA de los diferentes estadios de desarrollo de las semillas.

La extracción de RNA total se realizó empleando el paquete de Invitrogen (Cat. No. 12183-018) “Pure-Link” Micro-to-Midi, Total RNA Purification System (Cat. No. 12183-018), modificado para *B. orellana* L. por Rodríguez Ávila. et al. (2009b).

Las muestras de RNA se almacenaron a -80 °C hasta ser utilizadas para la síntesis de cDNA.

2.4.1 Tratamiento con DNAsas

Con el fin de garantizar que el RNA total estuviera libre de contaminación con DNA genómico, las muestras de RNA total se sometieron a una digestión con la enzima “DNase I Amp Grade” de Invitrogen® (Cat. No. 18068-018), siguiendo las indicaciones del

proveedor. En las muestras tratadas con DNAasa se estimó la concentración de RNA en un NanoDrop Spectrophotometer ND-100 y la integridad del RNA se corroboró por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%. Las muestras se almacenaron a -80 °C separando alícuotas de 10 µl en tubos Eppendorf.

2.4.2 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 100 ng de RNA total empleando la enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Cat. No. 18080-093) siguiendo el protocolo del proveedor y optimizado por Rodríguez-Ávila et al. (2011b). Resumidamente, en un tubo tipo Eppendorf de 0.5 ml libre de nucleasas, se mezcló 1 µl de mezcla de dNTPs (conteniendo dATP, dGTP, dCTP cada a una concentración de 10mM de cada nucleótido), 100 ng de RNA total, hexámeros aleatorios como iniciadores y agua bidestilada estéril libre de nucleasas, en un volumen final de 13 µl. Esta mezcla de reacción se calentó a 65 °C por 5 min. y se incubó en hielo por 1 min, antes de agregar 4µl de amortiguador First-Strand 5X, 1 µl DTT 0.1M, 1µl de inhibidores de RNAsas de Invitrogen (RNase OUT™ Recombinant RNase Inhibitor, Cat. No. 10777-019, 40 U/µl) y 1 µl de transcriptasa reversa (SuperScript™ III RT 200 U/µL) para un volumen total de 20 µl. Posteriormente, la reacción se incubó a temperatura ambiente por 5 min y a 55 °C por 60 min, para finalmente proceder a la inactivación de la enzima calentando la reacción a 70 °C por 15 min. Las reacciones se almacenaron a -20 °C.

2.4.3 Diseño de oligonucleótidos

Para el estudio de expresión de los genes BoCCDs durante el desarrollo de las semillas se diseñaron oligonucleótidos para reacciones de qRT-PCR utilizando el programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), tomando en cuenta que los indicadores sólo amplificaran regiones específicas de cada gen. Las secuencias de los oligonucleótidos seleccionados se muestran en el Cuadro 2.1.

Cuadro 2.1. Oligonucleótidos para el análisis de la expresión de los genes BoCCDs y 18S

Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Tm	pb del producto	No. Acceso GenBank
F-BoCCD1-1	CTGGCACTTAACGAGGGT	62.3	127	KT359018
R-BoCCD1-1	CAACCTTAGGATGAGCAGTG			

F-BoCCD1-2	CTGGCACTTCAAGAGGCA	62.3	127	KT359019
R-BoCCD1-2	CAACCTTAGGATGAGCAGTG			
F-BoCCD1-3	TCCCAACCCAAAGTTTCAC	57.6	198	KT359020
R-BoCCD1-3	TCCTATGCTTACCATGAGTGG			
F-BoCCD1-4	TGCCAATATGGACGAGTCC	57.6	214	KT359021
R-BoCCD1-4	TAGCCATCATCCTCCTCCA			
F-BoCCD4-1	AGCTTCCACCGTCTCTCCA	57.6	200	KT359022
R-BoCCD4-1	AATGATCGCAGCTCCTCTGC			
F-BoCCD4-2	GATTCCCACCTCTCTGGA	57.6	213	KT359023
R-BoCCD4-2	AACATATTGGGCATGCGA			
F-BoCCD4-3	ATGAGGACACCAAGGACG	57.6	213	KT359024
R-BoCCD4-3	CTAGCATCATTTTGGCAACG			
F-BoCCD4-4	TACTGCCAAGATGATCTGG	57.6	153	KT359025
R-BoCCD4-4	GCATTGAGGACATGTAATGG			
F-18S	CGGCTACCACATCCAAGGAA	57.6 - 62.3	200	AF206868
R-18S	GCTGGAATTACCGCGGCT3			

Se muestra la secuencia, la TM de amplificación de los pares de oligonucleótidos, así como el número de acceso de los genes analizados y el tamaño del amplicón esperado. El par de oligonucleótidos 18S se amplifica en ambas temperaturas mostradas (TM).

2.5 Análisis de expresión de los genes *BoCCDs* por RT-PCR en tiempo real

Para la identificación de genes potencialmente involucrados en la biosíntesis de la bixina, se analizó la expresión de los genes *BoCCDs* en diferentes etapas del desarrollo de la semilla, que es el órgano de la planta donde este pigmento es más abundante.

Las reacciones de amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador Step one (Applied Biosystems) utilizando los oligonucleótidos del Cuadro 2.1 y el sistema Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG de Invitrogen (Cat. no. 11733-038) siguiendo las indicaciones del fabricante. Cada una de las muestras se analizó por triplicado utilizando las condiciones indicadas en los Cuadros 2.2 y 2.3. La cuantificación de la expresión de los genes se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et al., 2001) y como gen de expresión constitutiva al gen ribosomal 18S, considerando el estadio S1 como referencia. Todos los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías, seguido de

una comparación múltiple (T-test) ($P = 0.05$) y un análisis multifactorial para correlacionar el nivel de expresión con la acumulación de bixina, seguido de la prueba de correlación de la Pearson. El índice de correlación varía en el rango de $(-1,1)$, donde los valores más cercanos a 1 indican una mayor correlación (Little et al. 1976).

Cuadro 2.2. Mezcla de reacción para RT-PCR en tiempo real

Componentes	Volumen (1x)
PCR MIX (Sybr Green UDG)	5 μ l
Oligonucleótidos FW	0.5 μ l
Oligonucleótidos RW	0.5 μ l
cDNA	1 μ l (100 ng)
H ₂ O	2.8 μ l
Rox reference Dye	0.2 μ l
Total	10 μ l

Cuadro 2.3. Program de amplificación para RT-PCR en tiempo real

Ciclo 1	1X	Temperatura	Tiempo (min)
	Paso 1	50 °C	02:00
	Paso 2	95 °C	01:00
Ciclo 2	40X		
	Paso 1	95 °C	00:30
	Paso 2	Tm BoCCDs	00:30

	Paso 3	72 °C	00:30
Recopilación y análisis de datos en tiempo real			
Ciclo 3	1X		
	Paso 1	72 °C	00:30
Ciclo 4	1X		
	Paso 1	20 °C	Hold

2.6 Análisis de secuencias de los genes BoCCDs

En colaboración con el Dr. Luca Comai (Departamento de Biología de Plantas, del Centro genómico de la universidad de California, Campus Davis USA), se llevó a cabo la secuenciación del transcriptoma de *Bixa orellana* L. de tejido foliar, semilla madura y semilla inmadura, utilizando la plataforma de Illumina®. La longitud de las secuencias de los *contigs* producidos por la secuenciación varió de 399 pb hasta 4549 pb, con un tamaño promedio de *contigs* ensamblados de 1924 pb, los cuales fueron analizados y ensamblados para la obtención de los ORFs (Marcos de lectura abierto) de las BoCCDs (Cárdenas-Conejo et al. 2015).

Con las secuencias del transcriptoma se obtuvieron las secuencias de las BoCCDs y se realizaron alineamientos utilizando la herramienta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST): BLASTx y BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para compararlas con proteínas homólogas de otras plantas tomadas de la base de datos del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Un árbol filogenético fue construido utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de sustitución de Jones-Taylor-Thorton (JTT) (Jones et al. 1992) y una distribución gamma con (G + I). En ambos casos, el análisis y el modelo de sustitución fue predicho por el modelo de sustitución de mejor ajuste de función (ML) incluido en MEGA6 (Tamura et al. 2013). El análisis filogenético fue construido con un Bootstrap de 1000 réplicas. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos fue realizado mediante el

algoritmo de Clustal W en Mega6 (<http://en.bio-soft.net/tree/MEGA.html>). El árbol filogenético fue enraizado utilizando una apocorotenoide dioxigenasa (ACO) de *Synechocytis* sp.

La predicción de la localización subcelular fue realizada con el servidor de iPSORT Prediction (<http://ipsort.hgc.jp/predict.cgi>), (Bannai et al. 2002), para así determinar y corroborar la localización subcelular *in silico* de las BoCCDs obtenidas del transcriptoma de achiote realizado por Cárdenas-Conejo et al. (2015).

Adicionalmente, las enzimas seleccionadas de acuerdo al RT-PCR en tiempo real fueron analizadas en un BLAST contra PDB (Protein Data Bank/ http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=file_formats/pdb/index.html), para determinar el mejor template para el modelaje por homología. La cristalografía de la estructura de la proteína de VP14 de *Zea mays* L. (PDB: 3NPE) (Messing et al. 2010) fue seleccionada como template. Los modelos por homología fueron generados utilizando el servidor SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) (Biasini et al. 2014), el análisis estructural fue realizado por medio de Coot (<https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/personal/pemsley/coot/>), (Emsley et al. 2010). Las representación gráfica fue generada utilizando CCP4mg versión 2.10.6 (<http://www.ccp4.ac.uk/MG/download/>) (McNicholas et al. 2011).

2.7 Análisis de la función de los genes BoCCDs en *E. coli*

Para determinar la función de los genes *BoCCD1-1*, *BoCCD4-1* y *BoCCD4-3* se expresaron en *E. coli*. Para, los productos de PCR de cada uno se insertaron en vectores del sistema GATEWAY Cloning Technology, que consiste en dos vectores: el primero es un vector intermedio para realizar la clonación del gen de interés, conocido como vector de entrada (pCRTM8/GW/TOPO), de donde se movilizan por recombinación al vector de expresión (pDESTTM17) en *E. coli* (BL21).

2.7.1 Selección de genes BoCCDs candidatos para el análisis de la función en *E. coli*

Con base a los resultados de la expresión génica, se seleccionaron los genes *BoCCD1-1*, *BoCCD4-1* y *BoCCD4-3* para realizar su análisis funcional en *E. coli*. Para esto, dichos genes se expresaron en la cepa BL21 de *E. coli* que contienen el plásmido pACCRT-EIB que lleva los genes (*crtE*, *crtI* y *crtB*) para la producción de licopeno (Misawa et al. 1990,

Misawa et al. 1995); Figura 2.1. Esta técnica, conocida como complementación de color en bacterias, se basa en que si el licopeno que produce la cepa pACCRT-EIB de *E. coli* es usado como sustrato por la BoCCD recombinante introducida en el plásmido de expresión, se observará un cambio de color con respecto al control (cepa pACCRT-EIB transformada con el plásmido pDESTTM17 sin inserto), que indica así que la BoCCD está utilizando al licopeno como sustrato para generar nuevos compuestos (Misawa et al. 1995, Simkin et al. 2004a).

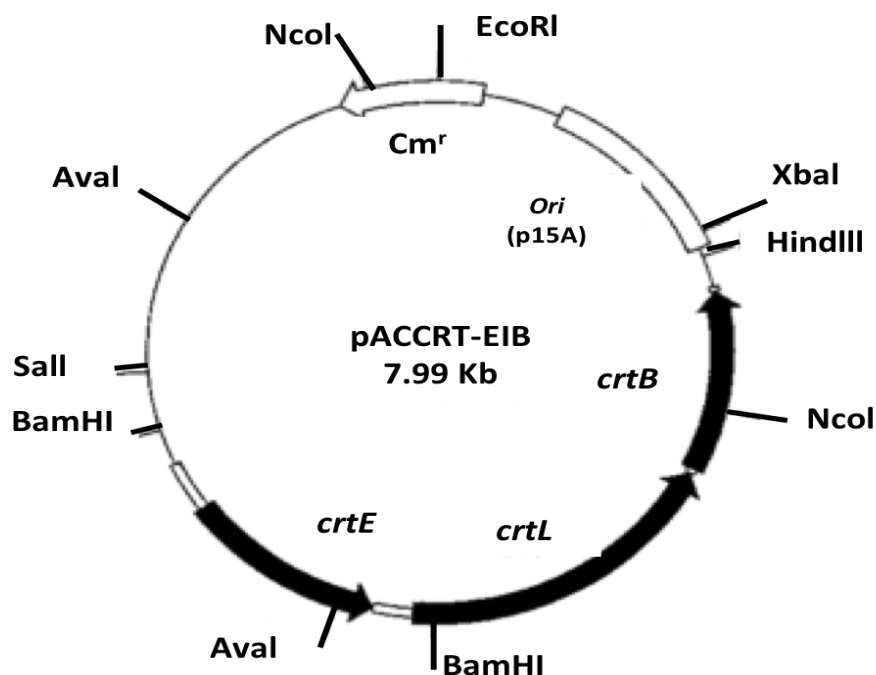


Figura 2.1 Plásmido pACCRT-EIB. (Tomada de Misawa et al. 1995).

El origen de replicación (p15A) de este vector es compatible con la mayoría de los vectores como pBluescript II y series pUC. Gen de resistencia a cloranfenicol (Cm^r).

2.7.2 Diseño de oligonucleótidos para amplificar los marcos de lectura abiertos

La amplificación de los ORFs de los genes *BoCCD1-1*, *BoCCD4-1* y *BoCCD4-3*, se basó en el diseño de oligonucleótidos (Cuadro 2.4) sobre las regiones conservadas entre proteínas homólogas depositadas en el GenBank, identificadas a partir de las secuencias

del transcriptoma de *B. orellana* L. (Cárdenas-Conejo et al. 2015).

Cuadro 2.4. Diseño de oligonucleótidos para amplificación de ORF de BoCCDs

Nombre	Tamaño del ORF (pb)	No de Acceso GenBank	Secuencia de oligonucleótidos 5'-3'		TM (°C)
BoCCD1-1	1656	KT359018	F	TTACTCGAGATGGCTCAGGAGGCGGAGAAGC	61
			R	ATACTCGAGGTCTTGCCCTCAAGATCTCTCCATGTG	
BoCCD4-1	1846	KT359022	F	CATcatatgTTCTTCCTTCGCATGATG	53
			R	AAAggatccGTGACTAACATAGGAAATCTCC	
BoCCD4-3	1785	KT359024	F	CATcatatgTCCTCACAGAAGATGTACTG	58
			R	AAAggatccTAGTCAAGGAGTATGCACACGA	

2.8 Amplificación de ORF y Clonación de los genes *BoCCDs* en pCR™8/GW/TOPO

La amplificación de los ORFs se realizó utilizando los oligonucleótidos mostrados en el Cuadro 2.4 mediante PCR punto final utilizando el sistema Phusion Hot Start II High - Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific Cat. F549L) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 1%, y purificados mediante el paquete: QIAquick Gel Extraction de QIAGEN (50) (Cat. No. 28704).

2.8.1 Ligación de ORF de los genes *BoCCDs* en el vector pCR™8/GW/TOPO

Para clonar los ORFs en el vector pCR™8/GW/TOPO (Figura 2.2), se utilizaron productos purificados del gel para realizar la reacción de ligación para la que se utilizaron 0.5-4 µl de la banda purificada, 1 µl de solución salina, 1 µl del vector pCR™8/GW/TOPO (Invitrogen Cat. no. K2500-20) y 1 µl de agua, para un volumen total de 6 µl. Esta reacción se mantuvo 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se utilizó para realizar una transformación por choque térmico.

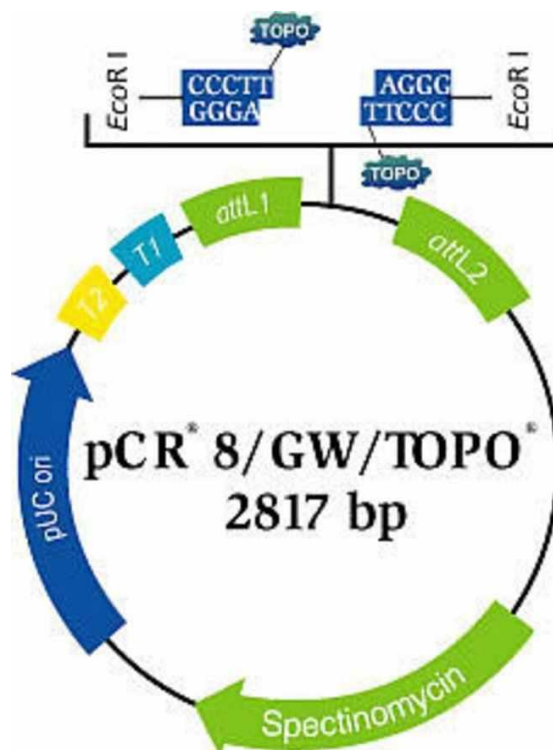


Figura 2.2 Vector de clonación pCR8/GW/TOPO

El origen de replicación es pUC ori. Se muestran los sitios de recombinación attL1 y attL2 requeridos para la transferencia del gen clonado que bordean a los sitios de digestión de la enzima de restricción *EcoRI* que liberara el producto de PCR clonado en el vector. Es resistente a espectinomicina.

2.8.1.1 Transformación por choque térmico

La introducción de los plásmidos recombinante que contienen los genes BoCCDs a *E. coli* se realizó mediante transformación por choque térmico de células competentes One Shot® Competent *E. coli* (Thermo Fisher Cat. C404010) de la siguiente forma: Se tomaron los 2 µl de la reacción de ligación, se adicionaron a 50 µl de células competentes que se incubaron en hielo por 30 min, seguida de un choque térmico de 30 s a 42 °C y una incubación de 2 min en hielo. Posteriormente se agregaron 250 µl de medio SOC (Thermo Fisher Cat. C404010) y se incubaron por 1 h a 37 °C en agitación continua. Finalmente, diferentes volúmenes (20, 50 y 100 µl) de estas bacterias se dispersaron en en placas de medio LB agar selectivo (espectinomicina 100 µg/ml) que se incubaron las cajas a 37 °C durante toda la noche.

2.8.1.2 Verificación de colonias recombinantes

Para la verificación se hicieron inóculos de 10 colonias medio líquido LB suplementado con espectinomicina (100 µg/ml), de donde después de al menos 8 h de crecimiento, se realizaron extracciones de DNA plasmídico (miniprep). Sobre estas muestras de DNA se realizó una digestión con la enzima EcoR1 para excindir el fragmento clonado. La extracción de DNA plasmídico se realizó con el sistema comercial QIAprep® Spin Miniprep Kit de QIAGEN (250) (Cat. No. 27106) y la digestión se hizo de acuerdo al protocolo Assembly of Restriction Enzyme digestions de Promega (Cat. No. R6011). Los productos de la digestión se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 1 % para determinar el tamaño del inserto clonado.

2.9 Subclonación de los genes *BoCCDs* en el vector de expresión pDEST™17Gateway®

Los plásmidos pCR™8/GW/TOPO recombinantes verificados por digestión para contener los ORF de los genes *BoCCDs* se utilizaron para movilizar los ORF al vector de expresión Gateway® pDEST™17 (Figura 2.3), mediante la reacción de recombinación LR de Invitrogen (Cat. No. 11801-016). Dichas reacciones de recombinación fueron utilizadas para realizar la transformación por choque térmico de células competentes DH5α de la manera descrita previamente. En este caso, como marcador de selección se utilizó ampicilina (100 µg/ml). Nuevamente, la comprobación de colonias recombinantes se realizó mediante la digestión con la enzima EcoRI de la manera ya descrita.

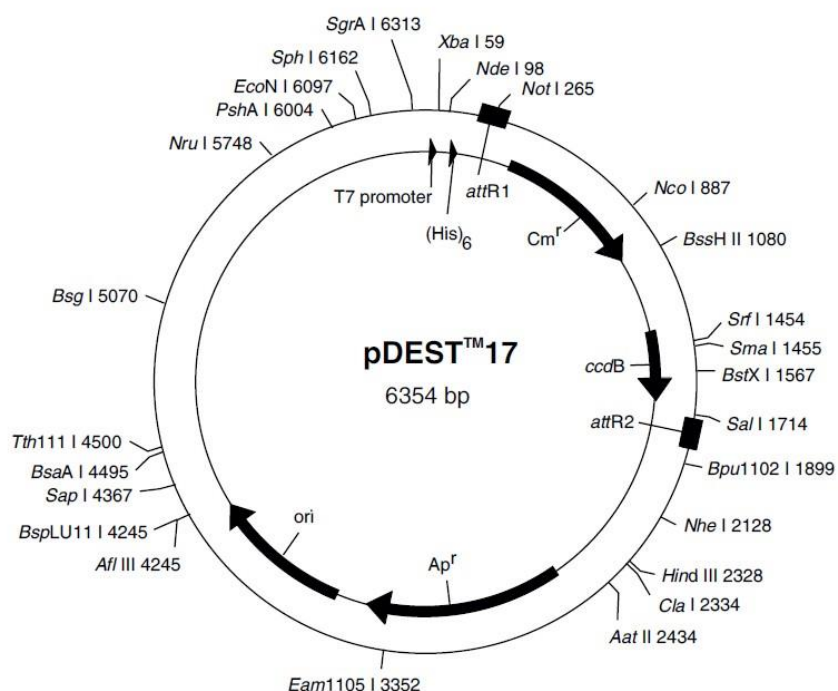


Fig. 2.3 Vector de expresión pDEST17™

El vector contiene el promotor T7 para expresión en bacterias. Los sitios de recombinación attR1 y attR2 para la clonación del gen de interés, bordean el gen de resistencia a cloranfenicol (Cm^r) que es sustituido por el ADN introducido causando la pérdida de esta resistencia. Ap^r es el gen de resistencia a ampicilina que se utiliza como marcador de selección.

3 Movilización de plásmidos recombinantes a la cepa *E. coli* BL21 productora de licopeno

Los plásmidos control (pDEST17 sin inserto) y recombinantes de interés (pDEST17BoCCD1-1, pDEST17BoCCD4-3), fueron introducidos en células competentes BL21-AI™ One Shot® *E. coli* de Thermo Fisher (Cat. C6020-03), previamente fueron transformadas con el plásmido modificado para producir licopeno (pACCRT-EIB) que les permite producir licopeno manifestando un color rojo. Las colonias de bacterias portadoras de ambos plásmidos fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en placas de medio LB adicionadas con cloranfenicol (50 µg/ml) y ampicilina (100 µg/ml), que representan las resistencias confereidas por cada uno de los plásmidos.

3.1 Análisis de los productos generados por las BoCCDs en *E. coli*.

Los productos generados en *E. coli* por la actividad de las BoCCDs se aislaron de la siguiente manera: Una colonia transformante se inoculó en 5 ml de medio de cultivo LB adicionado con cloranfenicol (50 µg/ml) y ampicilina (100 µg/ml) y se dejó crecer toda la noche a 37 °C en agitación continua.

Dicho pre-inóculo se transfirió a 100 ml de medio de cultivo LB selectivo y se dejó crecer toda la noche a 24 °C en agitación continua. La expresión de los genes fue inducida con arabinosa al 0.2 % (W/V) de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Cat. No. 11801-016, Invitrogen).

El cultivo se centrifugó a 9000 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 5 mL de cloroformo/metanol (2:1), este procedimiento se repitió hasta la obtención de una pastilla de células blancas que se resuspendió perfectamente con ayuda de un vortex. Esta suspensión celular se evaporó con nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C para su análisis posterior por cromatografía líquida de ultra alta presión-acoplado a un ionizador por electrospray (ESI) y a un cuadrupolo con tiempo de vuelo (QTOF) y a espectrómetro de masas en tándem (MS/MS) por sus siglas en inglés UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS por acrónimo del inglés: ultrahigh pressure liquid chromatography accurate mass quadrupole time-of-flight mass spectrometry with electrospray ionization).

3.2 Análisis de absorbancia y fluorescencia

Los espectros de absorbancia y fluorescencia de los productos aislados se obtuvieron utilizando el sistema de detección multi-modo del equipo BioTek Cytation™ 3. Se registraron las absorbancias de 230 a 800 nm con intervalos de 10 nm con una lectura de 100 ms. Por su parte, la fluorescencia se midió a 420, 460 y 490 nm.

3.3 Análisis por UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS

El perfil de los extractos de las cepas testigo pACCRT-EIB, pDEST17BoCCD4-3 y pDEST17BoCCD1-1 fueron analizados con el equipo Waters XEVO-G2XSQTOF, se realizaron dos tipos de inyección a) inyección con un flujo de 5 µl/min, con un rango de detección de masa de 100-1000 m/z y la lectura fue en un promedio de 1 min de lecturas,

ESI + Source: voltaje sobre el capilar: 32 kV, cono de muestreo 40 volts y flujo de iones a 80 Volts y flujos de N₂ gas: cono gas 50 L/h, desolvatación del gas 500. b) por UHPLC, utilizando una columna ACQUITY UPLC_r BEH C18 1.7 μ m, temperatura de columna 25 °C, a un flujo de 0.4 μ l /min, con una fase móvil que consistió en: A) ACN:Isprop:Metanol (75:10:15) (Acetonitrilo: isopropanol:metanol) con 1% AF (ácido fórmico), solvente B) ACN con 1% AF, a una relación inicial de 25-75 %, con un gradiente después de 3 min de 85% B a 90% B por 5 min, para regresar en 20 min a 75 % de B, la velocidad de flujo de la rampa fue 0.45 min. El volumen de inyección fue de 2 μ l (Arathi et al. 2015). El rango del espectro de masa fue adquirido en un rango de 100 a 1000 m/z, los parámetros de masas fueron los siguientes: ESI source in positive mode; voltaje sobre el capilar: 32 kV, cono de muestreo 40 volts y flujo de iones a 80 Volts y flujos de N₂ gas: cono gas 50 L/h, desolvatación gas 500. MS/MS: voltaje del cono 35V, energía de colisión 25V (Arathi et al. 2015).

3.4 Análisis por FTIR

La identificación de los grupos funcionales de los productos generados por las proteínas recombinantes pDEST17BoCCD1-1 y pDEST17BoCCD4-3 fue utilizando en el espectrofotómetro Cary 630 FTIR (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) en un rango de espectro de 4000 a 500 cm⁻¹.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3 Caracterización de las etapas de desarrollo de semillas y contenido de bixina

3.1 Material vegetal

Estudios previos en la caracterización de accesiones de *B. orellana* L. mostraron una amplia variación en la acumulación de pigmentos, así como en la expresión de varios genes de la ruta de carotenoides, tanto a nivel de los diferentes órganos de la planta como en las distintas variantes (Rivera-Madrid et al. 2006; Valdez-Ojeda et al. 2008; Rodríguez-Ávila et al. 2011b). Las características diferentes en las accesiones de *B. orellana* L. pueden entorpecer la confiable interpretación de los mecanismos genéticos implicados en la acumulación de apocarotenoides en esta especie. Por lo tanto, se consideró importante realizar un análisis detallado durante el desarrollo de la semilla para entender mejor el patrón de la expresión génica en este órgano que es el principal acumulador de bixina. De esta manera, se pretendió documentar y entender las diferencias al respecto entre dos accesiones con características contranstantes principalmente en producción de bixina.

En la Figura 3.1, se pueden observar las características morfológicas y órganos de las accesiones utilizadas en este trabajo: hoja, botones florales, flores, semillas inmaduras y maduras, frutos inmaduros y maduros.

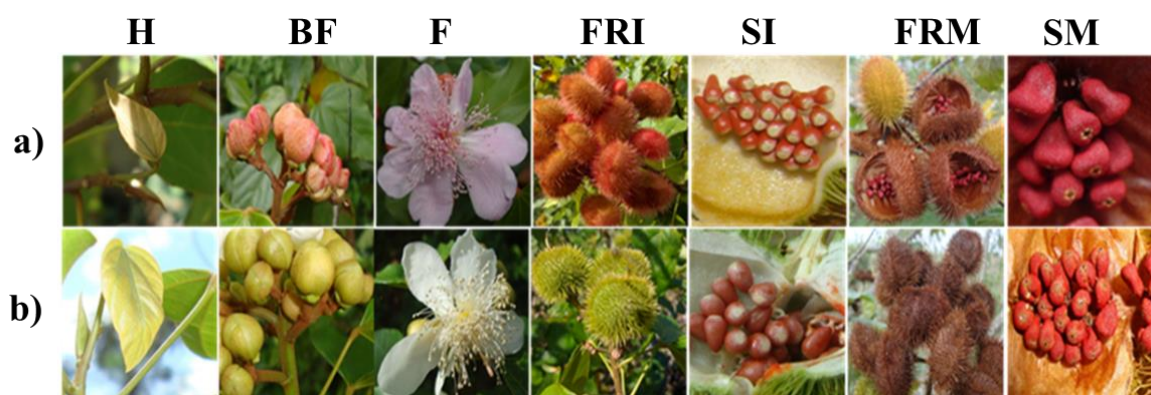


Figura 3.1. Características morfológicas de dos accesiones de *Bixa orellana* L.

a) Accesoión "Rosa", b) Accesoión "Blanca". H: hoja, BF: botón floral, F: Flor, FRI: fruto

inmaduro, SI: semilla inmadura, FRM: fruto maduro, SM: semilla madura.

3.1.1 Etapas de las semillas en desarrollo



Figura 3.2. Frutos y Semillas en etapas de desarrollo.

- a) Accesión "Rosa", b) Accesión "Blanca". c) Etapas de desarrollo de las semillas (S)
Días de colecta S1: (0 a 7), S2: (7 a 14), S3: (14 a 21), S4: (21 a 28), S5: (28 a 42) después de la antesis.

Durante el análisis y caracterización de las semillas, se observaron las principales diferencias entre las accesiones, como son el color del botón floral, la flor y el fruto, así como la forma del fruto y la dehiscencia de la accesión blanca (fruto abierto) y la indehiscencia de la accesión rosa (fruto cerrado). En este análisis se documentó que existen variaciones en el tamaño y número de las semillas independientemente de la etapa de desarrollo o madurez del fruto (Tabla 1).

Por otro lado, se observó que las semillas al madurar (S5) disminuyen en tamaño con respecto a los estadíos anteriores (S3 y S4) (Figura 3.2 C). De tal manera, la caracterización de las semillas fue de utilidad para homogenizar los estadios de desarrollo

de la semilla para su análisis.

3.1.2 Cortes histológicos de las semillas

En los cortes histológicos se pudo observar a la bixina formando cúmulos circulares en la parte periférica de la semilla que se incrementan su tamaño a medida que avanza el desarrollo de la semilla (Figura 3.3 d, e, f). Es interesante señalar que este pigmento se almacena en células especializadas en almacenamiento de bixina, nombradas como BSC (por su acrónimo en inglés; Louro y Santiago, 2015), que se localizan alrededor del arilo de la semilla y que van incrementando su tamaño a lo largo del desarrollo de las semillas. De la misma manera, es interesante observar que la bixina no sólo se limita al arilo de la semilla, sino que también se observa en el embrión y en el tegumento (Figura 3.3 c). como fue previamente reportado en un análisis por RT-PCR *in situ* en las semillas y en otros órganos de la planta. (Rodríguez Ávila et al. 2011a). En el análisis aquí presentado, se observó que la bixina se acumula más en el estadio S4 en el que al parecer el contenido de bixian también incrementa (Figura 3.3 f).

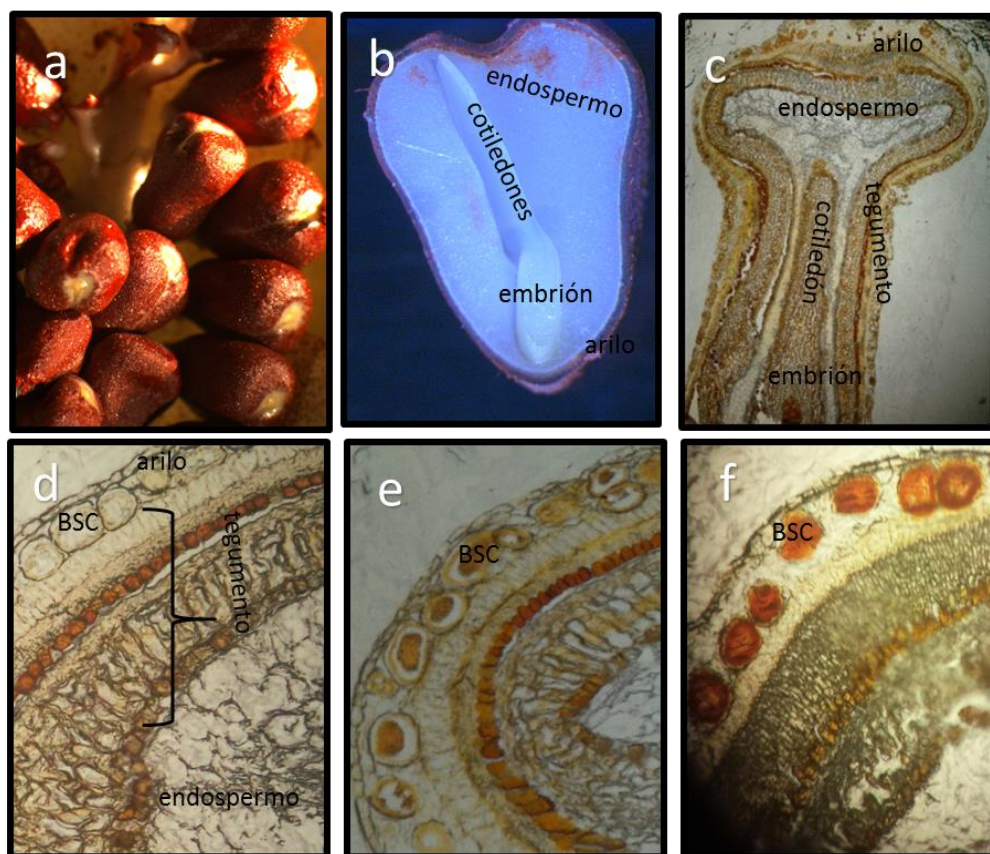


Figura 3.3. Cortes histológicos de semillas inmduras de achiote.

- a) Semilla inmadura, b) corte transversal, c) corte longitudinal, d) semilla inmadura en estado de desarrollo S2, e) semilla inmadura en estado de desarrollo S3, f) semilla inmadura en estado de desarrollo S4. BSC: células de almacenamiento de bixina.

3.1.3 Cuantificación de bixina durante el desarrollo de las semillas

El análisis de acumulación de pigmento por espectrofotometría reveló que la bixina es detectada en todas las etapas de desarrollo de las semillas, teniendo como punto máximo de acumulación de bixina la etapa S4 para ambas accesiones. En dicha etapa la accesión Rosa acumula un 3.15 %, mientras la accesión Blanca acumula 2.19 %. De manera interesante, en la etapa S5 el contenido de la bixina disminuye un 45 % en la accesión Rosa y un 76 % en la accesión Blanca (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Caracterización de semillas inmaduras

Accesion	Semillas en desarrollo	D. D. A	Largo (mm) (SD)	Ancho (mm) (SD)	Peso(g) (SD)	% Bixin (SD)
Rosa	S1	0 - 7	2 (0)	1.6 (0.41)	0.0074(0.0003)	1.916(0.20)
	S2	7 - 14	2.9 (0.22)	1.5(0.35)	0.0086(0.0002)	2.057(0.06)
	S3	14 - 21	3.7(0.44)	2.2(0.27)	0.0113(0.0002)	2.716(0.12)
	S4	21 - 28	4.1 (0.22)	2.3(0.44)	0.0261(0.0005)	3.158(0.03)
	S5	28 - 42	4.5 (0.21)	4(0.40)	0.032(0.0017)	1.731(0.17)
Blanca	S1	0 - 7	1.8 (0.27)	1(0)	0.0069(0.001)	1.473(0.03)
	S2	7 -14	3 (0)	1(0)	0.0076(0.0006)	1.973(0.13)
	S3	14 - 21	3.9 (0.22)	2(0)	0.012(0.0009)	2.070(0.13)
	S4	21 -28	6 (0)	3.5(0.3)	0.0231(0.0009)	2.191(0.13)
	S5	28 - 42	4.8 (0.2)	3.4(0.32)	0.026(0.0017)	0.525(0.05)

D.D.A: Días des pues de la antesis, (SD) desviación estándar.

De manera interesante, este análisis demostró que sí existe diferencias en la acumulación de la bixina entre las accesiones analizadas. Siendo la accesión Rosa la que mayor acumulación de bixina presenta. De la misma manera, es interesante observar que el porcentaje de bixina disminuye drásticamente en el estadio S5 que corresponde a su máxima etapa de desarrollo, que es donde se pensaba que existía la máxima acumulación de bixina, ya que es cuando comercialmente el pigmento es extraído para su comercialización.

Este resultado concuerda con lo reportado por Rodríguez-Ávila et al. (2011 a, b) y con lo reportado por Louro y Santiago (2015), ya que la acumulación de bixina incrementa durante el desarrollo de la semilla y se va almacenando en las BSCs.

3.2 Extracción de RNA total

Para realizar un análisis de la expresión de genes potencialmente involucrados en la síntesis de bixina, se realizó la extracción de RNA total de los diferentes estadios en desarrollo de las semillas, mismo que se utilizó para la síntesis de cDNA.

Para cada estadio de desarrollo se obtuvo RNA total de buena calidad, aunque en diferentes concentraciones; como se puede observar en la Figura 3.4, donde se muestra un gel de agarosa en el que las muestras de RNA toals se resolvieron por una electroforesis.

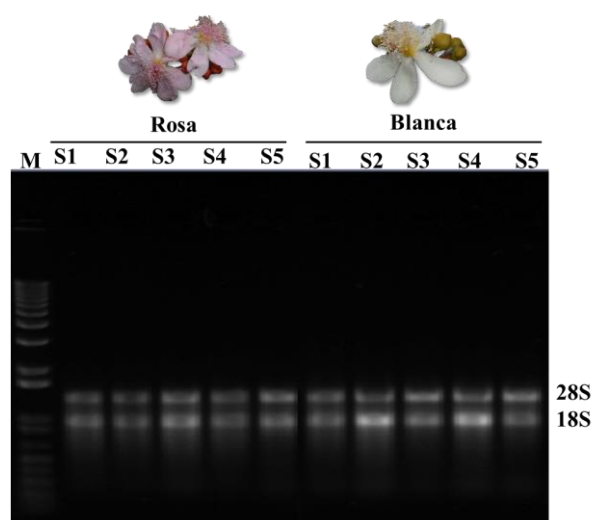


Figura 3.4 RNA total de semillas en diferentes etapas de desarrollo de *Bixa orellana* L.

Electroforesis en gel de agarosa a una concentración al 1.2%. 1kb: marcador molecular (M). Muestras de RNA obtenidas de Semillas de 7(S1), 14(S2), 21(S3), 28(S4) y 42(S5) días después de la anthesis de cada una de las accesiones indicadas.

La concentración de RNA total en cada muestra se estimó en un NanoDrop Spectrophotometer ND-100, después de haber sido tratadas con DNAasa I. La integridad del RNA se estimó por una relación arriba de 1.8 de la absorbancia (Abs) a longitudes de onda a 260 y 280 nanómetros (nm) (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Concentraciones del RNA total y relación Abs 260/280

Semilla en desarrollo	Concentración ng/ μ L	Abs 260/280
ROSA		
S1	113	2.12
S2	89.3	2.14
S3	128.7	2.15
S4	80.8	2.13
S5	117.4	2.17
BLANCA		
S1	78	2.13
S2	156.6	2.14
S3	49.5	2.1
S4	89.3	2.15
S5	50.1	2.13

3.2.1 Síntesis de cDNA

En la Figura 3.5 se puede observar que a partir de todas las muestras de RNA total se logró la síntesis de cDNA que posteriormente se utilizó para amplificaciones por RT-PCR en tiempo real.

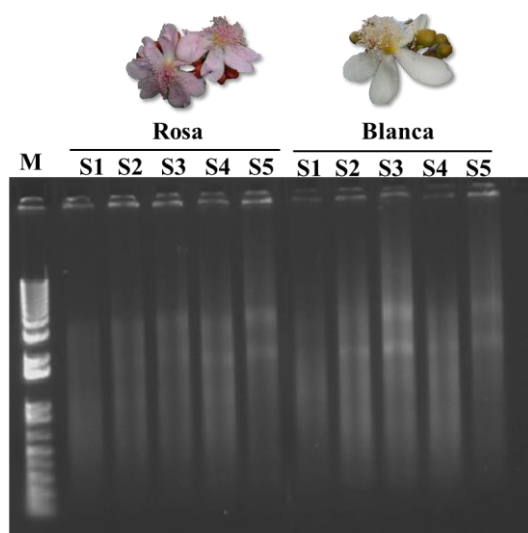


Figura 3.5. cDNA obtenido de semillas en diferentes etapas de desarrollo de *Bixa orellana* L. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. M: marcador molecular (1KB). cDNA de las semillas en los estadios en desarrollo, S1, S2, S3, S4 y S5, indicadas para cada accesión.

3.3 Cuantificación de la expresión de genes *BoCCDs* por RT-PCR

Mientras el perfil de la acumulación de la bixina incrementa de manera similar en ambas accesiones durante el desarrollo de la semilla, el análisis de la expresión de genes *BoCCDs* mostró un perfil de expresión diferencial durante el desarrollo de las semillas entre las accesiones.

3.3.1 Análisis de expresión de los genes *BoCCD4*

En ambas accesiones, los genes *BoCCD4-1* y *BoCCD4-3* mostraron un perfil de expresión similar a la acumulación de la bixina, es decir: muestran su máximo nivel de expresión en el estadio S4, mismo que drásticamente decrece en el estadio S5 (Figura 3.6. E, G). Este resultado sugiere que los genes *BoCCD4-1* y *BoCCD4-3* podrían estar involucrados en la biosíntesis de la bixina, de manera que la relación entre la expresión de genes y la acumulación de bixina se analizó utilizando el método de coeficiente correlación de Pearson. Este análisis mostró que en la accesión Rosa los genes *BoCCD4-3* y *BoCCD4-1* tienen una correlación positiva con la acumulación de la bixina. De 0.72 y 0.8 respectivamente (Cuadro 3.3). Por su parte, en la accesión Blanca *BoCCD4-3* mostró un bajo coeficiente de correlación (0.37), mientras que *BoCCD4-1* sí mostró una alta correlación (0.9) (Cuadro 3.3).

Con respecto a los genes *BoCCD4-2* y *BoCCD4-4*, los perfiles de expresión no mostraron un patrón consistente con la acumulación de la bixina. Sin embargo, el gen *BoCCD4-2* mostró un máximo de expresión en el estadio S2, con un bajo coeficiente de correlación con la acumulación de la bixina en la accesión Blanca (0.44). En la accesión Rosa *BoCCD4-2* mostró su mayor nivel de expresión en la etapa S4, con un coeficiente de correlación de 0.6. Por su parte, el gen *BoCCD4-4* mostró una correlación de 0.7 en la accesión Blanca en el estadio de desarrollo S4, mientras que en la accesión Rosa en el estadio de desarrollo S3 mostró una correlación menor (0.4), (Figura 3.6. F, H y Cuadro 3.3).

Estos resultados son interesantes, ya que en el análisis del transcriptoma se estableció que los genes *BoCCDs* son más expresados en la etapa inmadura (aproximadamente en el estadio S3), en comparación con el estadio maduro (S5), postulando como candidatos para estar involucrados en la biosíntesis de la bixina a los genes *BoCCD1-3*, *BoCCD1-4*, *BoCCD4-1*, *BoCCD4-2* y *BoCCD4-3* (Cárdenas-Conejo et al. 2015). De tal manera, conjugando los resultados de ambos estudios es válido proponer a los genes *BoCCD4-3* y *BoCCD4-1* como candidatos para participar en la biosíntesis de bixina.

3.3.2 Análisis de expresión del gen *BoCCD1*

El nivel de expresión del gen *BoCCD1-1* en la accesión Blanca incrementa durante el desarrollo de las semillas y drásticamente decrece en la etapa S5. (Figura 3.6 A). Este perfil de expresión tuvo una correlación positiva (0.8) con respecto a la acumulación de la bixina, sin embargo, en la accesión Rosa la expresión de este gen tuvo una muy baja correlación (-0.05) con la acumulación de pigmento (Cuadro 3.3).

Los niveles de expresión de los genes *BoCCD1-2*, *BoCCD1-3* y *BoCCD1-4* en la accesión Blanca, mostraron una baja correlación (0.4) con respecto a la acumulación de la bixina. (Cuadro 3.3). De manera interesante, en la accesión Rosa los genes *BoCCD1-2* y *BoCCD1-3* incrementaron su expresión en la etapa S3, siendo 10 veces mayor que la expresión del gen *BoCCD1-1*, sin embargo, ambos genes tuvieron una correlación baja con respecto a la acumulación de la bixina, de 0.6 y 0.4 respectivamente, (Figura 3.6 B, C y Cuadro 3.3).

Con base a este resultado, el gen *BoCCD1-1* también se consideró como potencialmente

implicado en la síntesis de la bixina. Al respecto, Rodríguez-Ávila et al. (2011a) reportaron que posiblemente la *BoCCD1* estuviera involucrada en la biosíntesis de la bixina, ya que durante el análisis de su expresión en seis estadios de desarrollo de la semilla, se observó que la expresión del gen *BoCCD1* incrementa hasta antes del estadio maduro, lo cual concuerda con los resultados de expresión y con la acumulación de bixina.

En general, la máxima acumulación de los genes *BoCCDs* se presenta en los estadios de desarrollo S3 y S4, mientras que en el estadio S5, su nivel de expresión decrece drásticamente (Cuadro 3.1).

3.3.3 Análisis de expresión de los genes β y ε -ciclasas

Considerando el importante papel de las β y ε -ciclasas en la transformación del licopeno para producir α - y β -carotenoides, como punto importante en la regulación de la conversión de carotenoides y apocarotenoides como la bixina, se analizó la expresión de los genes *Bo β* - y *Bo ε* -ciclasas para explorar su posible participación en la síntesis de la bixina.

El nivel de expresión de los genes β y ε -ciclasas en la accesión Rosa decrece a medida que avanza el desarrollo de la semilla, lo cual coincide con la mayor acumulación de la bixina en esta accesión. El estadio S3 mostró la mayor expresión de *Bo β -ciclase* con una correlación de 0.6 con relación a la acumulación de la bixina, para el caso de *Bo ε -ciclase*, la mayor expresión fue en el estadio S4, con un coeficiente de correlación de 0.4 con respecto a la acumulación de la bixina (Figura 3.6 I, J y Cuadro 3.3).

Por otra parte, en la accesión Blanca pasa lo opuesto, el nivel de expresión de β y ε -ciclasas es mayor con respecto a la accesión Rosa. Además, el nivel de expresión de *Bo β -ciclase* es máximo en el estadio S1 con un coeficiente de correlación de 0.5 con respecto a la acumulación de la bixina, mientras que para el gen *Bo ε -ciclase* el nivel de expresión es máximo en el estadio S2, con un coeficiente de correlación de 0.4 con respecto a la acumulación de la bixina. (Figura 3.6 I, J y Cuadro 3.3).

Estos resultados son interesantes ya que las β y ε -ciclasas determinan tanto el flujo de los carotenoides, así como la disposición de licopeno presente, lo cual podría indicar que

β y ε - ciclasas juegan un papel importante en la biosíntesis de la bixina y posiblemente explicar las diferencias en la acumulación de la bixina entre accesiones.

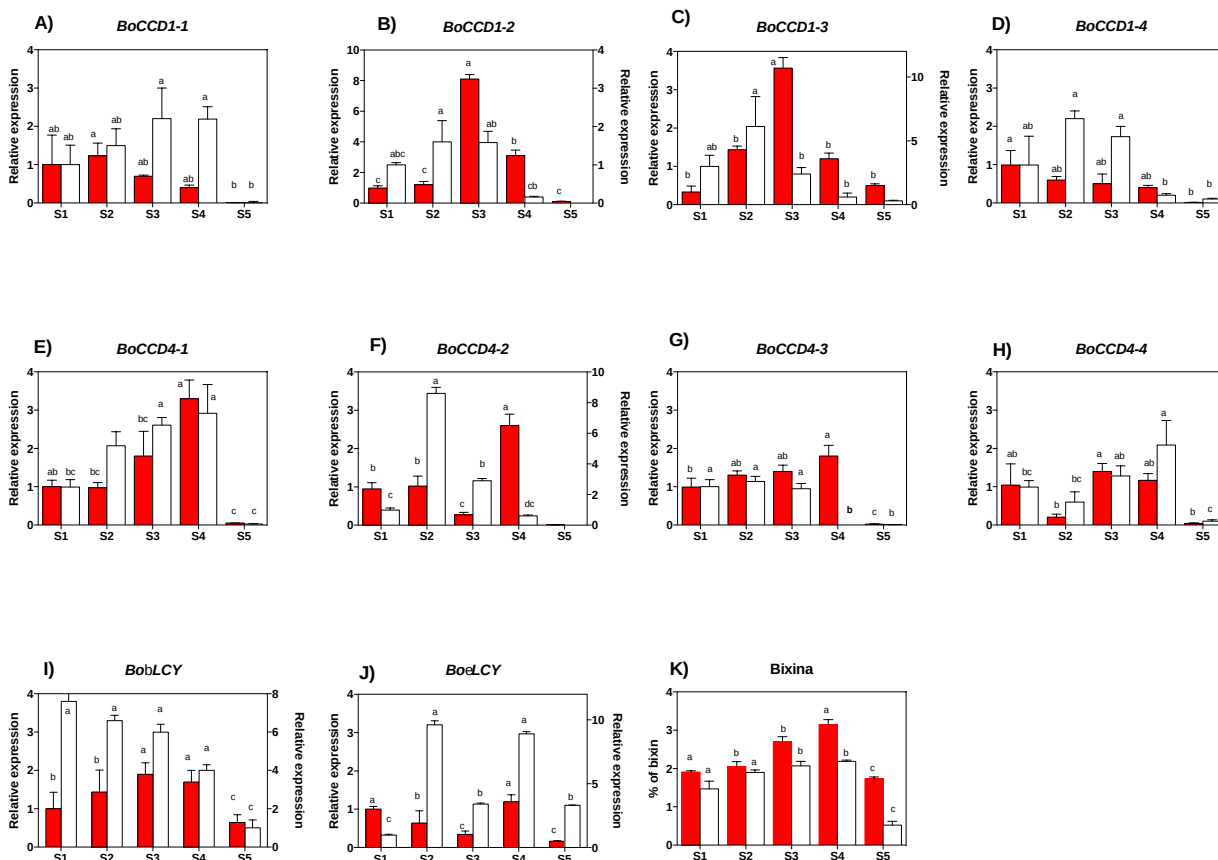


Figura 3.6. Análisis de la expresión por qRT-PCR de los genes BoCCDs, β y ε - ciclasas en dos accesiones de *Bixa orellana* L.

Las barras de color rojo representan la accesión Rosa y las barras de color blancas representan la accesión Blanca. S1 a S5 corresponden a los diferentes estadios en desarrollo de las semillas. Los niveles de expresión fueron normalizados de acuerdo con la expresión del gen 18S y en todos los casos el estadio S1 se utilizó como referencia. Los valores reportados representan las medias $\pm$ SD de n=3. En K se muestra el porcentaje de acumulación de la bixina de las dos accesiones en los diferentes estadios de desarrollo. Diferentes letras indican diferencias significativas en los niveles de expresión.

Cuadro 3.3. Análisis de correlación entre la expresión de los genes referidos y la acumulación de bixina.

Rosa											
Correlación	CCD1-1	CCD1-2	CCD1-3	CCD1-4	CCD4-1	CCD4-2	CCD4-3	CCD4-4	BLYC	ELYC	BIXIN

CCD1-1	1.00	0.01	0.06	0.81	0.04	0.03	0.29	-0.05	0.11	0.38	-0.05
CCD1-2		1.00	0.82	0.03	0.51	-0.06	0.45	0.76	0.68	-0.12	0.64
CCD1-3			1.00	-0.01	0.18	-0.17	0.28	0.35	0.48	-0.20	0.44
CCD1-4				1.00	0.14	0.19	0.34	0.07	-0.07	0.49	0.08
CCD4-1					1.00	0.73	0.82	0.55	0.60	0.57	0.89
CCD4-2						1.00	0.75	0.04	0.26	0.78	0.66
CCD4-3							1.00	0.44	0.64	0.59	0.73
CCD4-4								1.00	0.66	0.05	0.49
BLYC									1.00	0.23	0.62
ELYC										1.00	0.43
BIXIN											1.00

Blanca

Correlación	CCD1-1	CCD1-2	CCD1-3	CCD1-4	CCD4-1	CCD4-2	CCD4-3	CCD4-4	BLYC	ELYC	BIXIN
CCD1-1	1.00	0.30	0.14	0.20	0.74	0.26	0.30	0.54	0.55	0.20	0.81
CCD1-2		1.00	0.70	0.81	0.30	0.78	0.87	-0.14	0.41	0.42	0.46
CCD1-3			1.00	0.74	0.26	0.80	0.73	-0.21	0.40	0.28	0.35
CCD1-4				1.00	0.29	0.79	0.79	-0.08	0.53	0.23	0.47
CCD4-1					1.00	0.30	0.15	0.79	0.28	0.46	0.91
CCD4-2						1.00	0.67	-0.18	0.27	0.49	0.44
CCD4-3							1.00	-0.18	0.69	0.06	0.37
CCD4-4								1.00	0.22	0.22	0.71

BLYC	1.00	-0.16	0.52
ELYC		1.00	0.41
BIXIN			1.00

3.4 Análisis *in silico* de las secuencias de los genes *BoCCDs*

3.4.1 Análisis de secuencias y modelo por homología de *BoCCD*

Como ya se mencionó, los genes de la familia de CCDs presentan características estructurales conservadas entre esta familia de enzimas.

Una de las características que distingue a las CCD1s de las CCD4s es su localización celular. Las CCD1s están localizadas en el citosol, mientras que las CCD4s se localizan en los plastidios en la mayoría de las plantas, donde también se localizan sus sustratos (Cunningham y Gantt, 1998; Walter y Strack, 2011). Bajo esta consideración la predicción de la localización subcelular de las *BoCCDs*, se determinó en iPSORT Prediction, (<http://ipsort.hgc.jp/>) (Figura 3.7 A).

La comparación de las secuencias proteicas de CCDs de *Bixa orellana* L. con otras plantas, reveló que existe mucha variabilidad en el extremo N-terminal, donde presuntamente se localiza el péptido señal de localización subcelular.

De acuerdo a las predicciones, las CCD1s no contienen péptido señal de localización plastídica y de hecho, las enzimas de este tipo no han sido localizadas en los plástidos (Walter y Strack, 2011). En *Arabidopsis*, todos los miembros de la subfamilia CCDs, excepto AtCCD1, contienen un péptido señal de localización plastídica (Tan et al. 2003, Bouvier et al. 2003b, Auldridge et al. 2006b). Por su parte, las *BoCCD4s* de *Bixa orellana* L., contienen un péptido señal plastídico, lo que concuerda con lo reportado por Cárdenas-Conejo et al. (2015) Figura 3.7 A.

El nivel de identidad entre secuencias de las familias de CCDs y las NCEDs en plantas ha logrado que la estructura de VP14 sea considerado un prototipo ideal para el análisis de la estructura de todas estas enzimas (Messing et al. 2010, Von et al. 2004).

Con este análisis, se observó que las *BoCCD1-1*, *BoCCD4-1* y *BoCCD4-3* de *B. orellana* L. cuentan con los motivos conservados que caracterizan a la familia de CCDs, como son los dominios de hélices tipo α y β con los cuales forma un túnel en el que se encuentra cuatro histidinas que coordinan el cofactor Fe^{+2} requerido para su actividad de corte (Kloer

y Scholz, 2006, Messing et al. 2010, Harrison y Bugg 2014), Figura 3.7 B.

Este análisis es importante, ya que reveló que las tres BoCCDs analizadas cuentan con toda la estructura que caracteriza una CCD de plantas, por lo que muy probablemente puedan tener actividad de corte sobre algún sustrato como el licopeno.

En muchos casos la estructura de CCDs de otras plantas y la falta de los dominios o regiones, está implicada en la actividad de una CCD particular (Rodrigo et al. 2013, Frusciante et al. 2014).

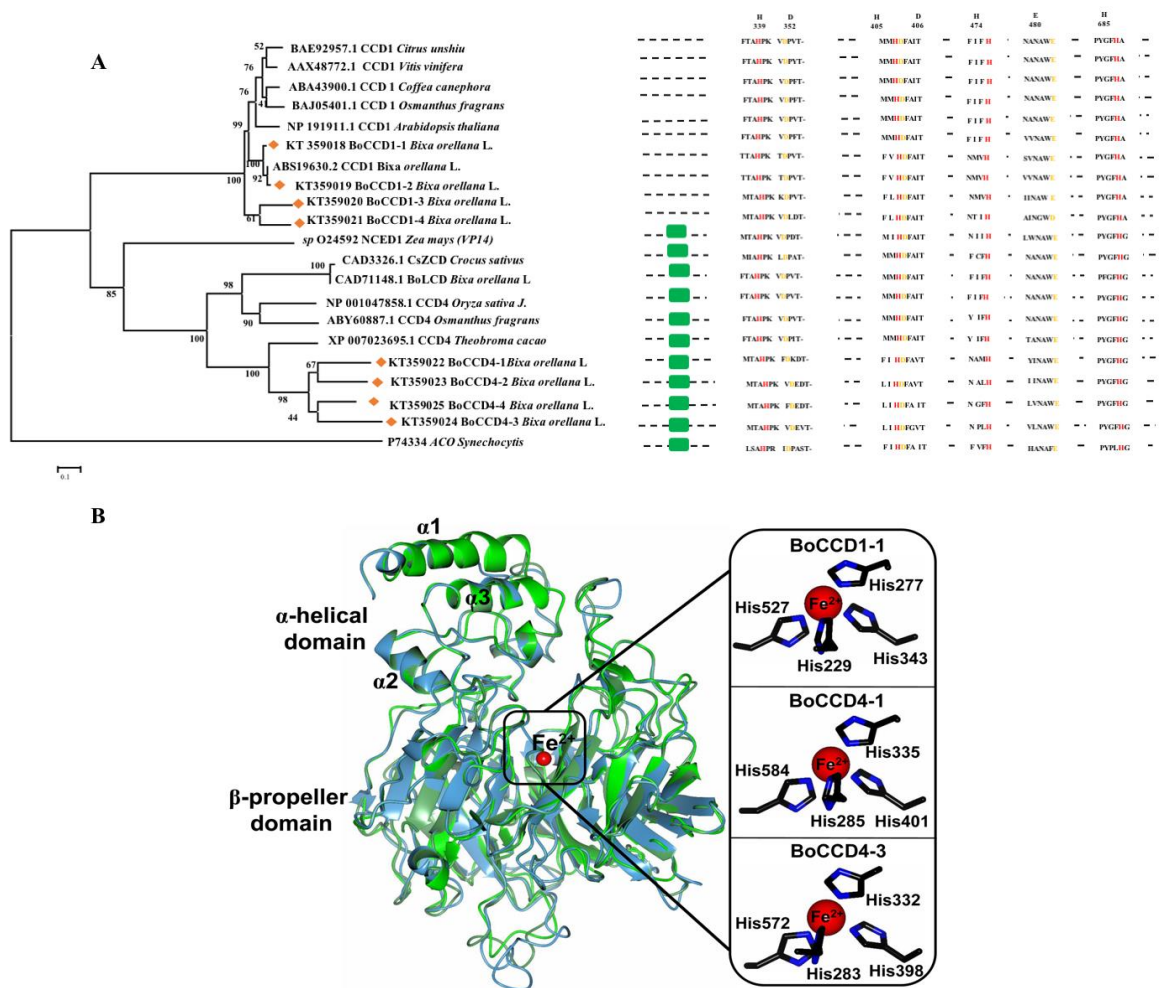


Figura 3.7. Análisis *In silico* de BoCCDs

A) Alineamiento de secuencias BoCCDs con proteínas homólogas. Las secuencias fueron alineadas con Mega6 (Tamura et al. 2013). *Osmanthus fragrans* (Thunb.) (ABY60887.1), *Oryza sativa Japonica Group* (NP_001047858.1), *Crocus sativus* L. (CAD3326.1), *Theobroma cacao* L. (XP_007023695.1), *Zea mays* L. (O24592), *Citrus unshiu* (Yu. Tanaka ex Swingle) (BAE92957.1), *Vitis vinifera* (AAX48772.1), *Coffea canephora* L. (ABA43900.1), *Osmanthus fragrans* (Thunb.) (BAJ05401.1), *Bixa orellana* L. (CAD71148.1, ABS19630.2, KT359018, KT359019, KT359020,

KT359021, KT359022, KT359023, KT359024), y *Arabidopsis thaliana* L. (NP_191911.1). El número cercano a cada clado representa el valor bootstrap por 1000 replicas. El árbol fue enraizado utilizando *Synechocystis* sp. apocarotenoid cleavage oxygenase (ACO) (P74334). Los diamantes naranjas representan las BoCCDs analizadas, en rectángulos verdes el péptido señal de acuerdo a iPSORT (<http://ipsort.hgc.jp/>). Las letras en rojo y amarillo indican los residuos de histidina y aspartato o glutamato respectivamente. **B)** Superposición estructural de la BoCCD1 (verde), BoCCD4-1 (azul claro) y BoCCD4-3 (verde fuerte). Los modelos muestran el centro catalítico (esfera roja) y los dominios α - y β - helice, en los recuadros negros un acercamiento de las cuatro histidinas que coordinan el Fe^{2+} .

3.5 RT-PCR *in situ* de *BoCCD1-1*, *BoCCD4-1*, *BoCCD4-3*

Para identificar las células en las cuales son expresados los genes *BoCCDs* se utilizó la técnica de RT-PCR *in situ*. La expresión de los genes *BoCCD1-1*, *BoCCD4-1*, *BoCCD4-3* a nivel celular fue analizada en la etapa S4. La presencia de la tinción en color azul indica la presencia de transcritos del gen analizado. Como control positivo (18S+, con anticuerpo digoxigenina) y negativo (18S-, sin anticuerpo digoxigenina) fue utilizado el gen RNA ribosomal 18S de achote (Figura 3.8).

La expresión del gen 18S+ se observó en el arilo de la semilla, donde se ve formando estructuras circulares en la periferia de la semilla (BSC) (Figura 3.8, flechas blancas) y en el endospermo (flechas amarillas). Por su parte, los transcritos de los genes *BoCCDs* fueron encontrados en las mismas células en las que se detectó la expresión del gen 18S, sin embargo, se observó que la intensidad de la tinción fue diferente para cada gen analizado. El gen *BoCCD4-3* fue el que presentó mayor expresión y tinción en las BSC (e) en comparación con *BoCCD4-1* (f) y *BoCCD1-1* (d). El gen *BoCCD4-1* fue el gen que presentó menor expresión y tinción en la mayoría de los tejidos analizados, los cuales mostraban menor tinción. En comparación con los genes 18S+ (i) y *BoCCD4-3* (k), la expresión del gen *BoCCD1-1* fue más intensa en el endospermo (j).

De manera interesante se observó que las células BSC son las zonas con tinción más intensa (a-f). Los tejidos fueron testificados de manera negativa con la expresión del gen 18S-, que no mostró expresión en los tejidos indicados (b, h).

La expresión del gen *BoCCD4-3* en las BSC es un resultado interesante, ya que estas células son las encargadas de almacenar bixina (Louro y Santiga 2015) por lo que la expresión de este gen en estas células podría indicar su participación en la síntesis de la bixina. Por su parte el gen *BoCCD1-1* parece expresarse más en el endospermo que en

las BSC, lo cual difiere con lo reportado por Rodríguez-Ávila et al. (2011b), esto posiblemente está relacionado al estadio de la semilla analizado o la expresión de otro alelo del gen *BoCCD1-1* por tratarse de una accesión diferente, ya q.

Por otro lado, el gen *BoCCD4-1* al parecer podría no estar involucrado en la síntesis de bixina, ya que muestra una baja expresión en los tejidos analizados. Sin embargo, los resultados apoyan que por lo menos una de las *BoCCDs* analizadas podría estar involucrada en la síntesis de bixina.

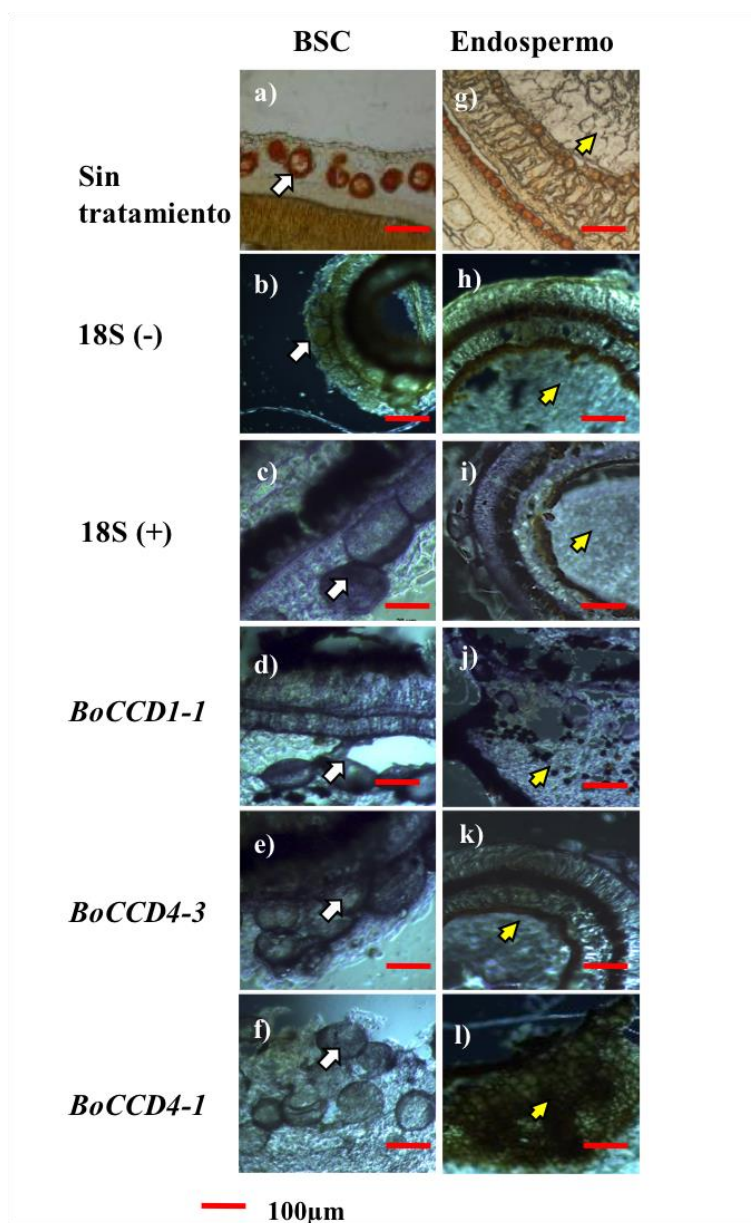


Figura 3.8. PCR *in situ* de semillas inmaduras de achiote en etapa S4.

La tinción en color azul indica expresión del gen referido.

a, g) Semilla inmadura sin tratamiento; b, h) 18S- control negativo; c, i) 18S control positivo; d, j) Gen *BoCCD1-1*; e, k) Gen *BoCCD4-3*; f, l) Gen *BoCCD4-1*. BSC: células de almacenamiento de bixina: (flechas blancas), flechas amarillas: endospermo. Barra = 100µm.

3.6 Análisis de la función de los genes *BoCCDs* en *E. coli*

3.6.1 Clonación de los genes *BoCCDs* en *E. coli*

De acuerdo al análisis de expresión de los genes *BoCCDs*, se seleccionaron los genes *BoCCD1-1*, *BoCCD4-1* y *BoCCD4-3*, para estudiar su función y posible participación en la biosíntesis de la bixina, ya que su expresión se incrementa durante el desarrollo de la semilla y correlaciona con la acumulación del pigmento.

Para determinar la función los genes *BoCCDs* referidos, como primer paso fue necesario clonarlos en *E. coli* utilizando el sistema de expresión GATEWEY.

3.6.2 Amplificación de los ORFs de las *BoCCDs* seleccionadas y su clonación en el vector pCR™8/GW/TOPO.

Inicialmente se obtuvieron los amplicones correspondientes a los marcos de lectura abiertos de los genes *BoCCD1-1* (1656 pb), *BoCCD4-1* (1846 pb) y *BoCCD4-3* (1780 pb), Figura 3.9.

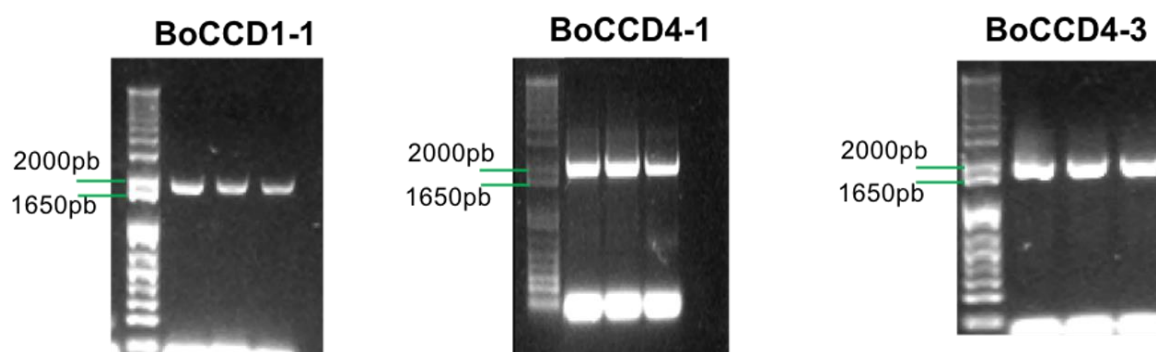


Figura 3.9 Productos de la amplificación de los ORFs de los genes *BoCCDs*.

Se muestran geles de agarosa al 1% teñidos con gel red en los que se resolvieron los fragmentos de amplificación obtenidos. Amplicones obtenidos de los genes *BoCCD1-1*: 1656 pb, *BoCCD4-1*: 1846 pb, *BoCCD4-3*: 1780 pb. Marcador de peso molecular 1kb plus.

Los productos de amplificación se purificaron del gel y se ligaron al vector de clonación pCR™8/GW/TOPO de la manera referida en materiales y métodos.

3.6.2.1 Selección de colonias de bacterias transformadas

La inserción del ORF en el vector pCR™8/GW/TOPO se corroboró por digestión de DNA plamídico obtenido de las colonias transformantes seleccionadas con la enzima *EcoRI* (Promega). Como producto de la digestión en todos los casos se obtuvieron dos fragmentos, para BoCCD1-1 de 2860 y 1692 pb, para BoCCD4-1 de 2868 y 1908 pb y para BoCCD4-3 de 2868 y 1824 pb (Figura 3.10).

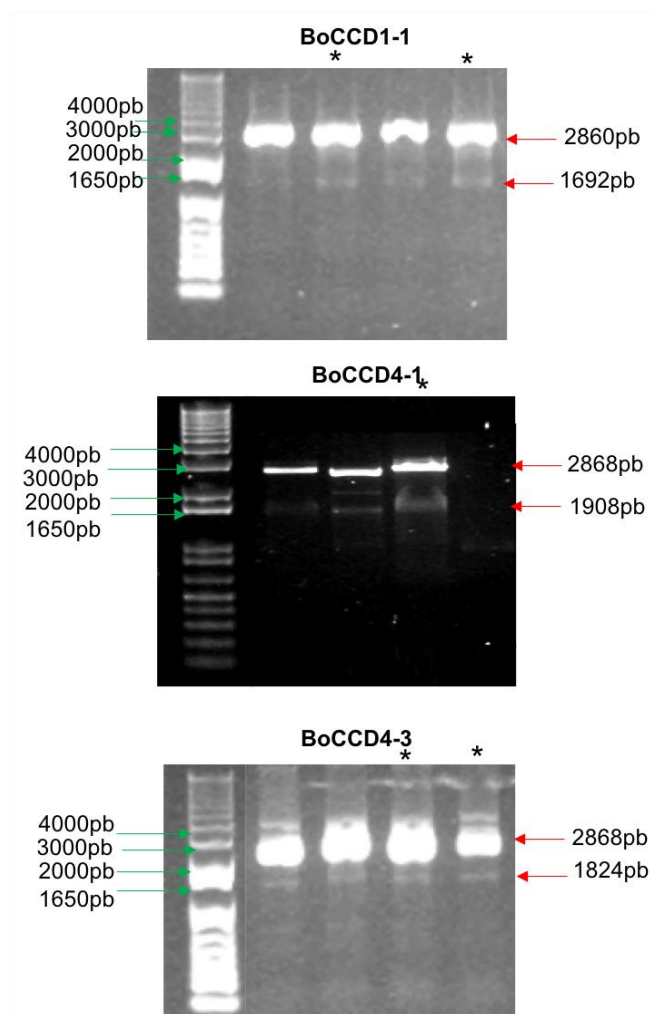


Figura 3.10. Verificación de los productos de recombinación entre pCR™8/GW/TOPO y los genes BoCCD1-1, BoCCD4-1 y BoCCD4-3.

Los plásmidos fueron digeridos con *EcoRI*. En * colonias utilizadas para el siguiente análisis. Cada carril representa una colia transformada. Gel de agarosa al 1% teñido con gel red. Marcador 1kb plus.

3.6.3 Movilización de los genes BoCCDs al vector de expresión pDEST™17Gateway®

Las bacterias recombinantes obtenidas de la clonación de las BoCCD en el plásmido pCR™8/GW/TOPO se utilizaron para transferir el gen de interés al vector de expresión pDEST™17Gateway® por LR recombinación. La confirmación del fragmenteo de DNA movilizado nuevamente se realizó por digestión con la enzima *EcoRI*. En este caso, como producto de la digestión se obtuvieron tres fragmentos para BoCCD1-1 de 4223, 1692 y 546 pb), para BoCCD4-1 de 4223, 1908, 546, y para BoCCD4-3 de 4223, 1824 y 546 pb (Figura 3.11).

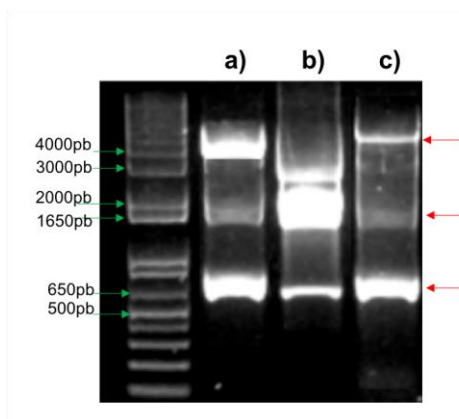


Figura 3.11. Clonas seleccionadas que llevan funciones traducionales de los genes a) BoCCD1-1, b) BoCCD4-1, c) BoCCD4-3 en el vector de expresión pDEST17™ Gateway. Digestión de DNA plasmídico con enzima *EcoRI*, los tres fragmentos producidos por la digestión son señalados por las flechas rojas. Gel de agarosa al 1% teñido con gel red. Marcador 1kb plus.

3.6.3 Expresión de genes BoCCDs en la cepa de *E. coli* BL21 productora de licopeno.

Los plásmidos recombinantes pDEST17BoCCD4-3, pDEST17BoCCD4-1 y pDEST17BoCCD1-1 fueron introducidos en cepas de *E. coli* BL21 previamente co-transformadas con el plásmido pACCRT-EIB que le permite acumular licopeno, (Figura 3.12). Las colonias se seleccionaron en medio LB líquido suplementado con ampicilina y cloranfenicol y posteriormente se indujo la expresión de los genes de interés con arabinosa al 2% (W/V). pDEST17BoCCD4-1 no pudo ser clonada, por lo que se continuó únicamente con las contrucciones pDEST17BoCCD1-1 y pDEST17BoCCD4-3.

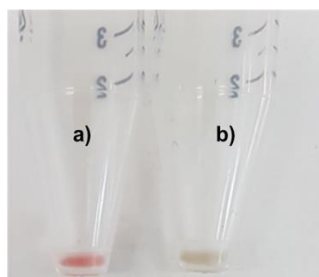


Figura 3.12. Diferencia entre las cepas bacterianas a) pACCRT-EIB (control) y b) pDES17BoCCDs (experimental).

3.6.3.1 Análisis de la función de los genes *BoCCD1-1* y *BoCCD4-3* por complementación de color

La función de los productos proteicos de los genes *BoCCD1-1* y *BoCCD4-3* se determinó por su capacidad de degradar el licopeno producido por la cepa pACCRT-EIB. Cuando se indujo la expresión de los transgenes con arabinosa, se observó cambio de coloración en las cepas de *E. coli* que expresan los plásmidos pDEST17BoCCD1-1 y pDEST17BoCCD4-3 en comparación con la cepa control pACCRT-EIB que sólo expresa los genes para producir licopeno. La pérdida de color indica que el carotenoide (licopeno) producido por la cepa pACCRT-EIB es utilizado como sustrato por las BoCCDs para producir nuevos compuestos (Figura 3.13).

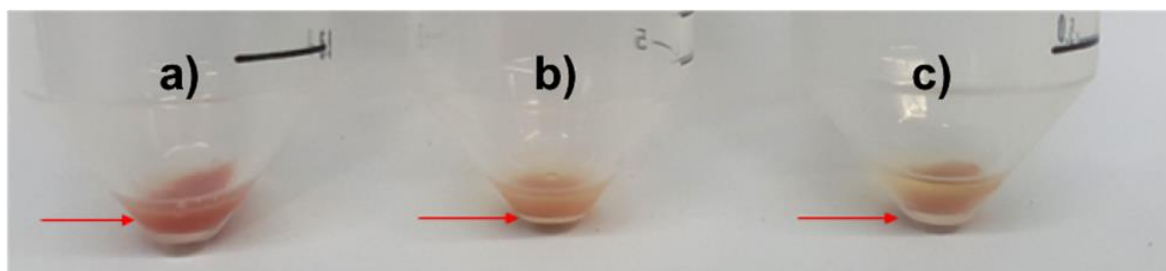


Figura 3.13. Análisis de la expresión de BoCCDs en *E. coli*. a) pACCRT-EIB, b) pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD1-1, c) pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD4-3.

Los análisis de expresión en *E. coli* han sido de gran ayuda para elucidar rutas o productos en otras plantas; los productos de estas enzimas han demostrado tener un impacto importante en la pigmentación de órganos en crisantemos, papa, durazno (Ohmiya et al. 2006, Campbell et al. 2010, Brandi et al. 2011, Adami et al. 2013).

Este análisis indica que *BoCCD1-1* y *BoCCD4-3* son funcionales en *E. coli*. por lo que podrían estar involucradas en la biosíntesis de bixina, produciendo algún compuesto

involucrado en su biosíntesis como podría ser la bixina aldehído.

3.6.5 Análisis de absorbancia y fluorescencia de BoCCD1-1, BoCCD4-3 y bixina

El análisis de funcionalidad mostró un cambio en el color de los extractos de las BoCCDs analizadas (Figura 3.13 A, B, C), por lo que para tratar de identificar los productos de su actividad sobre el licopeno, se midieron los espectros de absorbancia y fluorescencia de los extractos.

Se observó que las absorbancias de los extractos presentan picos cercanos a las longitudes de onda de absorción del licopeno y la bixina. Figura 3.14 D. Para obtener el espectro de emisión de fluorescencia, los extractos fueron excitados a una longitud de onda de 420 nm, donde los espectros de absorción de pDEST17BoCCD1 y pDEST17BoCCD4 presenta el máximo de absorción (Figura 3.14 E).

En cuanto al análisis por fluorescencia, se obtuvo un perfil de emisión aproximadamente de 450 a 590 nm, mientras que, para el extracto de pACCRT-EIB, al igual que para los controles (licopeno y bixina), no se presentó una intensidad significativa en ese rango de longitudes de onda.

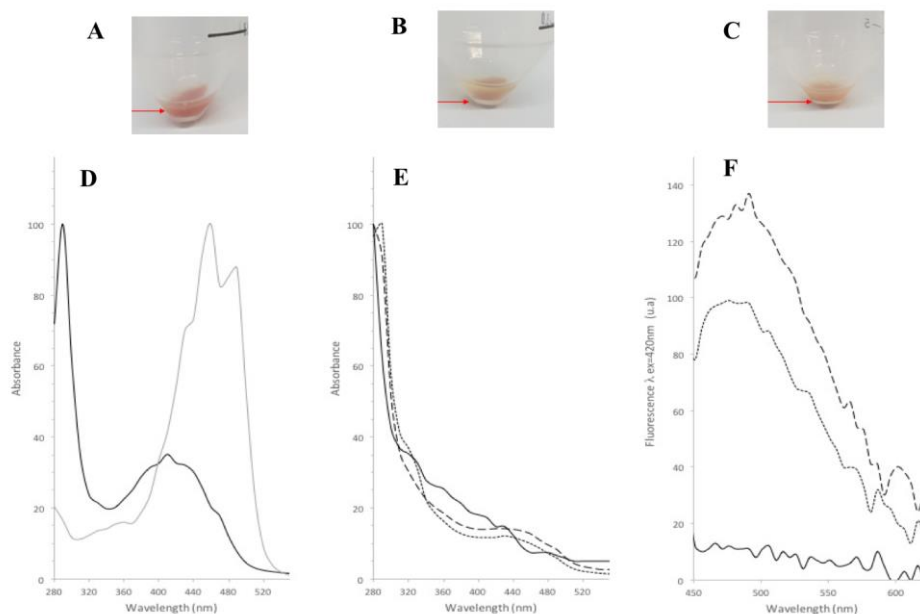


Fig. 3.14 Espectros de absorbancia y fluorescencia de los extractos.

A) pACCRT-EIB, B) pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD1-1, C) pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD4-3. D) Espectros de absorbancia normalizada al máximo, de los estándares de licopeno (línea negra) y de la bixina (línea gris). E) Espectros de absorbancia normalizada al máximo, de los extractos de pACCRT-EIB (línea continua), pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD1-1 (línea discontinua) y pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD4-3 (línea punteada). F) Espectros de emisión de fluorescencia de pACCRT-EIB (línea continua), pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD4-3 (línea discontinua) y pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD1-1 (línea punteada), a una excitación con longitud de onda de 420nm.

De tal manera, se sugiere que existen compuestos que sólo se producen como consecuencia de las actividades de BoCCD1-1 y BoCCD4-3, como podría ser el caso de la bixina aldehído (Figura 3.14 F), que es el compuesto formado después que el licopeno (presente en pACCRT-EIB) ha sido cortado por una CCD en la posición 5,6/ 5',6' (Bouvier et al. 2003a). Hasta este punto, es válido suponer que BoCCD1-1 y BoCCD4-3 están involucradas en la biosíntesis de la bixina. Para corroborar esta suposición, se procedió a analizar los extractos de pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD1-1 y pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD4-3 para tratar de identificar la presencia de la bixina aldehído.

3.6.4 Análisis de productos generados en cultivos de *E. coli*: pACCRT-EIB, pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD1-1 y pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD4-3 por UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS

Para este análisis primero se identificó la presencia de licopeno en las muestras: pACCRT-EIB (Control), pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD1-1, pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD4-3, utilizando como control positivo un estándar de licopeno (536.4 g/mol).

En los extractos analizados se pudo observar que los perfiles generados varían dependiendo de la BoCCD expresada en *E. Coli*.

El análisis de la muestra pACCRT-EIB mostró un pico en 536.4 g/mol que comprende de 340 a 540 m/z, (Figura 3.15 A), que es consistente con el tiempo de retención del estándar de licopeno (536.4 g/mol). Dicho pico se reduce cuando la expresión de BoCCD1-1 o BoCCD4-3 es inducida, indicando que las BoCCDs analizadas utilizan al licopeno como sustrato (Figura 3.15 B y C).

De acuerdo con Jako et al. (2002) y Bouvier et al. (2003b), el producto generado por el corte simétrico del licopeno en las posiciones 5, 6 y 5', 6' es la bixina aldehído (348.3 g/mol). Así, asumiendo que la BoCCD1-1 o BoCCD4-3 puedan realizar este corte; se

procedió a determinar la presencia de este compuesto en los extractos.

La bixina aldehído se encontró en los extractos de BoCCD1-1 y BoCCD4-3 como un aducto de 349.2 m/z, el cual corresponde a $[M+H]^+$, es decir de 348.2 m/z + peso molecular del hidrógeno. La relación 349.2 m/z corresponde al porcentaje presentado por las relaciones m/z en el rango de 340 a 540 m/z. Para este análisis se utilizó el estándar de bixina, ya que a la fecha no existe un estándar de bixina aldehído, pero se consideró que el estándar de bixina debería contenerlo.

En la Figura 3.15 A, se puede observar que el aducto $[M+H]^+$ no se encuentra presente en el control pACCRT-EIB, lo cual indica que efectivamente las BoCCDs están utilizando al licopeno como substrato para formarlo.

De manera interesante este resultado nos indica que, al menos en condiciones *in vitro*, ambas BoCCDs pueden realizar el mismo corte sobre el licopeno, sugiriendo tanot la participación de estas enzimas en la biosíntesis de la bixina, como que, en la ruta de biosíntesis de este pigmento, aparentemente hay más de un producto génico involucrado.

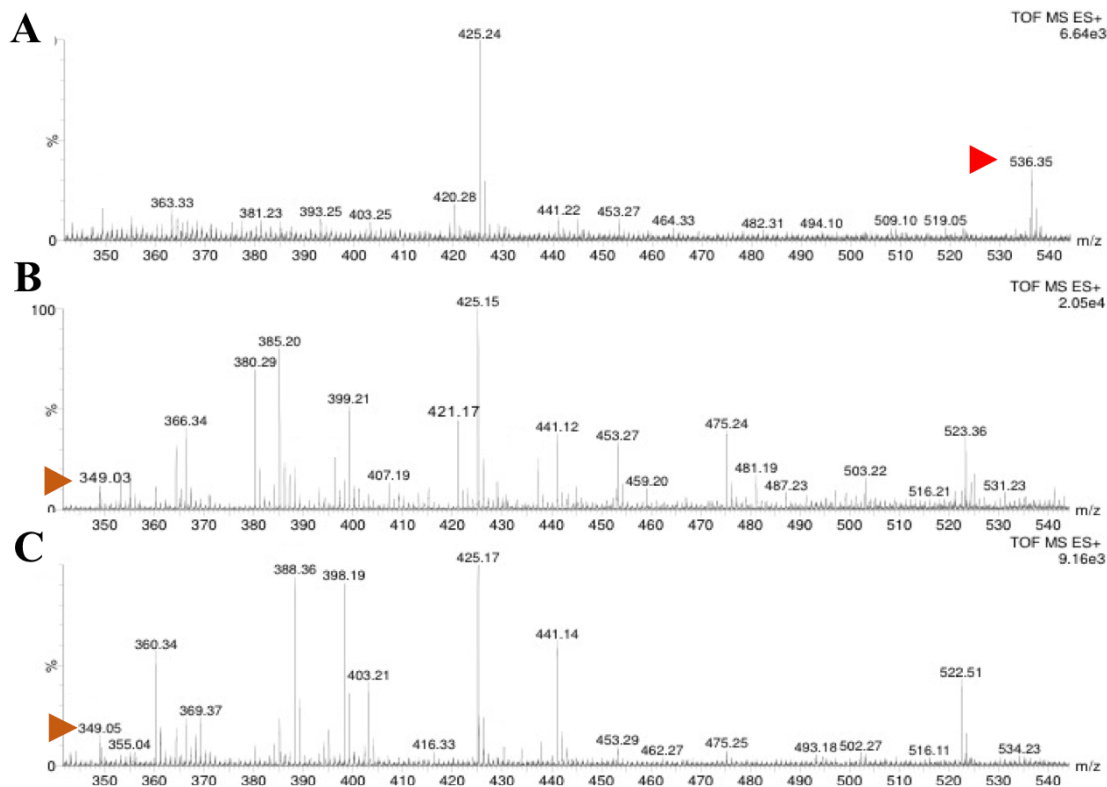


Figura 3.15 Espectros ESI-TOF-MS por inyección directa de A) pACCRT-EIB, B) pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD1-1, C) pACCRT-EIB + pDEST17BoCCD4-3.

El triángulo rojo indica al licopeno m/z , y el triángulo naranja corresponde a la relación m/z de la bixina aldehído (aducto $[M+H]^+$). Todas las relaciones identificadas se relacionaron con las masas del estándar de bixina.

Sin embargo, dado que la relación m/z sólo corresponde a la relación masa/carga y no el compuesto, se decidió realizar un FTIR (“Fourier Transform infrared absorption spectra”), para identificar los grupos funcionales presentes en los extractos y así buscar la presencia de los grupos aldehído y ácido en los extractos de BoCCD1-1 y BoCCD4-3, en comparación con el estándar de bixina.

3.6.5 Análisis de FTIR, absorbancia y fluorescencia de BoCCD1-1, BoCCD4-3 y bixina

Los resultados del análisis por FTIR mostraron un pico a los 2250 cm^{-1} en los extractos de BoCCD1-1 y BoCCD4-3, que no está presente en el espectro de la bixina, este pico podría ser producto de la absorción armónica entre el cambio de enlaces de los grupos

CHO (*), CH (**) y CH₃ (***), presentes por los diferentes compuestos generados por la digestión de licopeno. En esa zona también se registran los picos correspondientes a los triples enlaces entre carbono y carbono (2100-2250 cm⁻¹). Otro cambio significativo se registró en la zona comprendida entre 1600 a 1800 cm⁻¹, donde los picos representativos indican la presencia de dobles enlaces entre carbono y oxígeno de los grupos ésteres (1735-1800), grupos de ácidos carboxílicos (1700-1725) y grupos de aldehído y cetona (1630-1820). El cambio observado es la asimetría que se presentan los dos picos de esta zona en los espectros de BoCCD1 y BoCCD4, comparados con los de bixina, que podría indicar la presencia de la unión C=O entre los grupos aldehídicos (bixina aldehído) y ácidos (norbixina) o éster (bixina), detectados con las diferentes masas. (Figura 3.16).

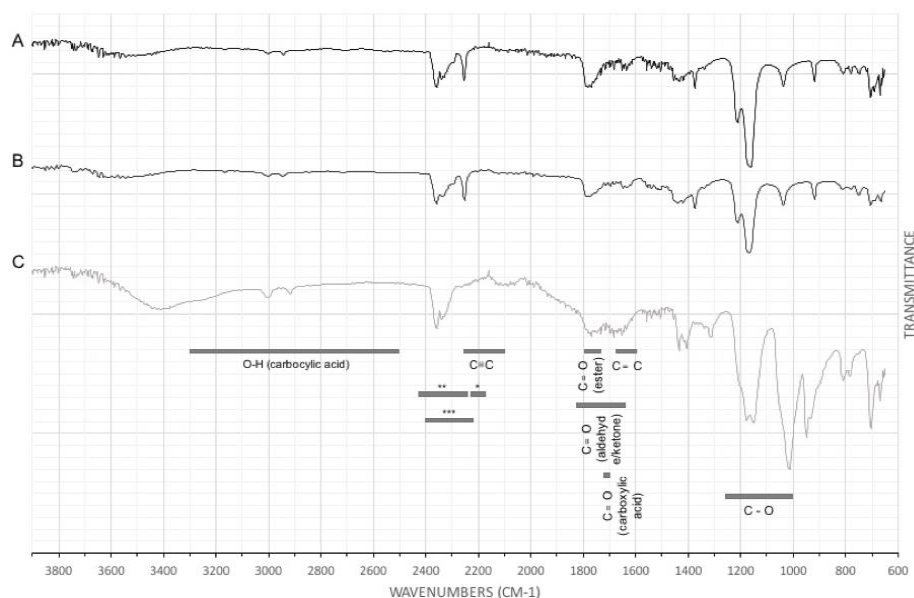


Figura 3.16. Espectros de FTIR para A) BoCCD4-3, B) BoCCD1-1 y C) STD de Bixina. Absorciones armónicas del IR-cercano (near-infrared overtone absorptions): entre CHO y CH (*, **) y entre CH₂ y CH₃.

Este resultado da más evidencia tanto de que BoCCD1-1 y BoCCD4-3 son funciolaes y podrían estar involucradas en la biosíntesis de bixina, ya que en este análisis los perfiles apuntan a la producción de compuestos con grupos aldehído en su estructura, como que posiblemente en la biosíntesis de este pigmento participan más de una CCDs.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PESPECTIVAS

4.1 Discusión

Debido a que la ruta de biosíntesis de la bixina reportado por Bouvier et al, (2003b) no ha sido reproducible y que en el análisis del transcriptoma de *B. orellana* L. (Cárdenas-Conejo et al. 2015) reveló, no sólo la falta de expresión de los genes publicados, si no también, la expresión de un alelo para los genes de las familias: CCD, ADH, MET involucradas en la biosíntesis de bixina, ha llevado a un análisis más complejo de lo publicado por Bouvier et al. (2003b). El análisis incluyó el estudio de la primera enzima implicada en la biosíntesis de la bixina, CCD, estableciendo su localización subcelular, funciones de modelado de proteínas homólogas, análisis de expresión por RT-PCR en tiempo real y RT-PCR *in situ*, determinación de la función de las BoCCD en *E. coli*. y la identificación y caracterización de los productos resultantes de la degradación del licopeno mediada por las BoCCDs expresadas en *E. coli*.

Así, con base en el transcriptoma recientemente obtenido en nuestro grupo de investigación, se seleccionaron diferentes BoCCDs 1 y 4 como potencialmente involucradas en la biosíntesis de bixina, considerando tanto sus patrones de expresión diferencial como la relación de su expresión con el contenido de bixina.

Este estudio, que se realizó a través de diferentes etapas de desarrollo de la semilla que es el órgano de la planta de *B. orellana* L. donde se encuentra la mayor concentración de bixina, contribuye a entender mejor las diferencias en la acumulación de este pigmento en dos accesiones contrastantes de *Bixa orellana* L.: Rosa (N4) y Blanca (P13).

Los resultados obtenidos mostraron que las dos accesiones analizadas producen diferentes cantidades de bixina durante el desarrollo de la semilla. La acumulación del pigmento, si bien comienza desde las primeras etapas de desarrollo, es el estadio S4 es donde más se acumula, mientras que, en la etapa de máximo desarrollo (S5) que representa el estadio donde se pensaba existía la máxima acumulación y es cuando comercialmente el pigmento es extraído para su comercialización, el nivel de bixina disminuye.

De manera interesante, se observó que la accesión Rosa presenta 30 % más bixina que la accesión Blanca. Se ha reportado que el contenido de bixina en las semillas varía de una planta a otra y coincide con las características fenotípicas (Rivera-Madrid et al. 2006; Valdez-Ojeda et al. 2008, Trujillo-Hernández et al. 2013).

Por otro lado, en ambas accesiones el contenido de la bixina disminuye en el estadio S5, un 45 % para la accesión Rosa y un 76 % para la accesión Blanca, por lo que la disminución del contenido de bixina podría estar relacionada con otros factores como podría ser un proceso de degradación asociado al desarrollo de la semilla, causado por la oxidación o por la translocación a la parte externa del arilo donde el pigmento se acumula en la semilla madura. Otra razón de la disminución del contenido de bixina podría estar asociado a la relación peso fresco / peso seco, ya que las semillas inmaduras tienen más agua y son más grandes. Otra posibilidad es que cuando se alcanza el máximo contenido de bixina en las semillas inmaduras el pigmento comienza a ser excretado en las semillas maduras. Finalmente es probable que la semilla madura sea utilizada como un órgano de almacenamiento de bixina y sus niveles disminuyen como consecuencia de la pérdida de las funciones de síntesis.

Resultados similares se han observado durante el desarrollo de los estigmas en el azafrán (*Crocus sativus* L.), en el cual se observó que los niveles de la crocetina son mayores en estadios inmaduros que en estadios maduros (Ahrazem et al. 2015).

De manera interesante, Frusciante et al. (2014) y Ahrazem et al. (2015) han reportado que la expresión del gen carotenoide dioxigenasa 2 en el azafrán (*CaCCD2*) tiene una correlación con el contenido de crocetina en el azafrán y la acumulación de este pigmento es controlada principalmente a nivel transcripcional por dicho gen.

En el análisis de la expresión de ocho genes *BoCCDs* en *Bixa orellana* L., se observó que *BoCCD1-1*, *BoCCD4-1* y *BoCCD4-3* incrementan su expresión durante el desarrollo de la semilla hasta el estadio S4 y disminuyen en el estadio S5 (Cárdenas-Conejo et al. 2015; Rodríguez-Ávila et al. 2011b), en paralelo, la reducción de la expresión de estos genes coincide con la acumulación de bixina, lo que sugiere que los genes *BoCCDs* se expresan cuando comienza la producción bixina y disminuyen su expresión cuando la biosíntesis de bixina se ha completado. De cualquier manera, la comparación de los perfiles de

expresión de los genes *BoCCD1-1*, *BoCCD4-1* y *BoCCD4-3*, resultó interesante, ya que se observó que el gen *BoCCD4-3* se expresa particularmente más en la accesión Rosa (mayor contenido de bixina), mientras el gen *BoCCD1-1* se expresa más en la accesión Blanca (menor contenido de bixina). Por su parte, la expresión del gen *BoCCD4-1* es similar en ambas accesiones.

Esta observación sugiere que la expresión diferencial de las *BoCCDs* puede estar relacionada a los diferentes tipos de apocarotenoides producidos en esta especie como se ha reportado en otros casos. Por ejemplo, la expresión de la *CCD1* tiene un papel importante en la formación de apocarotenoides volátiles en flores y frutos como la β -ionona (Schwartz et al. 2001), mientras que las *CCD4s* han sido documentadas para participar en la síntesis de pigmentos como crocetina en el azafrán (*Crocus Sativus* L.) (Bouvier et al. 2003a, Rubio et al. 2008) y la bixina en el achiote (*Bixa orellana* L.) (Bouvier et al. 2003b).

El análisis de la expresión de *CCDs* en otras especies de plantas han mostrado que genes individuales tienen un perfil de expresión en tejido específico, que es controlada de acuerdo con la producción de apocarotenoides tales como los involucrados en el desarrollo o la respuesta a estrés (Simkin et al., 2008). Mecanismos reguladores de retroalimentación actúan en la vía de los carotenoides y se ha reportado que los apocarotenoides están involucrados en dicho control (Cazzonelli y Pogson, 2010).

Por otro lado, en *Bixa orellana* L. se ha reportado de la existencia de unas células de almacenamiento de carotenoides (CSC) en el arilo de la semilla (Louro y Santiago 2015), cuya principal característica de estas células es que almacenan bixina, norbixina y otros carotenoides. En el análisis de la semilla por histología, se observó a la bixina formando cúmulos circulares (BSC) en la parte periférica de la semilla las cuales incrementan y aumenta de tamaño durante el desarrollo de la semilla, como previamente fue reportado por Louro y Santiago (2015). La identificación de estas células motivó el análisis de la expresión de los genes *BoCCD1-1*, *BoCCD4-1* y *BoCCD4-3* por RT-PCR *in situ* y el resultado mostró que el gen *BoCCD4-3* se expresa más en ellas.

De manera interesante, el gen *BoCCD4-3* ha sido reportado como uno de los principales candidatos para participar en la biosíntesis de la bixina (Cárdenas-Conejo et al. 2015), por

lo que el resultado de su expresión en las BSC, aporta más evidencia sobre la posible participación de esta *BoCCD* en la biosíntesis de bixina.

Sobre el papel que desempeñan los genes *Boβ-LYC1* y *Boε-LCY* en la biosíntesis de la bixina, cabe señalar que las licopeno ciclasas son un punto importante de regulación durante la biosíntesis de carotenoides en plantas, ya que determinan el flujo de los carotenoides más abundantes y las xantofilas, específicamente regulan la proporción de luteína versus β -caroteno y zeaxantina (Cunnigham y Gantt 1998; Kennis et al., 2001).

La expresión de los genes *Boβ-LYC1* y *Boε-LCY* durante los estadios en desarrollo de la semilla de *B. orellana* L. mostraron una importante relación con la acumulación de la bixina. *Boβ-LYC1* y *Boε-LCY* se expresan más en la accesión Blanca (menor contenido de bixina) y menos en la accesión Rosa (mayor contenido de bixina), lo cual sugiere que los altos niveles de expresión de *Boβ-LYC1* y *Boε-LCY* corresponden con la viabilidad del licopeno como sustrato para la biosíntesis de bixina, en concordancia con el bajo contenido de bixina presente en la accesión Blanca. En el caso de la accesión Rosa, los bajos niveles de expresión promueven la acumulación del licopeno, el cual subsecuentemente es utilizado como sustrato para la biosíntesis de la bixina, coincidiendo así con que esta accesión sea la que mayor contenido de bixina tiene. Por otro lado, estos resultados concuerdan con un reciente análisis, en el cual en una población de *B. orellana* L. se identificó un polimorfismo utilizando a la *Boβ-LYC1* como marcador funcional. El SNPs (polimorfismo de nucleótido simple) obtenido mostró que está asociado con el color de la flor y el bajo contenido de bixina en accesiones con flores blancas (Trujillo-Hdz et al. 2016).

Los resultados de expresión de *Boβ-LYC1* y *Boε-LCY*, son consistentes con el modelo propuesto por Cárdenas-Conejo et al. (2015), donde los bajos niveles de expresión de *Boβ-LYC1* y *Boε-LCY* durante el desarrollo de las semillas conllevan a la acumulación de licopeno, el cual es utilizado por las *BoCCDs* para la biosíntesis de la bixina. La relación entre la acumulación de apocarotenoides y los altos niveles de expresión de los genes licopeno ciclasas también ha sido documentado durante el mecanismo de síntesis del azafrán (Ahrazem et al. 2009). Así estos resultados parecen indicar que β - y ϵ -ciclase son clave en el control de la síntesis de la bixina.

El análisis de secuencias a nivel de amino ácidos de varias familias de CCD indicó que los miembros de las CCDS de *Bixa orellana* L. se agrupan en los clados de las familias CCD4s y CCD1s. El árbol filogenético mostró cinco clústers que corresponden a cada grupo de CCDs, nombrados NCED, CCD1, CCD4, CCD7, CCD8. Cada sub-familia CCD, en la mayoría de las especies de la misma familia de plantas se agrupan en el mismo clado (Priya y Siva, 2014). La relación filogenética de los genes CCD se documentó previamente en algunas especies de plantas como la uva (Lashbrooke et al, 2013), maíz, sorgo y arroz (Vallabhaneni et al. 2010). De manera interesante, la ya caracterizada BoLCD, reconocida como la enzima directamente involucrada en la síntesis de bixina (Bouvier et al., 2003b), no se agrupó con las BoCCD4s caracterizadas por Cárdenas-Conejo et al. (2015). El gen que codifica para *BoLCD* fue aislado con base a la secuencia de *CsZCD* (Bouvier et al. 2003b), por esta razón, *BoLCD* (CAD71148.1) y *CsZCD* (CAD3326.1) se encuentran el mismo clado. Además, *CsZCD* y *BoLCD* comparten una identidad de secuencia inusualmente alta a nivel de nucleótidos (98 %) y de aminoácidos (97 %), lo cual es sorprendente para enzimas de diferentes especies que catalizan la escisión en diferentes dobles enlaces (Auldrige et al., 2006a).

Por otro lado, en el análisis del transcriptoma de *B. orellana* L. (Cárdenas-Conejo et al., 2015) no se encontró a la *BoLCD*, quizás por esta razón las *BoCCD4s* en este trabajo se agruparon en clados diferentes y alejada del clado donde se agrupa la *BoLCD*. De esta forma, las CCDs de *Bixa orellana* L., podrían considerarse como miembros potencialmente implicados en la producción de bixina.

Rubio y colaboradores (2008), demostraron que la secuencia de la *CsZCD* está incompleta y que la proteína completa del azafrán (*Crocus sativus* L.) (*CsCCD4*) puede catalizar la conversión de β -caroteno en β -ionona en *E. coli*.

Por su parte, Frusciante y colaboradores (2014) por su parte al realizar un análisis *in silico* de ambas secuencias propusieron que *BoLCD* podría estar truncada en el extremo N-terminal, ya que se aisló originalmente a partir de la de la secuencia del gen *CsZCD* del azafrán (*Crocus sativus* L.), que aparentemente no tiene las características estructurales presentes en otras CCDs, como, por ejemplo, los residuos y dominios importantes para su actividad dioxigenasa (Rubio et al. 2008). En conjunto, estos resultados apoyan la idea de que las actividades de *CsZCD* y *BoLCD* deberían ser examinadas de forma más

cuidadosa (Ohmiya et al., 2009). Así mismo, estas observaciones dan más elementos para considerar la participación de nuevos miembros de CCD4 en la síntesis de bixina.

La estructura cristalográfica de VP14 del maíz, ha sido utilizada como modelo para el análisis de las características estructurales de las CCDs de otras especies vegetales (Schwartz et al. 1997), revelando importantes dominios funcionales, ayudando a identificar residuos involucrados en el centro catalítico o la especificidad por un sustrato (Kloer and Schulz 2006, Messing et al., 2010).

El análisis de modelaje molecular de las BoCCD1-1, BoCCD4-1 y BoCCD4-3 de *B. orellana* L., reveló la presencia de los dos dominios conservados entre CCDs, estructuras de α -hélice que se predice interactúan con membranas y el dominio β -hélice, estructura que contiene el centro catalítico, coordinado por cuatro residuos de histidina altamente conservados donde se encuentra el Fe^{2+} , cofactor necesario para su actividad dioxigenasa (Messing et al., 2010, Kloer and Schulz 2006, Sui et al. 2013, Harrison y Bugg 2014).

Por otro lado, todas las CCD4 contienen un péptido señal para localización plasmática y estudios de organelos en diferentes especies de plantas localizan a las CCD4s en los particularmente en plastoglobulos (PG), donde junto con otras enzimas carotenogénicas, tienen acceso directo a sus sustratos (Rubio et al. 2008, Ytterberg et al. 2006, Ma et al. 2013).

Las BoCCD4s de *Bixa orellana* L. contienen un péptido señal para localización plasmática en su región N-terminal. Considerando que BoCCD4-3 y BoCCD4-1 se localizan en los plastidios (dentro de los PG), esto le otorgaría el acceso al licopeno, el sustrato directo para la síntesis de la bixina. Por su parte, las BoCCD1s carecen del péptido señal. Ensayos *in vitro* por inmunohistolocalización, marcaje con tritio y por la fusión a la proteína verde fluorescente (GFP), demostraron que las CsCCD1 de *Crocus sativus* L., AtCCD1 de *A. thaliana* y LeCCD1 de tomate, se localizan en el citoplasma (Simkin et al. 2004a, Auldridge et al. 2006b, Rubio et al. 2008).

Así, tomando en cuenta que las CCD1s son proteínas citoplasmáticas, puede pensarse que sus sustratos carotenoides son en gran parte inaccesibles para estas enzimas. Sin

embargo, cantidades significativas de carotenoides se han encontrado en la envoltura exterior de los cloroplastos en las espinacas (Douce et al. 1973) y en el guisante (Markwell et al. 1992), donde probablemente sí pueden ser accesibles para estas enzimas.

También puede especularse que las enzimas CCD1 y CCD4 han evolucionado en diferentes compartimentos de la célula. Rubio et al. (2008) han propuesto que las CCDs podrían diversificar su acceso a los sustratos de un compartimento celular, como el plastidio, generando así nuevas posibilidades de actividad para estas enzimas dando origen a otros compuestos y proporcionándole a la planta diferentes beneficios.

Por lo tanto, la capacidad de interacción con membranas de las CCDs es importante y el dominio α -hélice permite tal interacción. Así, BoCCD4-3 y BoCCD4-1 podrían estar en los plastoglóbulos y transportar al licopeno hacia el centro activo formado por los dominios α -hélices y β -hélices, que permiten el paso de moléculas como los carotenoides (Rubio et al. 2014; Nugent y Jones 2012). Por lo que respecta a la BoCCD1-1, en el citosol podría interaccionar con las membranas para tener acceso a los sustratos necesarios para la formación de apocarotenoides, o a productos de degradación provenientes desde los plastidios.

Otros residuos que no son preservados en todas las CCDs, como en el caso de cítricos o papa (Messing et al., 2010, Ahrazem et al. 2016), también son cruciales para la actividad de las NECD. Esto puede estar involucrado en la actividad enzimática, y por esta razón, las CCDs son promiscuas al escoger sus sustratos (Auldrige et al. 2006b).

Por ejemplo, el análisis de la función de las enzimas NECDs a través de su expresión heteróloga en *E. coli*, ha demostrado que ellas son capaces de realizar cortes en diferentes posiciones; las enzimas NECDs producen cortes en las posiciones 11, 12 (11',12') del doble enlace de la 9-cis-violaxantina o la 9-cis-neoxantina, considerado en el primer paso para la biosíntesis de ABA (Schwartz et al., 1997).

Sin embargo, las CCD1 y 4 son promiscuas, pues pueden cortar en las posiciones 5,6 o (5', 6'); 7, 8 (7', 8'); y 9, 10 (9', 10'), de un rango diverso de carotenoides para producir diversos apocarotenoides o compuestos volátiles (Auldrige et al. 2006a, Vogel et al. 2008,

Ohmiya 2009, Lashbrooke et al. 2013).

El análisis de la función mediante la expresión de los genes *BoCCD1-1* y *BoCCD4-3* en *E. coli*, reveló que estas CCD sí son funcionales, lo cual indica que sí utilizan al licopeno como sustrato para generar bixina aldehído (348.3 m/z), como resultado del corte simétrico del licopeno en la posición 5,6/ 5',6' (Bouvier et al. 2003b).

Durante el análisis por UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS de los compuestos generados en los extractos de *BoCCD1-1* y *BoCCD4-3* se detectó un compuesto como el aducto de 349.2 m/z que corresponde a $[M+H]^+$. Este resultado es particularmente muy interesante ya que permite suponer que tanto *BoCCD1-1* y *BoCCD4-3* tienen actividad de corte 5, 6/ 5', 6' sobre el licopeno. Lo más relevante de este trabajo es haber identificado dos BoCCDs con la misma actividad de corte; ya que a la fecha no se ha reportado que una CCD1 que pueda cortar en ambas posiciones al licopeno. Se conoce que las CCD1s pueden cortar en alguna de estas posiciones para formar 6-metil-5-heptano-2-one (MHO) y otros compuestos como la pseudoionona y volátiles que no fueron analizados en este trabajo (Vogel et al. 2008).

En los análisis de absorbancia y fluorescencia de los extractos, se observó un perfil de absorbancia distinto a los controles, lo que se sugiere que las modificaciones realizadas por *BoCCD1* y *BoCCD4* se deben a la presencia de diferentes compuestos resultantes de la actividad de estas enzimas. Por otro lado, la comparación de los espectros de IR demostró que efectivamente hay una diferencia entre el estándar de bixina y los productos de los extractos, particularmente en la zona que corresponde a las señales de aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y ésteres, que presentan grupos funcionales que van siendo sustituidos durante la síntesis de bixina. Este resultado apoya que las *BoCCD1-1* y *BoCCD4-3* parecen estar involucradas en la biosíntesis de la bixina.

La presencia de familia de genes con la misma actividad enzimática parece ser común en el metabolismo secundario (Pichersky and Gang, 2000). Los resultados aquí presentados parecen indicar que *BoCCD1-1* y *BoCCD4-3* podrían trabajar de manera coordinada para sintetizar bixina o, dependiendo de las condiciones de la planta, constituir un mecanismo alternativo para sintetizar bixina y, probablemente, otros compuestos.

4.2 Conclusiones

El objetivo principal de este estudio fue caracterizar la expresión de genes de las *BoCCDs* 1 y 4 para identificar aquellas isoformas que presentaran una mayor relación con la acumulación bixina en las diferentes etapas de desarrollo de la semilla. Los resultados revelaron dos potenciales *BoCCDs* que parecen estar jugando un papel importante en la síntesis de bixina: *BoCCD1-1* y *BoCC4-3*

El análisis de la función de las *BoCCD1-1* y *BoCCD4-3* en *E. coli* reveló que ambas enzimas recombianes son capaces de formar un compuesto implicado en la biosíntesis de bixina a partir de licopeno: bixina aldehído. Este resultado está soportado por el análisis por FTIR que indicó la presencia de compuestos aldehídos.

Aparentemente ambas enzimas parecen estar involucradas en el metabolismo de carotenoides, sugiriendo que la biosíntesis de bixina es más compleja de lo que se pensaba, ya que implica la participación de más enzimas de las que se han propuesto.

Los mecanismos en los cuales *BoCCD1-1* y *BoCCD4-3* participan en la biosíntesis de la bixina y otros compuestos aún son inciertos, por lo que su esclarecimiento requiere de estudios más detallados.

En muchos sentidos la elucidación de la ruta de biosíntesis de bixina es incipiente, quedando pendiente estudiar la contribución de las enzimas subsecuentes a la actividad de las *CCDs*, con fin de definir su participación.

4.2.1 Modelos propuestos para la biosíntesis de bixina

Considerando la presencia de un complejo plastídico asociado a la membrana, la localización de celular de carotenoides y la existencia de las BSC (Fraser et al., 2000, Camara 1993, López et al., 2008, Joyard et al., 2009, Louro y Santiago 2016), en conjunto con los resultados aquí presentados, se proponen los modelos ilustrados en la Figura 4.1 para la biosíntesis de la bixina. Dichos modelos consisten en:

A) La biosíntesis de la bixina se lleva a cabo en los plastidios por la *BoCCD4* que

corta al licopeno en la posición 5,6 (5',6') para producir bixina. Esta hipótesis se soporta por la expresión diferencial de BoCCD4 en ambas accesiones de achiote, su correlación con la síntesis de la bixina y la baja expresión de las *BoβLCY1* y *BoαLCY* así como por la localización *in silico* de BoCCD4 en los plastidios (PG) (Kessler et al., 1999, Rey et al., 2000, Bréhélin et al., 2007). En este caso, una vez terminada la síntesis de bixina, ésta sería transportada por los estrómulos plastídicos hacia las BSC (Figura 4.1 A).

Los miembros de la familia de CCD4 han sido reportados para corta al licopeno simétricamente y asimétricamente, formando bixina aldehído en un corte simétrico y Metil 9'Z-apo-6'-lycopenoate o 6-methyl-5-hepten-2-one por un corte asimétrico (Lashbrooke et al., 2013, Rodrigo et al., 2013). Adicionalmente, los resultados obtenidos de mayor expresión en *E. coli* y los productos analizados por masas, FTIR, absorbancia y fluorescencia, sugieren que el producto presente es una bixina aldehído, por otro lado, se observó que el licopeno es reducido en presencia de BoCCD4 o BoCCD1 con respecto al control.

B) Si el licopeno es cortado asimétricamente por BoCCD4 en la posición 5, 6, el producto generado (C_{32}), puede ser exportado al citosol por difusión (Ahrazem et al., 2016). Una vez en el citosol, la BoCCD1-1 puede utilizar este compuesto para realizar el segundo corte en la posición 5',6' y producir bixina aldehído. Esta hipótesis es soportada por que BoCCD1 se localiza en el citosol, lo que le impide tener acceso al sustrato licopeno que se acumula en los plastidios. Para esta propuesta se toma en consideración la evidencia bioquímica de la presencia de un complejo plastídico asociado a las membranas, que sugiere que las enzimas carotenogénicas interactúan entre ellas formando complejos asociados a las membranas de los plastidios (Cámara de 1993; Fraser et al, 2000; López et al, 2008, Joyard et al, 2009, Moise et al. 2013, Pech et al. 2014). De tal manera, los posibles complejos enzimáticos en la membrana de los plastidios pudieran estar participando en la biosíntesis de bixina. Además, esta segunda hipótesis está apoyada por la presencia de dominios α -hélice en la estructura de las BoCCDs; que les permitiría interactuar con el complejo enzimático en la membrana de los plastidios (Messing et al., 2010, Kloer and Schulz 2006).

Adicionalmente, los resultados de esta tesis también sugieren una tercera hipótesis donde los mecanismos descritos en A y B, puedan ocurrir de manera simultánea para sintetizar bixina. Una vez sintetizada la bixina en los plastidios o en el citosol, la bixina podría ser transportada a las células de almacenamiento de bixina y de ahí, posiblemente a las valuolas, como se ha observado con otros carotenoides sintetizados en los plastidios, cuyo compartimiento de almacenamiento final son las vacuolas y los espacios intracelulares (Bouvier et al., 2005, Giuliano et al. 2003, Cámara y Bouvier 2004, Grilli y Canini 2004, Gómez-Gómez et al. 2017).

La elucidación de las funciones de las enzimas BoCCD junto con la identificación de posibles substratos adicionales, son claramente uno de los principales desafíos en la comprensión de la síntesis de bixina (Rivera-Madrid et al. 2013). Los resultados aquí presentados revelaron que la síntesis de bixina es mucho más compleja de lo considerado a la fecha. Además, para que los resultados sean más confiables es necesario realizar el análisis enzimático de todas las enzimas potencialmente involucradas. Así como llevar a cabo estudios más detallados de las otras enzimas potencialmente involucradas, como es el caso de ADH y MTH. Finalmente, sería muy interesante hacer estudios de expresión heteróloga de estas enzimas en otras especies de plantas, tanto para demostrar la función como, más a futuro, lograr la síntesis de bixina en otras especies vegetales.

Bibliografía

- Abayomi M, Adebayo AS, Bennett D, Porter R, Shelly-Campbell J, Dawkin G (2014). Phytochemical testing and *in vitro* antibacterial activity of *Bixa orellana* (annatto) seed extract. Br J PharmRes 4:1387–1399. Doi: 10.9734/BJPR/2014/10925.
- Adami, M., De Franceschi, P., Brandi, F., Liverani, A., Giovannini, D., Rosati, C., Dondini, L., & Tartarini, S. (2013). Identifying a carotenoid cleavage dioxygenase (ccd4) gene controlling yellow/white fruit flesh color of peach. Plant Molecular Biology Reporter, 31(5), 1166-1175. Doi: 10.1007/s11105-013-0628-6.
- Águila Ruiz-Sola M. y Rodríguez-Concepción Manuel (2012). Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis: A Colorful Pathway. The *Arabidopsis* Book. Number 10. American Society of Plant Biologists, 1-29. Doi: 10.1199/tab.0158.
- Ahrazem, O., Gómez-Gómez, L., Rodrigo, M. J., Avalos, J., & Limón, M. C. (2016). Carotenoid cleavage oxygenases from microbes and photosynthetic organisms: features and functions. International Journal of Molecular Sciences, 17(11), 1781. Doi: 10.3390/ijms17111781.
- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Argandoña-Picazo, J., Castillo, R., & Gómez-Gómez, L. (2016). Intron retention and rhythmic diel pattern regulation of carotenoid cleavage dioxygenase 2 during crocetin biosynthesis in saffron. Plant Molecular Biology, 91(3), 355-374. Doi: 10.1007/s11103-016-0473-8.
- Ahrazem, O., Rubio Moraga, A., Jimeno, M. L., & Gómez-Gómez, L. (2015). Structural characterization of highly glucosylated crocins and regulation of their biosynthesis during flower development in *Crocus*. Frontiers in Plant Science, 6, 971. Doi: 10.3389/fpls.2015.00971.
- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., López, R. C., & Gómez-Gómez, L. (2009). The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors. Journal of Experimental Botany, 61(1), 105-119. Doi: 10.1093/jxb/erp283.

- Akshatha V. Giridhar P. y Ravishankar G. A. (2011). Morphological diversity in *Bixa orellana* L. and variations in annatto pigment yield. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 86 (4) 319–324.
- Álvarez, C, L.A y Gómez D., J. (1990). El achiote (*Bixa orellana* L.) Seminario de Agronomía; Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Medellín. Pp. 7-50.
- Arango, J., Wüst, F., Beyer, P., & Welsch, R. (2010). Characterization of phytoene synthases from cassava and their involvement in abiotic stress-mediated responses. *Planta*, 232(5), 1251-1262. Doi: 10.1007/s00425-010-1250-6.
- Arathi, B. P., Sowmya, P. R. R., Vijay, K., Dilshad, P., Saikat, B., Gopal, V., & Lakshminarayana, R. An Improved Method of UPLC-PDA-MS/MS Analysis of Lycopene Isomers. *Food Analytical Methods* (2015) 8: 1962. Doi.org/10.1007/s12161-014-0083-5.
- Auldrige, M. E., Block, A., Vogel, J. T., Dabney-Smith, C., Mila, I., Bouzayen, M., Magallanes-Lundback, DellaPenna D., McCarty D., & Klee, H. J. (2006a). Characterization of three members of the *Arabidopsis* carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *The Plant Journal*, 45(6), 982-993. Doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02666.x.
- Auldrige, M. E., McCarty, D. R., & Klee, H. J. (2006b). Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 315-321. Doi: 10.1016/j.pbi.2006.03.005.
- Baldermann, S., Naim, M., & Fleischmann, P. (2005). Enzymatic carotenoid degradation and aroma formation in nectarines (*Prunus persica*). *Food research international*, 38(8-9), 833-836. Doi: 10.1016/j.foodres.2005.02.009.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K., & Miyano, S. (2002). Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics*, 18(2), 298-305. Doi: 10.1093/bioinformatics/18.2.298.

- Bartley, G. E., & Scolnik, P. A. (1995). Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell*, 7(7), 1027. Doi: 10.1105/tpc.7.7.1027.
- Beyer, P., Al-Babili, S., Ye, X., Lucca, P., Schaub, P., Welsch, R., & Potrykus, I. (2002). Golden rice: Introducing the β -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 506S-510S. Doi: 10.1093/jn/132.3.506S.
- Beyer, P., Kröncke, U., & Nievelstein, V. (1991). On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17072-17078.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, gku340.
- Booker, J., Auldridge, M., Wills, S., McCarty, D., Klee, H., & Leyser, O. (2004). MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Current Biology*, 14(14), 1232-1238. Doi: 10.1016/j.cub.2004.06.061.
- Bouvier F., Dogbo O. y Camara B. (2003a). Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science* 300(5628): 2089-2091. Doi:10.1126/science.1085162.
- Bouvier, F., Rahier, A., & Camara, B. (2005). Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in lipid research*, 44(6), 357-429. Doi: 10.1016/j.plipres.2005.09.003.
- Bouvier, F., Suire, C., Mutterer, J., & Camara, B. (2003a). Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in *Crocus* secondary metabolite biogenesis. *The Plant Cell*, 15(1), 47-62. Doi: 10.1016/j.tplants.2005.02.007.

- Brandi, F., Bar, E., Mourgues, F., Horváth, G., Turcsi, E., Giuliano, G., Liverani A., Tartarini S., Lewinsohn & Rosati, C. (2011). Study of 'Redhaven' peach and its white-fleshed mutant suggests a key role of CCD4 carotenoid dioxygenase in carotenoid and norisoprenoid volatile metabolism. *BMC Plant Biology*, 11(1), 24. Doi: 10.1186/1471-2229-11-24.
- Bréhélin, C., Kessler, F., & Van Wijk, K. J. (2007). Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends in Plant Science*, 12(6), 260-266. Doi: 10.1016/j.tplants.2007.04.003.
- Britton, G. (2008). Functions of carotenoid metabolites and breakdown products. In *Carotenoids* (pp. 309-324). Birkhäuser Basel. Doi: 10.1007/978-3-7643-7499-0_15
- Busch, M., Seuter, A., & Hain, R. (2002). Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, 128(2), 439-453. Doi: 10.1104/pp.010573
- Cámara, B. (1993). Plant phytoene synthase complex: Component enzymes, immunology, and biogenesis. *Methods in Enzymology*, 214, 352-365.
- Cámara, B., & Bouvier, F. (2004). Oxidative remodeling of plastid carotenoids. *Archives of biochemistry and biophysics*, 430(1), 16-21. Doi: 10.1016/j.abb.2004.06.028.
- Cámara, B., & Dogbo, O. (1986). Demonstration and solubilization of lycopene cyclase from *Capsicum* chromoplast membranes. *Plant Physiology*, 80(1), 172-174. Doi: doi.org/10.1104/pp.80.1.172.
- Campbell, R., Ducreux, L. J., Morris, W. L., Morris, J. A., Suttle, J. C., Ramsay, G., Bryan J., Hedley E., & Taylor, M. A. (2010). The metabolic and developmental roles of carotenoid cleavage dioxygenase 4 from potato. *Plant Physiology*, 154(2), 656-664. Doi: 10.1104/pp.110.158733.
- 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(1), 877. Doi: 10.1186/s12864-015-2065-4.
- Carol, P., & Kuntz, M. (2001). A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. Trends in plant science, 6(1), 31-36. Doi: 10.1016/S1360-1385(00)01811-2.
- Cazzonelli C.I. & Pogson Barry J. (2010). Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. Trends in Plant Science.15 (5): 266-274. Doi: 10.1016/j.tplants.2010.02.003.
- Chappell, J. (2002). The genetic and molecular genetic of terpene and sterol origami. Current Opinion in Plant Biology 5(2): 151-157. Doi: 10.1016/S1369-5266(02)00241-8.
- Christen, W.G., Manson, J.E., Glynn, R.J., Gaziano, J.M., Sperduto, R.D., Buring, J.E. y Hennekens, C.H. (2003). A randomized trial of beta carotene and eye-related cataract in US physicians. Archives of Ophthalmology,121 (3): 372-378. Doi: 10.1001/archopht.121.3.372.
- Coronado-Cáceres, L. J., Lugo-Cervantes, E., Puebla-Pérez, A. M., Aguilar- Espinosa, M., Alcaraz-López, O. A.,Mateos-Díaz, J. C., et al. (2014). "Actividad antitumoral y antioxidante de las proteínas de reserva de *Bixa orellana* L," in Proceedings of the Memorias en Extenso del 4º Congreso Internacional del Biología, Química y Agronomía: Innovación Para el Desarrollo Sustentable, Rome, 432–445.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 24, 1250-1319.
- Cunningham Jr, F. X., & Gantt, E. (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. Annual Review of Plant Biology, 49(1), 557-583. Doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.557.
- Da Silva, J. A. T., Dobránszki, J., & Rivera-Madrid, R. (2018). The biotechnology (genetic transformation and molecular biology) of *Bixa orellana* L.(achiote). Planta, 1-11. Doi: 10.1007/s00425-018-2909-7.

- De Smet, I., Signora, L., Beeckman, T., Inzé, D., Foyer, C. H., & Zhang, H. (2003). An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 33(3), 543-555. Doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01652.x.
- DellaPenna, D., & Pogson, B. J. (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 711-738. Doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144301.
- Dike, I. P., Obembe, O. O., and Adebisi, F. E. (2012). Ethnobotanical survey for potential anti-malarial plants in south-western Nigeria. *J. Ethnopharmacol.* 144, 618–626. Doi: 10.1016/j.jep.2012.10.002.
- Diretto, G., Al-Babili, S., Tavazza, R., Papacchioli, V., Beyer, P., & Giuliano, G. (2007). Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. *PLoS One*, 2(4), e350. Doi: 10.1371/journal.pone.0000350.
- Dogbo, O., Laferrière, A., d'Harlingue, A., & Camara, B. (1988). Carotenoid biosynthesis: Isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(19), 7054-7058. Doi: 10.1073/pnas.85.19.7054.
- Dorgan, J. F., Sowell, A., Swanson, C. A., Potischman, N., Miller, R., Schussler, N., & Stephenson, H. E. (1998). Relationships of serum carotenoids, retinol, α -tocopherol, and selenium with breast cancer risk: results from a prospective study in Columbia, Missouri (United States). *Cancer Causes & Control*, 9(1), 89-97. Doi: 10.1023/A:1008857521992.
- Douce, R., Holtz, R. B., & Benson, A. A. (1973). Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 248(20), 7215-7222.
- Dun, E. A., Brewer, P. B., & Beveridge, C. A. (2009). Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone. *Trends in Plant Science*, 14(7), 364-372. Doi:

10.1016/j.tplants.2009.04.003.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(4), 486-501.

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. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22901-22909. Doi: 10.1074/jbc.M100854200.

Fleischer, T. C., Ameade, E. P. K., Mensah, M. L. K., and Sawer, I. K. (2003). Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia* 74, 136–138. Doi: 10.1016/S0367-326X(02)00289-7.

Floss, D. S., Schliemann, W., Schmidt, J., Strack, D., & Walter, M. H. (2008). RNA interference-mediated repression of MtCCD1 in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula* causes accumulation of C27 apocarotenoids, shedding light on the functional role of CCD1. *Plant Physiology*, 148(3), 1267-1282. Doi: doi.org/10.1104/pp.108.125062.

Frank, A., & Groll, M. (2016). The methylerythritol phosphate pathway to isoprenoids. *Chemical Reviews*, 117(8), 5675-5703. Doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00537.

Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 228-265. Doi: 10.1016/j.plipres.2003.10.002.

Fraser, P. D., Schuch, W., & Bramley, P. M. (2000). Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts—partial purification and biochemical properties. *Planta*, 211(3), 361-369. Doi: 10.1007/s004250000293.

Fray, R. G., & Grierson, D. (1993). Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. *Plant Molecular Biology*, 22(4), 589-602. Doi: 10.1007/BF00047400.

- Frusciante, S., Diretto, G., Bruno, M., Ferrante, P., Pietrella, M., Prado-Cabrero, A., Rubio-Moraga A., Beyer P., Gómez-Gómez L., Al-Babili S & Giuliano, G. (2014). Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(33), 12246-12251. Doi: 10.1073/pnas.1404629111.
- Galpaz, N., Ronen, G., Khalfa, Z., Zamir, D., & Hirschberg, J. (2006). A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus. *The Plant Cell*, 18(8), 1947-1960. Doi: 10.1105/tpc.105.039966.
- Giorio, G., Stigliani, A. L., & 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. *The FEBS Journal (Federation of European Biochemical Societies)*, 275(3), 527-535. Doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06219.x.
- Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., & Willett, W. C. (1995). Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Annals of Internal Medicine*, 122(5), 327-334. Doi: 10.7326/0003-4819-122-5-199503010-00002.
- Giuliano, G. (2017). Provitamin A biofortification of crop plants: a gold rush with many miners. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 169-180. Doi: 10.1016/j.copbio.2017.02.001.
- Giuliano, G., Rosati, C., and Bramley, P. M. (2003). To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. *Trends Biotechnol.* 21, 513–516. Doi: 10.1016/j.tibtech.2003.10.001.
- Giuliano, G., Tavazza, R., Diretto, G., Beyer, P. y Taylor, M.A. (2008). Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnology*. 26:139-145. Doi: 10.1016/j.tibtech.2007.12.003.
- Gómez-Gómez, L., Parra-Vega, V., Rivas-Sendra, A., Seguí-Simarro, J. M., Molina, R. V., Pallotti, C., Rubio A., Diretto G., Prieto A., & Ahrazem, O. (2017). Unraveling massive

- crocins transport and accumulation through proteome and microscopy tools during the development of saffron stigma. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 76. Doi: 10.3390/ijms18010076.
- Grilli Caiola, M., & Canini, A. (2004). Ultrastructure of chromoplasts and other plastids in *Crocus sativus* L.(*Iridaceae*). *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 138(1), 43-52.
- Han, Y., Wang, X., Chen, W., Dong, M., Yuan, W., Liu, X., & Shang, F. (2014). Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in flower petal of *Osmanthus fragrans*. *Tree Genetics & Genomes*, 10(2), 329-338. Doi: 10.1007/s11295-013-0687-8.
- Hannoufa, A., & Hossain, Z. (2012) Regulation of carotenoid accumulation in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 1(3): 198-202. Doi: 10.1016/j.bcab.2012.03.004.
- Harrison P.J. y Bugg Timothy D.H. (2014). Enzymology of the carotenoid cleavage dioxygenases: Reaction mechanisms, inhibition and biochemical roles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 544,105–111. Doi: 10.1016/j.abb.2013.10.005.
- Hirschberg, J. (1999). Production of high-value compounds: carotenoids and vitamin E. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(2), 186-191. Doi: doi.org/10.1016/S0958-1669(99)80033-0.
- Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* 4(3): 210-218. Doi: 10.1016/S1369-5266(00)00163-1.
- Huang, F. C., Horváth, G., Molnár, P., Turcsi, E., Deli, J., Schrader, J., Sandmann G, Schmidt H., & Schwab, W. (2009). Substrate promiscuity of RdCCD1, a carotenoid cleavage oxygenase from *Rosa damascena*. *Phytochemistry*, 70(4), 457-464.
- Ibdah, M., Azulay, Y., Portnoy, V., Wasserman, B., Bar, E., Meir, A., Burger Y, Hirschberg J, Schaffer A, Katzir N., Lewinsohn E., & Tadmor, Y. (2006). Functional characterization of CmCCD1, a carotenoid cleavage dioxygenase from

- melon. *Phytochemistry*, 67(15), 1579-1589. Doi: 10.1016/j.phytochem.2006.02.009.
- Ilg, A., Beyer, P., & Al-Babili, S. (2009). Characterization of the rice carotenoid cleavage dioxygenase 1 reveals a novel route for geranial biosynthesis. *The FEBS journal* (Federation of European Biochemical Societies), 276(3), 736-747. Doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06820.x.
- Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D., & Hirschberg, J. (2002). Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. *The Plant Cell*, 14(2), 333-342. Doi: 10.1105/tpc.010303.
- Jako, C., Coutu, C., Roewer, I., Reed, D. W., Pelcher, L. E., & Covello, P. S. (2002). Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. *Plant Science*, 163(1), 141-145. Doi: 10.1016/S0168-9452(02)00083-3.
- Javelle, M., Marco, C. F., & Timmermans, M. (2011). *In situ* hybridization for the precise localization of transcripts in plants. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (57), e3328-e3328. Doi:10.1038/nprot.2012.006.
- Jones D, Taylor W, Thornton J. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci*.8:275–82.
- Josse, E. M., Simkin, A. J., Gaffé, J., Labouré, A. M., Kuntz, M., & Carol, P. (2000). A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiology*, 123(4), 1427-1436. Doi: 10.1104/pp.123.4.1427.
- Joyard, J., Ferro, M., Masselon, C., Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Garin, J., & Rolland, N. (2009). Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Molecular Plant*, 2(6), 1154-1180. Doi: 10.1093/mp/ssp088.
- Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H., & Yano, M. (2004). Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology*, 134(2), 824-837. Doi: 10.1104/pp.103.031104.

- Kato, M., Matsumoto, H., Ikoma, Y., Okuda, H., & Yano, M. (2006). The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation in citrus fruit. *Journal of Experimental Botany*, 57(10), 2153-2164. Doi: 10.1093/jxb/erj172
- Kennis, J. T., Gobets, B., van Stokkum, I. H., Dekker, J. P., van Grondelle, R., & Fleming, G. R. (2001). Light harvesting by chlorophylls and carotenoids in the photosystem I core complex of *Synechococcus elongatus*: a fluorescence upconversion study. *The Journal of Physical Chemistry B*. 105(19), 4485-4494.
- Kessler, F., Schnell, D., & Blobel, G. (1999). Identification of proteins associated with plastoglobules isolated from pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Planta*, 208(1), 107-113. Doi: 10.1007/s004250050.
- Kim, S. H., Ahn, Y. O., Ahn, M. J., Lee, H. S., & Kwak, S. S. (2012). Down-regulation of β -carotene hydroxylase increases β -carotene and total carotenoids enhancing salt stress tolerance in transgenic cultured cells of sweetpotato. *Phytochemistry*, 74, 69-78. Doi: 10.1016/j.phytochem.2011.11.003.
- Kirby, J., & Keasling, J. D. (2009). Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 335-355. Doi: 10.1146/annurev.arplant.043008.091955.
- Kishimoto, S., & Ohmiya, A. (2006). Regulation of carotenoid biosynthesis in petals and leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). *Physiologia Plantarum*, 128(3), 436-447. Doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00761.x.
- Kloer, D. P., & Schulz, G. E. (2006). Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(19-20), 2291-2303. Doi: 10.1007/s00018-006-6176-6.
- Kohlmeier L. (1995). Epidemiology of Anticarcinogens in Food. In: Longenecker J.B., Kritchevsky D., Drezner M.K. (eds) *Nutrition and Biotechnology in Heart Disease and Cancer*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 369. Springer, Boston,

MA. Doi: 10.1007/978-1-4615-1957-7_12.

Kumar, P., Henikoff, S., & Ng, P. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* 4, 1073–1081. Doi: 10.1038/nprot.2009.86.

Kumari, S., Priya, P., Misra, G., & Yadav, G. (2013). Structural and biochemical perspectives in plant isoprenoid biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, 12(2), 255-291. Doi: 10.1007/s11101-013-9284-6.

Lange, B. M., & Ghassemian, M. (2003). Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Molecular Biology*, 51(6), 925-948. Doi: 10.1023/A:1023005504702.

Lashbrooke, J. G., Young, P. R., Dockrall, S. J., Vasanth, K., & Vivier, M. A. (2013). Functional characterisation of three members of the *Vitis vinifera* L. carotenoid cleavage dioxygenase gene family. *BMC Plant Biology*, 13(1), 156. Doi: 10.1186/1471-2229-13-156.

Leal, F., & de Clavijo, C. M. (2010). Acerca de la Historia, Taxonomía, Botánica y Usos de *Bixa orellana* L. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*, 28. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*. 28: 78-86.

Li, F., Murillo, C., & Wurtzel, E. T. (2007). Maize Y9 encodes a product essential for 15-cis- ζ -carotene isomerization. *Plant Physiology*, 144(2), 1181-1189. Doi: 10.1104/pp.107.098996.

Li, F., Vallabhaneni, R., & 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 Physiology*, 146(3), 1333-1345. Doi: 10.1104/pp.108.122119.

Li, F., Vallabhaneni, R., Yu, J., Rocheford, T., & Wurtzel, E. T. (2008b). The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiology*, 147(3), 1334-

1346. Doi: 10.1104/pp.107.111120.

Lichtenthaler, H. K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 47-65. Doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.47.

Lichtenthaler, H. K., Schwender, J., Disch, A., & Rohmer, M. (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS letters (Federation of European Biochemical Societies)*, 400(3), 271-274. Doi: 10.1016/S0014-5793(96)01404-4.

Lintig V., J., & Sies, H. (2013). Carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 539 (2013) 99–101. Doi: 10.1016/j.abb.2013.09.014.

Little, T. M. H., & Jackson, F. (1976). Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura/por Thomas M. Little y F. Jackson Hills (No. Libro 311.2 L5Y.).

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, 25(4), 402-408. Doi:10.1006/meth.2001.1262.

López, A. B., Yang, Y., Thannhauser, T. W., & Li, L. (2008). Phytoene desaturase is present in a large protein complex in the plastid membrane. *Physiologia Plantarum*, 133(2), 190-198. Doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01058.x.

Louro, R. P., & Santiago, L. J. (2016). Development of carotenoid storage cells in *Bixa orellana* L. seed arils. *Protoplasma*, 253(1), 77-86. Doi: 10.1007/s00709-015-0789-2.

Ma, C., Ma, B., He, J., Hao, Q., Lu, X., & Wang, L. (2011). Regulation of carotenoid content in tomato by silencing of lycopene β/ϵ -cyclase genes. *Plant Molecular Biology reporter*, 29(1), 117-124. Doi: 10.1007/s11105-010-0211-3.

Ma, G., Zhang, L., Matsuta, A., Matsutani, K., Yamawaki, K., Yahata, M., & Kato, M. (2013). Enzymatic formation of β -citraurin from β -cryptoxanthin and zeaxanthin by carotenoid cleavage dioxygenase 4 in the flavedo of citrus fruit. *Plant*

Physiology, 163(2), 682-695. Doi: 10.1104/pp.113.223297.

Markwell, J., Bruce, B. D., & Keegstra, K. (1992). Isolation of a carotenoid-containing sub-membrane particle from the chloroplastic envelope outer membrane of pea (*Pisum sativum*). Journal of Biological Chemistry, 267(20), 13933-13937.

Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F., & Günata, Z. (2005). A carotenoid cleavage dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation. Journal of Experimental Botany, 56(420), 2721-2731. Doi: 10.1093/jxb/eri265.

McKeown, G. G., & Mark, E. (1962). The composition of oil-soluble annatto food colors. Journal of the AOAC, 45(3), 761-766.

McNicholas, S., Potterton, E., Wilson, K. S., & Noble, M. E. M. (2011). Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 67(4), 386-394.

Messing, S. A., Gabelli, S. B., Echeverria, I., Vogel, J. T., Guan, J. C., Tan, B. C., & Amzel, L. M. (2010). Structural insights into maize viviparous14, a key enzyme in the biosynthesis of the phytohormone abscisic acid. The Plant Cell, 22(9), 2970-2980. Doi: 10.1105/tpc.110.074815.

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.

Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwar, S., Saito, T., Ohtani T., & Miki, W. (1995). Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. Journal of Bacteriology, 177(22), 6575-6584.

Misawa, N., Truesdale, M. R., Sandmann, G., Fraser, P. D., Bird, C., Schuch, W., &

- Bramley, P. M. (1994). Expression of a tomato cDNA coding for phytoene synthase in *Escherichia coli*, phytoene formation *in vivo* and *in vitro*, and functional analysis of the various truncated gene products. *The Journal of Biochemistry*, 116(5), 980-985.
- Miziorko, H. M. (2011). Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 505(2), 131-143. Doi: 10.1016/j.abb.2010.09.028.
- Moise, A. R., Al-Babili, S., & Wurtzel, E. T. (2013). Mechanistic aspects of carotenoid biosynthesis. *Chemical Reviews*, 114(1), 164-193. Doi: 10.1021/cr400106y.
- Moreira, P. A., Lins, J., Dequigiovanni, G., Veasey, E. A., & Clement, C. R. (2015). The domestication of annatto (*Bixa orellana*) from *Bixa urucurana* in Amazonia. *Economic Botany*, 69(2), 127-135. Doi:10.1007/s12231-015-9304-0.
- Nambara, E., & Marion-Poll, A. (2005). Absciscic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, 165-185.
- Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C., & Pogson, B. J. (2015). Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant*, 8(1), 68-82. Doi: 10.1016/j.molp.2014.12.007.
- Nugent, T., & Jones, D. T. (2012). Accurate *de novo* structure prediction of large transmembrane protein domains using fragment-assembly and correlated mutation analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24), E1540-E1547. Doi: 10.1073/pnas.1120036109.
- Ohmiya, A. (2009). Carotenoid cleavage dioxygenases and their apocarotenoid products in plants. *Plant Biotechnology*, 26(4), 351-358. Doi: 10.5511/plantbiotechnology.26.351.
- Ohmiya, A., Kishimoto, S., Aida, R., Yoshioka, S., & Sumitomo, K. (2006). Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. *Plant Physiology*, 142(3), 1193-1201. Doi: 10.1104/pp.106.087130.

- Pech, J. C., Bouzayen, M., & Latché, A. (2014). Cellular, metabolic and molecular aspects of chromoplast differentiation in ripening fruit. *Fruit ripening: Physiology, signaling and genomics*. CABI, UK, 28-47.
- Pecker, I., Gabbay, R., Cunningham, F. X., & Hirschberg, J. (1996). Cloning and characterization of the cDNA for lycopene β -cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Molecular Biology*, 30(4), 807-819. Doi: 10.1007/BF00019013.
- Pichersky, E., & Gang, D. R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, 5(10), 439-445. Doi: 10.1016/S1360-1385(00)01741-6.
- Priya, R., & Siva, R. (2014). Phylogenetic analysis and evolutionary studies of plant carotenoid cleavage dioxygenase gene. *Gene*, 548(2), 223-233. Doi: 10.1016/j.gene.2014.07.037.
- Raddatz-Mota, D., Pérez-Flores, L. J., Carrari, F., Mendoza-Espinoza, J. A., de León-Sánchez, F. D., Pinzón-López, L. L., Godoy-Hernández G. & Rivera-Cabrera, F. (2017). Achote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1729-1741. Doi: 10.1007/s13197-017-2579-7.
- Ray, J., Moureau, P., Bird, C., Bird, A., Grierson, D., Maunders, M., Truesdale M., Bramley P., & Schuch, W. (1992). Cloning and characterization of a gene involved in phytoene synthesis from tomato. *Plant Molecular Biology*, 19(3), 401-404.
- Rey, P., Gillet, B., Römer, S., Eymery, F., Massimino, J., Peltier, G., & Kuntz, M. (2000). Over-expression of a pepper plastid lipid-associated protein in tobacco leads to changes in plastid ultrastructure and plant development upon stress. *The Plant Journal*, 21(5), 483-494. Doi: 10.1046/j.1365-3113X.2000.00699.x.
- Rios AO, Mercadante AZ & Borsarelli CD (2007). Triplet state energy of the carotenoid bixin determined by photoacoustic calorimetry. *Dyes Pigment* 74:561–565. Doi:

10.1016/j.dyepi.g.2006.03.018.

Rivera D. & Flores E. (1988) Morfología Floral del achiote, *Bixa orellana* L. (*Bixaceae*)
Revista de Biología Tropical. 36 (2B): 499-509.

Rivera-Madrid, R., Aguilar-Espinosa, M., Cárdenas-Conejo, Y., & Garza-Caligaris, L. E.
(2016). Carotenoid derivatives in achiote (*Bixa orellana*) seeds: synthesis and health
promoting properties. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1406. Doi:
10.3389/fpls.2016.01406D.

Rivera-Madrid, R., Burnell, J., Aguilar-Espinosa, M., Rodríguez-Ávila, N. L., Lugo-
Cervantes, E., & Sáenz-Carbonell, L. A. (2013). Control of carotenoid gene
expression in *Bixa orellana* L. leaves treated with norflurazon. *Plant Molecular Biology
reporter*, 31(6), 1422-1432. Doi: 10.1007/s11105-013-0604-1.

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.). *Sci Hortic (Amsterdam)* 109:165–172. Doi:10.1016/j.scienta.2006.03.011

Rodrigo, M. J., Alquézar, B., Alós, E., Medina, V., Carmona, L., Bruno, M., Al-Babili S., &
Zacarías, L. (2013). A novel carotenoid cleavage activity involved in the biosynthesis
of Citrus fruit-specific apocarotenoid pigments. *Journal of Experimental
Botany*, 64(14), 4461-4478. Doi: 10.1016/j.abb.2013.09.014.

Rodríguez Villalón Antia (2010). Biosíntesis de carotenoides en *Escherichia Coli* y tejido
no fotosintético de *Arabidopsis Thaliana*. Tesis de doctorado en la Facultad de
Farmacia Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de
Barcelona. 185 p.

Rodríguez-Ávila N.L., Narváez-Zapata J.A., Aguilar-Espinosa M.L., & Rivera-Madrid R.
(2011a). Regulation of pigment-related genes during flower and fruit development of
Bixa orellana. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(1), 43-50. Doi: 10.1007/s11105-
010-0207-z.

Rodríguez-Ávila, N. L., Narvaez-Zapata, J.A., Aguilar-Espinosa, M. L., & Rivera-Madrid R.

- (2009). Full-length gene enrichment by using an optimized RNA isolation protocol in *Bixa orellana* recalcitrant tissues. *Molecular Biotechnology*, 42(1), 84-90. Doi: 10.1007/s12033-008-9138-4.
- Rodríguez-Ávila, N. L., Narvaez-Zapata, J. A., Ramírez-Benítez, J. E., Aguilar-Espinosa, M. L., & Rivera-Madrid, R. (2011b). Identification and expression pattern of a new carotenoid cleavage dioxygenase gene member from *Bixa orellana*. *Journal of Experimental Botany*, 62(15), 5385-5395. Doi: 10.1093/jxb/err201.
- Rodríguez-Concepcion, M., & Stange, C. (2013). Biosynthesis of carotenoids in carrot: an underground story comes to light. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 539(2), 110-116. Doi: 10.1016/j.abb.2013.07.009.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., & Sahm, H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal*, 295(2), 517-524. Doi: 10.1042/bj2950517.
- Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S., & Sahm, H. (1996). Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 118(11), 2564-2566. Doi: 10.1021/ja9538344.
- Römer, S., Fraser, P. D., Kiano, J. W., Shipton, C. A., Misawa, N., Schuch, W., & Bramley, P. M. (2000). Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nature Biotechnology*, 18(6), 666. Doi: 10.1038/76523.
- Rubio, A., Rambla, J. L., Santaella, M., Gómez, M. D., Orzaez, D., Granell, A., & Gómez-Gómez, L. (2008). Cytosolic and plastoglobule-targeted carotenoid dioxygenases from *Crocus sativus* are both involved in β -ionone release. *Journal of Biological Chemistry*, 283(36), 24816-24825. Doi: 10.1007/s11103-014-0250-5.
- Ryle, M. J., & Hausinger, R. P. (2002). Non-heme iron oxygenases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(2), 193-201. Doi: 10.1016/S1367-5931(02)00302-2.
- Schmidt, H., Kurtzer, R., Eisenreich, W., & Schwab, W. (2006). The carotenase AtCCD1

- from *Arabidopsis thaliana* is a dioxygenase. Journal of Biological Chemistry, 281(15), 9845-9851. Doi: 10.1074/jbc.M511668200.
- Schwartz, S. H., Qin, X., & Zeevaart, J. A. (2001). Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. Journal of Biological Chemistry, 276(27), 25208-25211. Doi: 10.1074/jbc.M102146200.
- Schwartz, S. H., Tan, B. C., Gage, D. A., Zeevaart, J. A., & McCarty, D. R. (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. Science, 276(5320), 1872-1874. Doi: 10.1126/science.276.5320.1872.
- Schwartz, S. H., Tan, B. C., McCarty, D. R., Welch, W., & Zeevaart, J. A. (2003). Substrate specificity and kinetics for VP14, a carotenoid cleavage dioxygenase in the ABA biosynthetic pathway. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1619(1), 9-14. Doi: 10.1016/S0304-4165(02)00422-1.
- Schweiggert, R. M., & Carle, R. (2017). Carotenoid deposition in plant and animal foods and its impact on bioavailability. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57(9), 1807-1830. Doi: 10.1080/10408398.2015.1012756.
- Sergeant MJ, Li JJ, Fox C, Brookbank N, Rea D, Bugg TD, & Thompson AJ. 2009. Selective inhibition of carotenoid cleavage dioxygenases: phenotypic effects on shoot branching. Journal of Biological Chemistry 284, 5257–5264. Doi: 10.1074/jbc.M805453200.
- Simkin, A. J., Moreau, H., Kuntz, M., Pagny, G., Lin, C., Tanksley, S., & McCarthy, J. (2008). An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. Journal of Plant Physiology, 165(10), 1087-1106. Doi: 10.1016/j.jplph.2007.06.016.
- Simkin, A. J., Schwartz, S. H., Auldridge, M., Taylor, M. G., & Klee, H. J. (2004a). The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. The Plant Journal, 40(6), 882-892. Doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02263.x.

- Simkin, A. J., Underwood, B. A., Aldridge, M., Loucas, H. M., Shibuya, K., Schmelz, E., Clark D., & Klee, H. J. (2004b). Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of β -ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiology*, 136(3), 3504-3514. Doi: 10.1104/pp.104.049718
- Slattery, M. L., Curtin, K., Anderson, K., Ma, K. N., Edwards, S., Leppert, M., Schffer, D & Samowitz, W. S. (2000). Associations between dietary intake and Ki-ras mutations in colon tumors: a population-based study. *Cancer Research*, 60(24), 6935-6941. Doi: Published December 2000.
- Soares, V. L., Rodrigues, S. M., de Oliveira, T. M., De Queiroz, T. O., Lima, L. S., Hora-Júnior, Braz. T., Júnior H., Gramacho K. Micheli F., Cascardo J., Otoni W., Gesteira A., & Costa M. (2011). Unraveling new genes associated with seed development and metabolism in *Bixa orellana* L. by expressed sequence tag (EST) analysis. *Molecular Biology Reports*, 38(2), 1329-1340. Doi: 10.1007/s11033-010-0234-8.
- Sui, X., Kiser, P. D., Von Lintig, J., & Palczewski, K. (2013). Structural basis of carotenoid cleavage: from bacteria to mammals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 539(2), 203-213. Doi: 10.1016/j.abb.2013.06.012.
- Sun, T., Yuan, H., Cao, H., Yazdani, M., Tadmor, Y., & Li, L. (2017). Carotenoid metabolism in plants: the role of plastids. *Molecular Plant*. Doi: 10.1016/j.molp.2017.09.010.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729. Doi: 10.1093/molbev/mst197.
- Tan, B. C., Joseph, L. M., Deng, W. T., Liu, L., Li, Q. B., Cline, K., & McCarty, D. R. (2003). Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *The Plant Journal*, 35(1), 44-56. Doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01786.x.
- Tan, B. C., Schwartz, S. H., Zeevaart, J. A., & McCarty, D. R. (1997). Genetic control of

- abscisic acid biosynthesis in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(22), 12235-12240. Doi: 10.1073/pnas.94.22.12235.
- Tian, L., Musetti, V., Kim, J., Magallanes-Lundback, M., & DellaPenna, D. (2004). The *Arabidopsis* LUT1 locus encodes a member of the cytochrome P450 family that is required for carotenoid ϵ -ring hydroxylation activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(1), 402-407. Doi: 10.1073/pnas.2237237100.
- Trujillo-Hdz, J. A., Cárdenas-Conejo, Y., Turriza, P. E., Aguilar-Espinosa, M., Carballo-Uicab, V., Garza-Caligaris, L. E., & Rivera-Madrid, R. (2016). Functional polymorphism in lycopene beta-cyclase gene as a molecular marker to predict bixin production in *Bixa orellana* L. (achiote). *Molecular Breeding*, 36(9), 135. Doi: 10.1007/s11032-016-0555-y.
- Valdez-Ojeda, R., Hernández-Stefanoni, J. L., Aguilar-Espinosa, M., Rivera-Madrid, R., Ortiz, R., & Quiros, C. F. (2008). Assessing morphological and genetic variation in annatto (*Bixa orellana* L.) by sequence-related amplified polymorphism and cluster analysis. *HortScience*, 43(7), 2013-2017.
- Vallabhaneni, R., Bradbury, L. M., & Wurtzel, E. T. (2010). The carotenoid dioxygenase gene family in maize, sorghum, and rice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 504(1), 104-111. Doi: 10.1016/j.abb.2010.07.019.
- Venugopalan A, Giridhar P, & Ravishankar A (2011). Food, ethanobotanical and diversified applications of *Bixa orellana* L.: a scope for its improvement through biotechnological mediation. *Ind J Fund Appl Life Sci* 1:9–31.
- Vilar, D. D. A., Vilar, M. S. D. A., Moura, T. F. A. D. L., Raffin, F. N., Oliveira, M. R. D., Franco, C. F. D. O., & Barbosa-Filho, J. M. (2014). Traditional uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa orellana* L.: a review. *The Scientific World Journal*, 2014. Doi: 10.1155/2014/857292.
- Vishnevetsky, M., Ovadis, M., & Vainstein, A. (1999). Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends in Plant Science*, 4(6), 232-235.

Doi: 10.1016/S1360-1385(99)01414-4.

Vogel, J. T., Tan, B. C., McCarty, D. R., & Klee, H. J. (2008). The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions. *Journal of Biological Chemistry*, 283(17), 11364-11373. Doi: 10.1074/jbc.M710106200.

Von Lintig, J., & Vogt, K. (2004). Vitamin A formation in animals: molecular identification and functional characterization of carotene cleaving enzymes. *The Journal of Nutrition*, 134(1), 251S-256S. Doi: 10.1093/jn/134.1.251S.

Walter M.H. & Strack Dieter (2011) Carotenoids and their cleavage products: Biosynthesis and functions. *Natural Product Reports*. 28(4), 663-692. Doi: 10.1039/c0np00036a.

Welsch, R., Wüst, F., Bär, C., Al-Babili, S., & 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(1), 367-380. Doi: 10.1104/pp.108.117028.

Withers, S. T., & Keasling, J. D. (2007). Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(5), 980-990. Doi: 10.1007/s00253-006-0593-1.

Yamamizo, C., Kishimoto, S., & Ohmiya, A. (2010). Carotenoid composition and carotenogenic gene expression during *Ipomoea* petal development. *Journal of Experimental Botany*, 61(3), 709-719. Doi: 10.1093/jxb/erp335.

Ye, X., Al-Babili, S., Kloti, A., Zhang, J., Lucca, P., Bayer, P. & Potrykus, I. (2000) Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*. 287: 303-305. Doi: 10.1126/science.287.5451.303.

Ytterberg, A. J., Peltier, J. B., & Van Wijk, K. J. (2006). Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiology*, 140(3), 984-997. Doi:10.1104/pp.105.076083.984.

- Zarza-García A, Sauri-Duch E, Raddatz-Mota D, Cuevas-Glory LF, Pinzón-López LL, Rivera-Cabrera F, & Mendoza-Espinoza JA (2017). Pharmacological, phytochemical and morphological study of three Mayan accessions of *Bixa orellana* L. leaves. Emir J Food Agric 29:163–169. Doi: 10.9755/ejfa.2016-09-128.
- Zhang, L., Ma, G., Shirai, Y., Kato, M., Yamawaki, K., Ikoma, Y., & Matsumoto, H. (2012). Expression and functional analysis of two lycopene β -cyclases from citrus fruits. Planta, 236(4), 1315-1325. Doi: 10.1007/s00425-012-1690-2.
- Zhao, L., Chang, W. C., Xiao, Y., Liu, H. W., & Liu, P. (2013). Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. Annual review of biochemistry, 82, 497-530. Doi: 10.1146/annurev-biochem-052010-100934
- Zhu, C., Bai, C., Sanahuja, G., Yuan, D., Farré, G., Naqvi, S., Shi I., Capell t., & Christou, P. (2010). The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. Archives of Biochemistry and Biophysics, 504(1), 132-141. Doi: 10.1016/j.abb.2010.07.028.
- Zotyén QA. (2002). COMPENDIO. Cultivo del Achiote *Bixa orellana* L. división de Agro negocios, DGEA. Ministerio de Agricultura y Ganadería, El Salvador. 87pp.