



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR DE  
UNA COLECCIÓN DE ACHIOTE (*Bixa orellana* L.) EN  
YUCATÁN

Tesis que presenta

RODOLFO PECH HOIL

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2020



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 **Rodolfo Pech Hoil**, titulado "**Caracterización Genética y Molecular de una Colección de Achiote (*Bixa orellana* L.) en Yucatán**", fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en la línea de investigación Interacción Planta Ambiente, del laboratorio USF10 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, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,



---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 31 de Enero 2020.



## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

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



Nombre: Rodolfo Pech Hoil



Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado CONACYT No. 98508 "Análisis de genes clave asociados a la variación en la producción de pigmentos en cultivos de importancia comercial a nivel nacional e internacional", clave CONACYT No. 98508, y "Análisis del genoma y transcriptoma de achiote (*Bixa orellana*) para su mejoramiento genético y su exploración como alimento funcional", clave CONACYT No. 220259. Ambos bajo la dirección de la Dra. Renata Rivera Madrid.



## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT por la beca otorgada no. 406338 que me permitió realizar mis estudios de posgrado en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

Al CICY por permitirme formar parte del posgrado y por hacer uso de sus instalaciones.

A la Doctora Renata Rivera Madrid por aceptarme en su grupo de trabajo para desarrollar y financiar esta investigación dentro del proyecto CONACYT No. 98508 así como a su apoyo durante la dirección de mi tesis.

A los Doctores: Gregorio Godoy Hernández, Miriam Monserrat Ferrer Ortega, June Simpson Kilpatrick, Ruby Alejandra Valdez Ojeda, Nancy Santana Buzzy, Rosa Ma. Escobedo Gracia-Medrano, por formar parte de mi comité académico, así como las revisiones dedicadas a este manuscrito.

A los Doctores: Alba Adriana Vallejo Cardona por su apoyo en la observaciones y correcciones en el trabajo de investigación e Irán Andira Guzmán Méndez por su apoyo en el análisis oportuno de los datos.

A las Maestras en Ciencias Margarita Aguilar Espinosa y Katia Gil, así como a los Maestros Adolfo Antonio Guzmán y Luis Carlos Gutiérrez por compartir sus experiencias y enseñanzas y corrección en los procedimientos accidentados. Al Ingeniero Fernando Contreras por permitirme el uso de las instalaciones del invernadero.

A todos mis compañeros que formaron parte del grupo de la Dra Renata, gracias por su compañerismo, consejos y sobre todo permitirme conservar su amistad...Víctor Carballo, Claudiné Gallegos, Rosa Us Camas, Jonathan Dzid, Juana Hernández, Diana Sierra, Gabriela Vázquez, Fernanda Velueta, Corazón de Jesús Chí, Rocío Tamayo y los que se me olvidaron una disculpa y agradecimiento por apoyarme para la finalización de este trabajo.



## DEDICATORIAS

*Para mis padres, Ignacio Pech Tzab y María Elena Hoil Eb, que los admiro mucho, siempre me han enseñado excelentes valores unidos en familia, y quienes han sido la guía y el camino en todos los proyectos de vida alcanzados, que con su ejemplo, dedicación y palabras de aliento hicieron posible llegar a la conclusión de esta etapa...Gracias padres por su interminable paciencia, inagotables consejos e incondicional apoyo.*

*Para mis hermanos, Alberto, Rodrigo, Marco, Alejandro, que siempre me mostraron su apoyo y con sus palabras no tan sabias pero con mucho amor y luz.*

*Imprescindiblemente, a Geidy Meliza Ian y Rodolfito, con quienes formamos un hogar, me han brindado confianza y gratas enseñanzas, paciencia y apoyo durante este periodo, y principales protagonistas de vida en el futuro.*

*A mis compañeros y amigos, quienes, entre revueltas, de alguna manera directa o indirecta contribuyeron a la elaboración de este manuscrito.*

*...Gracias.*



---

---

## ÍNDICE

|                   |   |
|-------------------|---|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
|-------------------|---|

### CAPÍTULO I

#### ANTECEDENTES

|  |    |
|--|----|
| 1.1 GENERALIDADES DE LA ESPECIE.....   | 5  |
| 1.2 CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD FENOTÍPICA DEL ACHIOTE ( <i>BIXA ORELLANA L.</i> )..... | 18 |
| 1.3 CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL ACHIOTE .....                            | 23 |
| 1.4 SISTEMA APAREAMIENTO DEL ACHIOTE. ....   | 32 |
| PREGUNTAS A RESOLVER .....   | 37 |
| OBJETIVO GENERAL .....   | 37 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 37 |
| JUSTIFICACIÓN.....   | 37 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....   | 38 |

### CAPÍTULO II

#### CARACTERIZACIÓN MORFOAGRONÓMICA DE LA COLECCIÓN DEL ACHIOTE (*BIXA ORELLANA L.*).

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 2.1 INTRODUCCIÓN .....          | 39 |
| 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 40 |
| 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 45 |
| 2.4 CONCLUSIONES.....           | 57 |

### CAPÍTULO III

---

---

---

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| CARACTERIZACIÓN DE LA VARIACIÓN GENÉTICA DE LA COLECCIÓN DE ACHIOTE ( <i>BIXA ORELLANA</i> L.) EN YUCATÁN.         |                               |
| 3.1 INTRODUCCIÓN .....   | 59                            |
| 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 60                            |
| 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....   | 65                            |
| 3.4 CONCLUSIONES.....  | 82                            |
| <b>CAPÍTULO IV</b>   |                               |
| CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL SISTEMA DE APAREAMIENTO DEL ACHIOTE ( <i>BIXA ORELLANA</i> L.) EN SISTEMAS AGRÍCOLAS. |                               |
| 4.1 INTRODUCCIÓN .....   | 83                            |
| 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 84                            |
| 4.3 RESULTADOS .....   | 88                            |
| 4.4 DISCUSIÓN .....  | 90                            |
| 4.5 CONCLUSIÓN .....   | 94                            |
| <b>CAPÍTULO V</b>  |                               |
| CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS  |                               |
| 5.1 CONCLUSIONES.....  | 95                            |
| 5.2 PERSPECTIVAS.....  | ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO. |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>100</b>                    |
| <b>Anexo .....</b>   | <b>121</b>                    |

---

---

## LISTADO DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1.1 Planta en producción de <i>Bixa orellana</i> L. en Yucatán. ....   | 6  |
| Figura 1.2 Caracteres reproductivos de <i>Bixa orellana</i> L. (tomado de Joseph et al., 2012). 7   |    |
| Figura 1.3 Morfología de la flor y el fruto en <i>B. orellana</i> . ....  | 8  |
| Figura 1.4 Semilla de <i>Bixa orellana</i> L.....   | 9  |
| Figura 1.5 Esquema general de biosíntesis de los terpenoides y compartimentación en plantas. Tomado de Bouvier <i>et al.</i> (2005).....                      | 10 |
| Figura 1.6 Esquema propuesto para la biosíntesis de bixina (modificado de Carballo-Uicab <i>et al.</i> , 2019).....   | 11 |
| Figura 1.7 Distribución geográfica de <i>Bixa orellana</i> (discoverlife.org/global mapper.bixa.orellana, 2013). ....   | 13 |
| Figura 1.8 Distribución de <i>Bixa orellana</i> L., en la Península de Yucatán.....   | 14 |
| Figura 1.9 Estrategia experimental. ....  | 38 |
| Figura 2.1 Características del fenotipo en variantes de achiote. ....   | 42 |
| Figura 2.2 Diferencias morfológicas entre las variables cualitativas dentro de los grupos obtenidos de la colección de achiote.....                           | 46 |
| Figura 2.3 Diferencias en las características morfológicas cuantitativas entre las agrupaciones de la colección de achiote.....                               | 49 |
| Figura 2.4 Gráfico de los componentes principales I y II (PC1, PC2) basado en características morfológicas de color de flor de 58 accesiones de achiote.....  | 52 |
| Figura 2.5 Gráfico de los componentes principales I y IV (PC1, PC4) basado en características morfológicas de color de fruto de 58 accesiones de achiote..... | 53 |

---

---

---

|  |    |
|--|----|
| Figura 2.6 Accesiones jerarquizadas a partir de la matriz de las distancias Euclidianas por el método de Ward.....   | 57 |
| Figura 3.1 Grupos o morfotipos del achiote. ....   | 60 |
| Figura 3.2 DNA genómico y fragmentos amplificados de regiones SSR. ....  | 66 |
| Figura 3.3 Patrones de segregación de 23 loci SSR en la colección de achiote .....   | 67 |
| Figura 3.4 Análisis de coordenadas principales (PCoA). Grafica basada en los valores del índice de Fst por pares entre poblaciones.....  | 74 |
| Figura 3.5 Árbol de unión de vecino cercano (NJ) de 58 accesiones de achiote (coloreadas por fenotipo de flor), construidas con la distancia de Kosman en base a 23 loci SSR. .... | 77 |
| Figura 3.6 Análisis de coordenadas principales de la dispersión de los 58 accesiones de achiote evaluado con 23 marcadores de SSR.....   | 78 |
| Figura 3.7 Estructura demográfica estimada de 58 accesiones de achiote. ....   | 79 |
| Figura 3.8 Modelación del número de grupos genéticos usando el software STRUCTURE. Delta K, calculada de acuerdo con Evanno et al. (2005). ....                                    | 79 |
| Figura 3.9 Heterocigosidad de la <i>Boβ-LCY1</i> en diez accesiones de achiote.....  | 80 |
| Figura 3.10 Variación en el contenido de bixina en la colección de achiote. ....   | 81 |
| Figura 4.1 Sitios de recolección de achiote ( <i>Bixa orellana</i> L.) en el estado de Yucatán, México. ....   | 85 |
| Figura 4.2 Variación morfológica en flor y fruto del achiote .....   | 86 |
| Figura 4.3 Fragmentos de la combinación del marcador Em1 <sub>IRD700</sub> Odd21 SRAP.....   | 88 |

---

---

## LISTADO DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 2.1 Descriptores agronómicos propuestos para achiotte ( <i>Bixa orellana</i> L.) .....  | 41 |
| Tabla 2.2 Porcentaje de incidencia interespecífica de caracteres cualitativos.....  | 44 |
| Tabla 2.3 Estadísticos simples aplicados en variables cuantitativas. ....   | 44 |
| Tabla 2.4 Valores propios de la matriz de correlación de componentes principales.....   | 50 |
| Tabla 2.5 Coeficientes o cargas de los cuatro primeros factores o componentes principales (PC1, PC2, PC3 y PC4) de la matriz de correlación de las variables morfológicas. .... | 51 |
| Tabla 2.6 Estadísticos de correlación de Spearman de características morfológicas de achiotte .....   | 55 |
| Tabla 3.1 Loci microsatélites SSR de achiotte. Temperatura de alineamiento (Ta) en touchdown (TD).....  | 63 |
| Tabla 3.2 Riqueza alélica de 23 loci SSR en la colección de achiotte.....   | 69 |
| Tabla 3.3 Resumen de la diversidad genética en la colección de achiotte .....   | 70 |
| Tabla 3.4 Estadística de índice de fijación (F) obtenidos para cada uno de los 23 loci SSR en la colección de achiotte. ....  | 72 |
| Tabla 3.5 Parámetros de diversidad genética en grupos a partir del origen de la colecta del achiotte. ....  | 73 |
| Tabla 3.6 Multilocus estimado de Fst por pares (abajo) y valores de P Fst (arriba) de 23 loci SSR a partir del origen de la colecta del achiotte .....                          | 74 |
| Tabla 3.7 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) realizado para 23 loci SSR de la colección de achiotte.....  | 75 |
| Tabla 3.8 Lista de alelos privados por origen de la colecta de achiotte.....  | 75 |

---

---

---

|  |    |
|--|----|
| Tabla 4.1 Combinaciones de cebadores y secuencias de cebadores SRAP.....   | 87 |
| Tabla 4.2 Parámetros estimados del sistema de apareamiento de <i>Bixa orellana</i> en tres sistemas agrícolas diferentes con marcador SRAP .....                         | 89 |
| Tabla 4.3 Parámetros estimados del sistema de apareamiento de <i>Bixa orellana</i> para dos fenotipos sometidos a tres sistemas agrícolas diferentes con marcador SRAP.. | 90 |

---

## ABREVIATURAS

|                 |  |
|-----------------|--|
| AFLP            | amplificación de fragmentos de longitud polimórfica    |
| Bob-LCY1        | $\beta$ -licopeno ciclasa de <i>Bixa orellana</i>      |
| BoBADH          | bixina aldehído-deshidrogenasa de <i>Bixa orellana</i> |
| BoLCD           | licopeno dioxigenasa de <i>Bixa orellana</i>           |
| BonBMT          | norbixina metil transferasa de <i>Bixa orellana</i>    |
| CCD             | carotenoides dioxigenasas                              |
| cm              | centímetro   |
| cM              | centimorgan  |
| COX             | ciclooxigenasas  |
| DMAPP           | dimetil-alil difosfato                                 |
| DNA             | ácido desoxirribonucleico                              |
| DPPH            | 2,2-difenil-1-picril hidrazilo                         |
| $\epsilon$ -LCY | $\epsilon$ - licopeno ciclasa                          |
| FPP             | farnesil pirofosfato                                   |
| GC/MS           | cromatografía de gases/ espectrometría de masa         |
| GGPP            | Geranil-geranil difosfato                              |
| GPP             | geranil pirofosfato                                    |
| HCA             | agrupamiento jerárquico                                |
| HMG CoA         | 3-hidroxi-3-metil-glutarilCoA                          |

---

---

---

|       |  |
|-------|--|
| HVRs  | regiones hipervariables                  |
| IC50  | media concentración máxima inhibitoria   |
| IPP   | isopentenil pirofosfato                  |
| ISSR  | secuencia repetida inter simples         |
| MAS   | selección asistida por marcadores        |
| µg/mL | microgramo por mililitro                 |
| µm    | micrómetro                               |
| mm    | milímetro                                |
| mQTL  | rasgos cuantitativos metabólicos         |
| MTBE  | éter metil terbutílico                   |
| MVA   | mevalonato                               |
| ng/µL | nanogramo por microlitro                 |
| pb    | pares de bases                           |
| PCA   | análisis componentes principales         |
| PCR   | reacción en cadena de la polimerasa      |
| PE    | éter de petróleo                         |
| pg/µL | picogramo/microlitro                     |
| PSY   | fitoeno sintetasa                        |
| RAPD  | amplificación polimórfica al azar de DNA |
| SNP   | polimorfismos en único nucleótido        |

---

|      |   |
|------|---|
| SRAP | polimorfismo amplificado de secuencia relacionada |
| SSR  | repetición de secuencias simples                  |
| STRs | polimorfismos de repeticiones cortas en tándem    |
| TAE  | tris-acetato-EDTA                                 |
| TBE  | tris-borato-EDTA                                  |

---



---

## RESUMEN

*Bixa orellana* es una planta tropical utilizada por sus pigmentos naturales presentes en las semillas y es la única especie cultivada de la familia Bixaceae que se conoce como achiote en México. Sin embargo, el cultivo dentro de la especie presenta grandes variaciones morfológicas y variaciones en el contenido de pigmento entre diferentes sistemas de cultivo tradicionales: traspatio (solar) y policultivo. Nuestro objetivo principal fue, por lo tanto, analizar la variabilidad dentro de los diferentes sistemas de cultivo. Los rasgos agronómicos y genéticos se utilizaron para identificar material genético de importancia agronómica que está molecularmente asociado con polimorfismos de regiones de microsatélites para desarrollar un procedimiento de selección más adecuado en la especie. El análisis de componentes principales (PCA) y el análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) fueron las herramientas multivariadas utilizadas para obtener las diferentes variables morfo genéticas y moleculares. Llegamos a la conclusión de que el análisis combinado de los rasgos morfo genéticos y moleculares representa el enfoque óptimo para caracterizar y evaluar la variabilidad y correlacionarlo con los rasgos agronómicos que permiten obtener plantas de élite que sirven como base genética para el estudio de la síntesis de bixina, el principal compuesto comercial, cuya ruta sigue siendo estudiada, así como la base para la mejora genética que se llevará a cabo en el compuesto o rasgo que se busca para las plantas de élite y las que son útiles para generar variedades agronómicas comerciales.

---



---

## ABSTRACT

*Bixa orellana* is a tropical plant used for its natural pigments present in the seeds and it is the only cultivated species of the family Bixaceae that known as achiote in México. Nevertheless, the culture and breeding within the species present large morphological variations and variations in pigment content between different traditional culture systems: backyard and polyculture. Our principal aim was therefore to analyze variability within the different cultivation systems. Agronomic and genetic traits were used to identify genetic material of agronomic importance that is molecularly associated with polymorphisms of microsatellite regions in order to develop a more adequate selection procedure in the species. Principal components analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were the multivariate tools used to obtain the different morphogenetic and molecular variables. We concluded that the combined analysis of morphogenetic and molecular traits represents the optimal approach for characterizing and evaluating variability and correlating it with agronomic traits that allow obtain elite plants that serve as a genetic basis for the study of bixin synthesis, the main commercial compound, whose route is still studied, as well as base to genetic improvement to be carried out on the compound or trait that it is sought to elite plants and those that are useful for generating commercial agronomic varieties.

---



## INTRODUCCIÓN

El achiote (*Bixa orellana* L.) es una planta tropical caracterizada por la producción del agente pigmentante conocido como bixina. Este pigmento se acumula principalmente en el arilo resinoso de las semillas maduras (Arce, 1999). Este colorante es de gran demanda a nivel mundial para darle color a muchos productos alimentarios, cosmética, textil y farmacéutica; así como su empleo en medicina y salud (Russell *et al.*, 2005; Júnior *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2006; Rather y Mohammad, 2016). Uno de los pocos aceptados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) por su nula toxicidad, inocuidad y por no alterar los alimentos ('food values'). A la fecha, su uso es estimulado debido a la prohibición del empleo de colorantes sintéticos, por lo que el 70% de todos los colorantes naturales consumidos en todo el mundo se derivan del achiote (De Marco *et al.*, 2013; Vilar *et al.*, 2014). Por lo tanto, esta planta es considerada una fuente importante del colorante natural bixina, aunado a este compuesto presenta otros componentes químicos bio-activos que se han empleado como fuente potencial terapéutica (Kumar y Periyasamy, 2016).

Lo anterior ha motivado el desarrollo de estrategias para obtener el mayor aprovechamiento de los metabolitos que son sintetizados por el achiote y que su producción depende del tipo de variante (Sharon y D'Souza, 2000; Rivera-Madrid *et al.*, 2006; Parimalan *et al.*, 2007; Joseph y Siril, 2014). Así, varios métodos para evaluar la variación genética son implementados debido a la heterogeneidad de sus formas botánicas, producción en sus pigmentos y variabilidad de sus rendimientos bixina, principalmente y también en otros tipos de compuestos de interés (Medina *et al.*, 2001; Valdez-Ojeda *et al.*, 2008; Akshatha *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2017; Dequigiovanni *et al.*, 2018a).

En este sentido, evaluaciones de la variabilidad morfológica han mostrado caracteres asociados. Estas asociaciones han facilitado la identificación de las características morfológicas con base a la producción de bixina, y ha permitido la determinación de caracteres de rendimiento o agronómicos (Medina *et al.*, 2001; Rivera-Madrid *et al.*, 2006; Valdez-Ojeda *et al.*, 2008; Akshatha *et al.*, 2011). La caracterización actual abarca accesiones locales de Yucatán, donde la diversidad genética permanece desconocida y/o limitada con fines de mejoramiento y conservación del achiote (Pinzón *et al.*, 2008). En el

## INTRODUCCIÓN

presente trabajo se determinó la variabilidad con base a las características de interés agronómico, y la identificación de parentales potenciales para producir una recombinación de caracteres deseadas orientadas a generar variedades agronómicas mejoradas.

Tecnologías basadas en la reacción de cadena de la polimerasa (PCR), han derivado en técnicas y generación de marcadores a nivel de DNA, y han demostrado ser herramientas útiles en los estudios de la variación genética y plataforma en el manejo de los recursos fitogenéticos (Sajib *et al.*, 2012). La repetición de secuencia simple (SSR, por sus siglas en inglés) ha sido una herramienta importante para identificación de la variación genética del germoplasma (Khatab *et al.*, 2016). Alta resolución y rapidez, expresión co-dominante, rico polimorfismo, neutrales y estables, el marcador SSR ha sido aplicado en estudios de mapas genéticos (Romero-López *et al.*, 2019) y de diversidad genética en poblaciones naturales y de germoplasma (Dequigiovanni *et al.*, 2018; Dequigiovanni *et al.*, 2017). Dequigiovanni y colaboradores (2014) identificaron motivos SSR de di, tri- y tetranucleótidos, de los cuales, 10 loci SSR, y posteriormente, adicionales 12 loci SSR (Dequigiovanni *et al.*, 2018a) presentaron alto polimorfismo y empleados para estudios de diversidad y estructura genética entre genotipos cultivados y silvestres de la amazonia brasileña. Lo anterior, hace indispensable analizar la variación genética por dicho sistema de marcación en genotipos de México. Los grupos genéticos obtenidos del presente trabajo, muestran estrecha base genética de los cultivares de achiote, y genéticamente relacionadas entre ellas, resultado similar previamente descrito por Valdez-Ojeda *et al.* (2008). Con esta información, abre la posibilidad para usar procedimientos de selección más precisa y adecuada de los genotipos con mayor potencial a futuros programas de mejoramiento genético.

El papel crucial en la composición genética de plantas que determina la frecuencia de los genotipos, y por lo tanto, también determina la variación de fenotipos es el sistema de apareamiento; y su conocimiento es esencial para un adecuado programa de mejoramiento (Ferreira *et al.*, 2000). Sin embargo, cambios genéticos del sistema del apareamiento ha caracterizado a las plantas que se cultivan en formas más sistematizadas y altamente controladas (Dempewolf *et al.*, 2012). Marcadores genéticos moleculares del Polimorfismo Amplificado de Secuencia Relacionada, SRAP por sus siglas en inglés (Li y Quirós, 2001), han mostrado alto polimorfismo (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008) y adecuado para estimaciones cuantitativas del sistema de apareamiento mediado por métodos de simulación (Valdez-

Ojeda *et al.*, 2010). Estudios previos, por Valdez-Ojeda y colaboradores (2010) han demostrado que esta especie posee un sistema predominantemente al entrecruzamiento, resultado confirmado por estudios de polinización artificial (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Sin embargo, datos del comportamiento de dicho sistema entre las diversas formas de cultivo a la que se encuentra sometida aún permanece desconocida. Con el uso de los marcadores SRAP y su capacidad para identificar la variabilidad genética en *B. orellana*, en el presente trabajo, se obtuvieron estimaciones del sistema de apareamiento en tres sistemas de cultivo del achiote en Yucatán (solar, milpa y monocultivo), cuyo resultado se demostró que el achiote presenta de un sistema entrecruzamiento predominante en la milpa, a un sistema mixto en el monocultivo y solar.

Finalmente, las aportaciones alcanzadas del presente trabajo contribuye a la adición de herramientas para identificar genotipos de forma más precisa y objetiva, que permite la organización del material genético y la selección adecuada de los genotipos parentales para el desarrollo de una población seleccionada para diferentes usos, y que, contenga la combinación de caracteres de interés comercial que permita llevar a cabo su mejora genética en el compuesto o carácter que se desee optimizar así como útiles para generar variedades comerciales.



## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1 Generalidades de la especie

##### 1.1.1 *Bixa orellana* L.

El nombre taxonómico binomial *Bixa orellana* corresponde a *Bixa*, proveniente de su latinización del portugués *Bixa*; y *orellana*, nombrado en honor del conquistador español Francisco de Orellana (Silva *et al.*, 2010). En lengua maya, se le nombra *k'uxub* (Quintana Roo) o *ka'an ku-xuub* (Yucatán) (Correa-Navarro, 1995).

La principal referencia de su comercialización son sus semillas; las cuales, se caracterizan por poseer diversos fito-constituyentes. Entre los más importantes, se incluyen a los carotenoides, apocarotenoides, esteroides, compuestos alifáticos, terpenos, y aceites volátiles, distribuidos en toda la planta (Mercante *et al.*, 1999; Pino y Correa, 2003; Yong *et al.*, 2013). Estos fitoquímicos presentan una amplia gama de actividades farmacológicas que incluyen actividades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerosas, motilidad gastrointestinal mejorada, neurofarmacológicas, anticonvulsivantes, analgésicas y antidiarreicas (Agner *et al.*, 2005; Ulbricht *et al.*, 2012; Venugopalan y Giridhar, 2012; Stohs, 2014; Vilar *et al.*, 2014; de Oliveira Júnior *et al.*, 2019).

A pesar del valor antropocéntrico, los principales problemas de esta especie reside en la alta variabilidad tanto en las formas botánicas como en los rendimientos de sus metabolitos lo que la hace objeto de estudio para identificar los materiales más prometedores en cuanto a sus características agronómicas de interés como son mayores rendimientos de bixina, geraniol, escualeno, entre otros (Valdez-Ojeda, 2008; Leal y De Clavijo, 2010; Lombello y Pinto-Maglio, 2014; Kumar y Periyasamy, 2016). Así también lograr una reproducción dirigida de morfotipos seleccionados (Joseph *et al.*, 2012), procesos de selección clonal o conservación mediante acodos (D'Souza y Sharon, 2000; Correa-Navarro, 1995); todo esto con miras a lograr un cultivo homogéneo que asegure una buena producción principalmente de bixina. Sin embargo hay que mencionar que la alta heterocigosidad ofrece mayores probabilidades de existencia a los distintos ambientes del trópico para facilitar su adaptación a diversos tipos de suelo, resistentes a la sequía (da

Silva *et al.*, 2018). Así, lo importante es poder combinar la mayor producción y mejor adaptación a las condiciones de la región.

### 1.1.2 Descripción botánica

La familia Bixaceae está representada por cinco especies del género *Bixa* (*Bixa orellana* L., *B. arborea*, *B. excelsa*, *B. platycarpa* y *B. urucurana*). Ambrósio-Moreira y colaboradores (2015) diferencian especies de pequeños frutos con escasas espinas en la base de ésta descrita como *B. platycarpa*; similar a esta, *B. urucurana*, presenta pequeños frutos esféricos con espinas de base ancha, distribuidas desde Brasil a Nicaragua. Sin embargo, *B. orellana* se caracteriza por sus frutos de mayor tamaño con abundante espinas; lo que la hace la más importante del género y única que se cultiva (Dequigiovanni *et al.*, 2018; fig 1.1).



Figura 1.1 Planta en producción de *Bixa orellana* L. en Yucatán.

*Bixa orellana* es considerada una planta arbustiva perenne, que mide entre 3 y 7 metros de altura, aunque se han encontrado hasta de 10m. Posee una raíz pivotante y larga, copa baja y extendida. El tallo es pardo, ramifica a poca altura del suelo. La madera es blanca y suave. Las hojas son simples, alternas enteras, en haz membranoso, verde oscuro, ovado con bordes dentados, el envés algo plateado cuando maduros, de 10-25 cm de largo y unos 10-20 cm de ancho, con bases redondeadas, cordadas, de largos pecíolos, delgados, de 3-8 (-10) cm de largo, engrosado en los extremos (Leal y Michelangeli de Clavijo, 2010).

Las flores son grandes, vistosas, hermafroditas, regulares y actinomorfas, con un cáliz compuesto de cinco sépalos de unos 8-10 mm de largo, y con una corola también

compuesta de cinco pétalos que van desde blancas a distintas tonalidades rosas, de unos 25 mm de largo y unos 12 mm de ancho (fig. 1.3 a y b). El androceo es polistémono con un número variable de estambres (300-400, fig. 1.3 a) con filamentos entre 10 y 12 mm de ancho, anteras blancas a violáceas, que completamente se doblan adquiriendo una forma de "u" o de herradura. Las anteras constan de 4 lóculos. La dehiscencia de la antera es apical (morfológicamente lateral; fig. 1.2 b) y poricida, dispersa granos de polen pulverulento, de  $1\mu\text{m}$  de largo por  $0.7\mu\text{m}$  de ancho (fig. 1.2 d). Los grupos de polen son tectados, tricolpados, triaperturados (triporados), redondeados. Por otra parte, el gineceo es bicarpelar, el cual desarrolla un ginóforo a medida que madura, es relativamente largo (regularmente de unos 15 mm de largo), que se expande hasta el estigma, y generalmente se encuentra doblado sobre los estambres (fig. 1.2 a). El estigma es bilabiado (fig. 1.2 c) de superficie externa lisa, y con canales secretores de látex y mucílago en sus paredes internas. En cuanto al ovario es súpero semi-ovalado multiovulado de placentación parietal donde se fijan los óvulos. Estos últimos, son ortótopos en las primeras etapas ontogenéticas y se curvan durante el desarrollo hasta alcanzar una posición cercana a la anátropa en la época de la antesis (Rivera y Flores, 1988; Vallejo, 1991; Leal y Michelangeli, 2010).

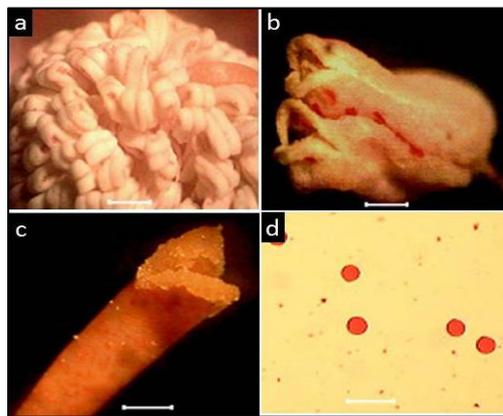


Figura 1.2 Caracteres reproductivos de *Bixa orellana* L. (a) Disposición de las anteras y el estigma en el botón floral (bar 0,12 cm). (b) Anteras dehiscentes (bar 0,03 cm). (c) apertura del lóbulo estigmático receptivo (bar 0,05 cm). (d) micrografía del polen en tinción de acetocarmina (bar  $156\mu\text{m}$ ) (tomado de Joseph et al., 2012).

El fruto presenta dos valvas (tres en algunos casos), las cuales son de simetría bilateral con una placenta adherida a las paredes de las valvas, que a través de pedúnculos sostienen

a las semillas (Hernández *et al.*, 1988). El fruto es una cápsula de 2 a 6 cm de largo, presenta espinosidad, algunas más que otras, de color verdosa oscura a morada (según variantes) (fig. 1.3 c y d). También presentan dehiscencia del fruto o fruto abierto (fig. 1.3 f; aunque pueden encontrarse variantes indehiscentes o frutos cerrados). Al madurar el fruto toma un color pardo rojizo oscuro (Leal y Michelangeli de Clavijo, 2010), donde en cada una de las valvas se encuentran las semillas.



Figura 1.3 Morfología de la flor y el fruto en *B. orellana*. (a) planta con flor blanca; (b) planta con flor rosa; (c) fruto inmaduro verde; (d) fruto inmaduro rojo; (f) dehiscencia del fruto maduro.

Las semillas son de forma cónica u ovalada plana casi triangular, que miden de 3 a 5 mm de largo (fig. 1.4 b), y en número son muy variables por fruto, entre 28 a 46 semillas (en relación con el tamaño capsular; Akshatha *et al.*, 2015; fig. 1.4 a). En cada semilla, presentan una capa externa de tegumento membranoso, y bajo de ésta, conserva una zona de parénquima acuoso que contiene una sustancia viscosa rojiza intensa, cuya sustancia principal de naturaleza apocarotenode de alto valor comercial se denomina bixina (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008; fig. 1.4 c y d). La presencia de otros compuestos como esteroides, aceites esenciales y de origen terpenoide, ha generado interés hacia su comercio (Raddatz-Mota *et al.*, 2017; Kumar y Periyasamy, 2016; Yong *et al.*, 2013).

### 1.1.3 Compuestos químicos de *B. orellana*.

La bixina es la principal sustancia pigmentante de color rojo-naranja acumulada en la capa externa de semillas de *Bixa orellana* (fig. 1.4 d). El contenido acumulado de bixina en

semillas maduras es muy variable, valores reportados van desde 0.5 a 2.6 g/100 g de peso seco (Akshatha *et al.*, 2015; Valdez-Ojeda *et al.*, 2008; Rivera-Madrid *et al.*, 2006). La fórmula química de la bixina es  $C_{25}H_{30}O_4$ , presenta un grupo carboxílico libre y otro esterificado, los cuales le confieren funciones como ácido orgánico (Rivera-Madrid *et al.*, 2016). Derivado de la bixina, la norbixina ( $C_{24}H_{28}O_4$ ) representa la forma más estable y utilizada para fines comerciales (Venugopalan *et al.*, 2011). Estos compuestos son considerados responsables de colores rojo, naranja y amarillo observado en las flores, frutas y hojas de las plantas e implicados en la foto-protección de cloroplastos (Trujillo-Hdez *et al.*, 2016).

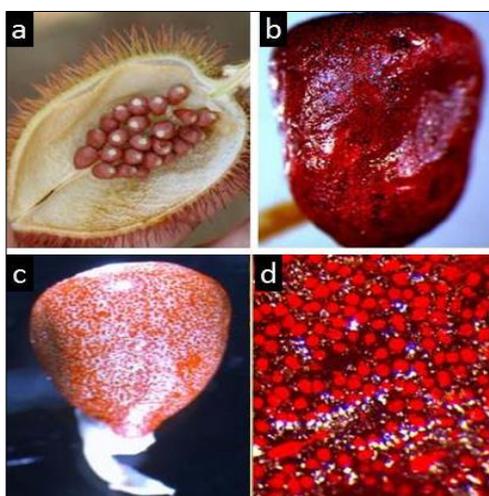


Figura 1.4 Semilla de *Bixa orellana* L. (a) Fruto inmaduro; (b) Semilla madura; (c) Semilla inmadura; (d) Micrografía de la cubierta de la semilla inmadura. (Foto: Aguilar-Espinosa M.)

El geranilgeraniol es un diterpeno de alcohol que representa el 1% de las semillas secas de *B. orellana* (Vilar *et al.*, 2014). Compuesto apreciado ya que es considerado precursor de las vitaminas E y K, además de desempeñar un papel importante en varios procesos biológicos (Nagasampagi *et al.*, 1967; Vik *et al.*, 2007). Otros compuestos de origen carotenoide presente en las semillas se encuentran en cantidades reducidas, tales como  $\beta$ -caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina y metil-bixina que confieren actividad antioxidante (Tirimana, 1981; Mercadante *et al.*, 1997). Entre ellos El tocotrienol es un fenol de actividad similar (Mohamad *et al.*, 2018). Otros compuestos son los esteroides vegetales, de los cuales, el  $\beta$ -sitosterol es el más abundante en plantas y referida con actividad hipocolesterolémico (Chen *et al.*, 2008). Así como el precursor de estos, el escualeno

(Stuchlík y Zak, 2002), con actividad antioxidante, y propuesta para tratamientos contra el cáncer (Arias *et al.*, 2011) y efecto benéfico en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Ronco *et al.*, 2009) son metabolitos de interés humano que promueven el valor comercial de esta especie.

### 1.1.4 Biosíntesis de los compuestos químicos de *B. orellana*.

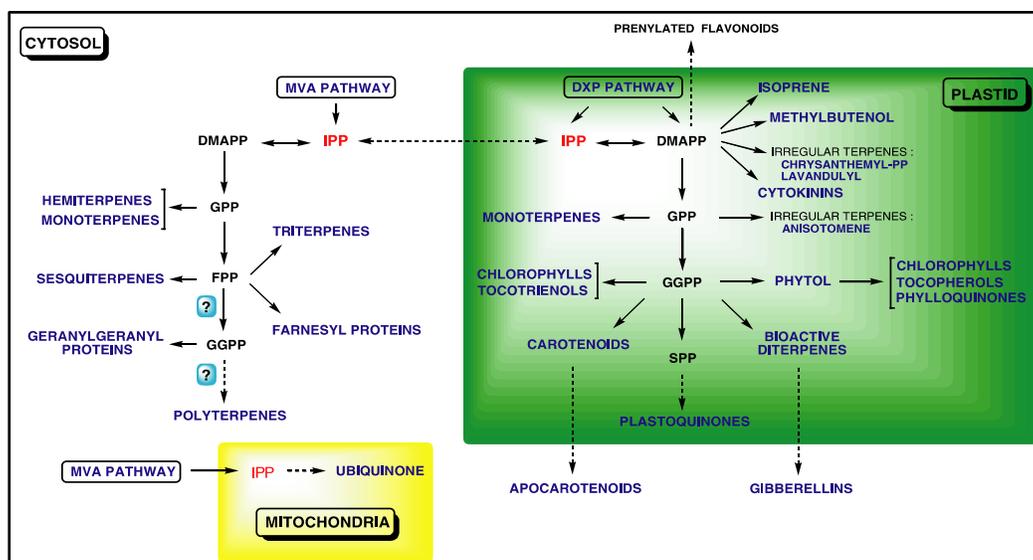


Figura 1.5 Esquema general de biosíntesis de los terpenoides y compartimentación en plantas. Abreviaturas. DMAPP, dimetilalildifosfato; DXP, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato; FPP, farnesil difosfato; GGPP, geranylgeranyl difosfato; GPP, geranyl difosfato; IPP, isopentenil difosfato; MVA, mevalonato; y SPP, solanesilo difosfato. Tomado de Bouvier *et al.* (2005).

La mayor parte de estos metabolitos secundarios se sintetiza por la ruta del ácido mevalónico que da lugar a terpenoides (Villar del Fresno, 1999; fig 1.5). Esta vía sintetiza precursores isopentenil pirofosfato (IPP) y dimetil-alil difosfato (DMAPP). Estos mismos precursores son sintetizados por la vía alterna del 2C-metil-D-eritrol 4-fosfato (MEP) en plastidios (Hunter, 2007). Reacciones de sintetasas y ciclasas se produce el geranyl geranyl pirofosfato (GGPP; Fig. 1.5), un intermediario que derivan hacia los demás compuestos isoprenoides (Block, 1980; Bouvier *et al.*, 2003). En los plastidios, la síntesis de carotenoides, inicia con el precursor IPP transformado en licopeno, precursor del  $\alpha$ -caroteno o  $\beta$ -caroteno, y éstos precursores para la producción de carotenoides adicionales (Nisar *et al.*, 2015), tales como  $\beta$ -caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina presentes en la especie (Tirimanna, 1981). De mismo similar, la vía citosólica utiliza el IPP hacia una serie de

reacciones caracterizadas por el agregado sucesivo de grupos prenilo, las moléculas del grupo intermediario farnesil difosfato (FPP) son unidas y reducidas, resultando en la formación de escualeno, y metabolizado resultando en la eventual formación de esteroides, colesterol y sus metabolitos esteroideos (Ronco, 2009).

El grupo de los carotenoides poseen un sistema de dobles enlaces conjugados que se pueden escindir hacia la ruptura oxidativa que conduce a varios fragmentos clasificados como apocarotenoides. El modelo propuesto de Bouvier y col. (2003), establece que la escisión oxidativa puede ocurrir al azar a través de la foto-oxidación o co-oxidación de la lipoxigenasa, y también por ruptura enzimática a través de carotenoides dioxigenasas (CCDs) cuya partición enzimática del licopeno hacia la bixina (Rivera-Madrid *et al.*, 2016; fig 1.6). CCDs específicas han mostrado función y correlación a la bixina a partir de la expresión en sistemas heterólogos (Carballo-Uicab *et al.*, 2019), que confirman el modelo propuesto (fig. 1.6).

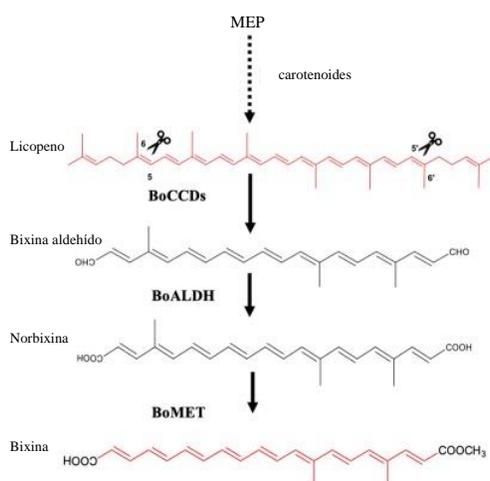


Figura 1.6 Esquema propuesto para la biosíntesis de bixina. *BoCCD*, *BoALDH*, *BoMET* representan dioxigenasas de corte de carotenoides, bixina aldehído deshidrogenasa, norbixina metiltransferasa, respectivamente (modificado de Carballo-Uicab *et al.*, 2019).

### 1.1.5 Propiedades biológicas y farmacológicas promisorias.

Las diversas actividades provienen de mezclas o compuestos puros. Compuestos importantes son la bixina, norbixina, geranilgeraniol, escualeno, y esteroides ( $\beta$ -sitosterol), como precursores de valor comercial debido a sus aplicaciones y alternativas para el futuro.

Los diversos compuestos de *Bixa orellana* muestran una amplia gama de actividades biológicas. Presentan actividad antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, motilidad gastrointestinal mejorada, actividades neurofarmacológicas, anticonvulsivas, analgésicas y antidiarreicas (Aher y Bairagi, 2012; Rather y Mohammad, 2016).

Por ejemplo, la bixina, presenta inhibición en las enzimas ciclooxigenasas (Melgar *et al.* 2013) y efecto protector reduciendo daños cromosómicos (Silva *et al.*, 2001). La norbixina, mostró actividad contra el estrés oxidativo y actividad mutagénica de inhibición por peróxidos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Júnior *et al.*, 2005). Y más tarde, determinada en pruebas 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Shilpi *et al.*, 2006).

El efecto hipocolesterolémico del escualeno ha sido considerado para el tratamiento contra el cáncer (Smith, 2000; Arias *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013), y utilizada en tratamientos del esteatosis hepática como destoxicante de xenobióticos (Kamimura *et al.*, 1992). Por otra parte, una dieta con suplemento de componentes esterílicos (tocoferoles, incluyendo al β-Sitosterol) en aves, demostraron la reducción de los niveles de colesterol en huevos (Chen *et al.*, 2008; Mcgonigle *et al.*, 2002). Estos compuestos, muestran actividad antiofídica de varias especies de serpientes (*Lachesis muta*, *Crotalus durissus cumanensis*, y *Micrurus mipartitus*) (Núñez *et al.*, 2004).

El geranilgeraniol, junto a Ishwarane mostraron actividad potencial contra la leishmaniasis (Monzote *et al.*, 2014). Otros efectos son antibacterianos, como inhibidor de *Mycobacterium tuberculosis in vitro* (Vik *et al.*, 2007) y de amplio espectro (Fleischer *et al.*, 2003; Selvi *et al.*, 2011). Kumar y Periyasamy (2016) demostraron su potencial anticancerígena, una mezcla de componentes (trans-geranilgeraniol, el escualeno y β-sitosterol) obtenida de semillas presentaron inducción de apoptosis en líneas celulares de melanoma. Tibodeau *et al.* (2010), sugiere similar actividad de la cis-bixina, que induce citotoxicidad en una amplia variedad de líneas celulares tumorales.

No cabe duda del interés sobre *Bixa orellana* ha sido por su capacidad de tinte; sin embargo, su potencial terapéutico atribuido al estudio de componentes fito-químicos bioactivos podría contribuir a un valor agregado a la especie, que conlleve al estudio de los compuestos y partes activas de la planta cuyo objetivo es generar un mayor valor agregado y permita un

mejor aprovechamiento al comercializarlas como productos.

### 1.1.6 Origen y distribución

*Bixa orellana* es mejor conocida como achiote en México, considerada nativa del continente americano, probablemente de una región alta del Amazonas en el Brasil (Molau, 1983). Se limita a los trópicos sin heladas y normalmente requiere una precipitación anual de 1250 a 1500 mm (Rivera, 1967; Donkin, 1974; Cevallos, 1978; Arce, 1984). Se localizan entre las latitudes 25°N y 25°S, y prevalecen a altitudes entre 30-1200 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.). Toleran temperaturas entre los 24-45°C.

Actualmente, el cultivo de *Bixa orellana* ha sido consolidado y extendido su distribución en la mayoría de las regiones tropicales alrededor del mundo (fig. 1.5). Por lo que se distribuye desde el sureste de México, por toda Centroamérica, hasta el sur de Brasil y norte de Argentina, así como en varias islas del Caribe (Little y Dixon, 1969). En África y Asia, y en la región mediterránea de Europa, hasta la India, Filipinas e islas de Hawái, aunque su cultivo y mayor producción se concentra en América Latina y el Caribe (Leal y Michelangeli, 2010).

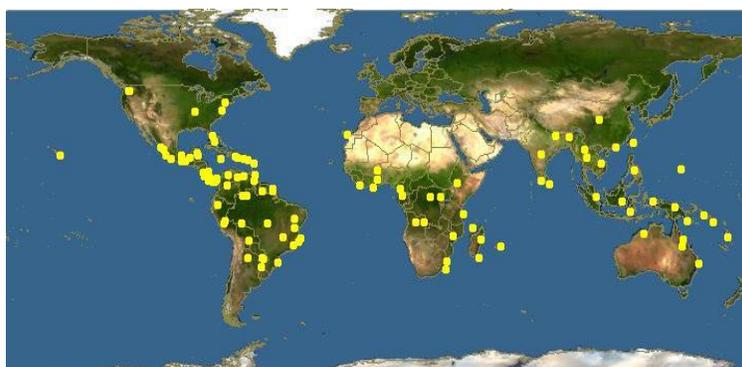


Figura 1.7 Distribución geográfica de *Bixa orellana* (discoverlife.org/global mapper.bixa.orellana, 2013).

En México, se distribuye principalmente en el sureste mexicano. Los tipos de vegetación donde se desarrolla son la selva tropical caducifolia, selva tropical sub-caducifolia y selva tropical perennifolia. Por lo que se pueden encontrar en los Estados de Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa Tabasco, Veracruz y Yucatán.

En Yucatán, se ha indicado principalmente al norte de la península yucateca (Fig. 1.6); donde su uso autóctono de medicina tradicional y colorante en alimentos se asocian a un cultivo doméstico (Donkin, 1974), facilita su siembra cerca de sus casas y preservada por su interés culturalmente antiguo, de la cual es propagada fácilmente por semilla.

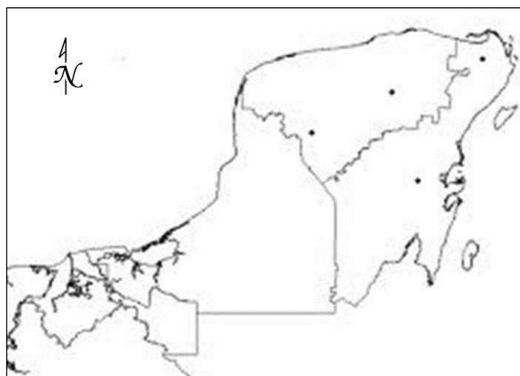


Figura 1.8 Distribución de *Bixa orellana* L., en la Península de Yucatán. Los puntos indican ejemplares del herbario colectados de la especie. Fuente: CICY

### 1.1.7 Cultivo y producción

El cultivo del achiote radica en función a su uso como colorante y condimento, además tiene una función útil en ayudar a controlar la erosión de los suelos, funciona como cerco vivo, por lo que se ha integrado a sistemas de producción múltiple, principalmente en huertos familiares y parcelas campesinas donde se intercala con árboles frutales, maíz, frijol u otras especies forestales, incluso sembradas a orillas de cultivos comerciales (Pinzón *et al.*, 2008; Pérez Sandi y Cuen, y Becerra, 2003; Jiménez-Osornio *et al.*, 1999). Otra práctica común es la plantación de una mezcla de tipos y cultivares en una sola área (Leal y Michelangeli, 2010), tornándolos hacia forma de cultivo más especializados como plantaciones o monocultivos, que son fuente de materia prima para empresas comerciales dedicadas al aprovechamiento del recurso fitogenético como La Extra o La Anita, las cuales van a la búsqueda de obtener altos rendimientos (Correa-Navarro, 1995).

La producción de semilla de achiote se estima en 14,500 toneladas métricas a nivel mundial (Raddaz-Mota *et al.*, 2017). A pesar de que se produce en varios países tropicales como Bolivia, Ecuador, Jamaica, República Dominicana, Costa de Marfil, Kenia, India y Filipinas, son Brasil y Perú las principales fuentes de abasto. Smith y Wallin (2006), suponen que

7,500 toneladas de la producción mundial se usan como colorante alimentario en todo el mundo, y el resto de 7,000 toneladas son para el consumo local de los países productores, entre ellos Brasil, Perú y Ecuador, donde se utiliza como especia y/o condimento, principalmente; también se describe que alrededor del 52% de la producción mundial es consumida a través de las importaciones tanto de semilla o extracto, donde Norteamérica, Europa, Japón, son los mercados principales. En México, la producción alcanza 637 toneladas, con un promedio de 1.22 Ton/Ha de rendimiento, adquiriendo valor de \$20,720.97/Ton (datos SIAP, 2018); sin embargo, valores reales sobre la producción del achiote permanece sobreestimada. A pesar de ello, se sabe que el comercio de productos de achiote permanece activo tanto para el consumo regional en Yucatán como hacia el centro y norte del país, e incluso hacia importaciones llegando a pagar hasta \$56,000/Ton, mientras en el mercado local se paga \$46,000/Ton, donde los principales productores son Quintana Roo, Tabasco y Yucatán. No obstante, la precaria producción para el abastecimiento ha necesitado de importar materia prima (semillas), principalmente del Perú (Inforural, 2018; Yucatán Informa, 2017; Pinzón *et al.*, 2008).

Esta amplia gama del uso de la bixina como tinte natural, aunado a sus propiedades antioxidantes y de inocuidad que posee este pigmento, sumado a la tendencia ascendente del uso mundial de colorantes de origen natural (Raddaz-Mota *et al.*, 2017), así como a sus cualidades farmacológicas y medicinales (Rather y Mohammad, 2016), se plantean un interés a hacia su investigación para futuros estudios sobre sus diferentes aspectos biológicos, químicos y genéticos de la especie como recurso fitogenético que vaya dirigido al incremento de sus posibilidades comerciales para las principales zonas productoras del país.

### **1.1.8 Domesticación**

El proceso de domesticación en plantas consiste en la selección recurrente (selección artificial) de las poblaciones de una especie a través del tiempo (Colunga-García Marín, 1996). La presión de selección ha desarrollado modificaciones en la constitución genética sobre el recurso vegetal. Algunas de éstas han respondido positivamente al proceso de selección y de manejo agrícola, por la cual han sido consideradas como especies domesticadas; otras, en proceso de domesticación se consideran semi-domesticadas, ya que depende de que ciertos caracteres se observen de manera estable y conservada

(Gepts, 2004).

Rivera y Flores (1988) reportan a *B. orellana* como una planta completamente domesticada en países de Centroamérica; debido a sus características del fruto como mayor tamaño y número de semillas, abundante pigmento, y dehiscencia son evidencia del achiote domesticado, en comparación con la forma silvestre de frutos más pequeños con menos semillas y pigmento, e indehiscentes; la cual indican cambios durante su proceso de domesticación (Ambrósio-Moreira *et al.*, 2015). Donkin (1974), sugiere que estos caracteres son utilizados para su conservación y propagación como resultado de la domesticación, lo que ha facilitado la naturalización hacia otras regiones y continentes. De forma similar, da Silva *et al* (2018) sugieren al achiote como una especie naturalizada a diversos países tropicales, ya que se han adaptado a una amplia gama de climas y suelos, requiriendo pocos insumos, y resistentes que pueden incluso crecer bien en la naturaleza (Akshatha *et al.*, 2011).

En México, Correa-Navarro (1997) y Hernández-Xolocotzi *et al.* (1995) consideran al achiote como una especie semidomesticada, lo que resulta en una mezcla de tipos botánicos que se distinguen por morfología de sus caracteres reproductivos y de rendimiento (Trujillo-Hdez *et al.*, 2016). Rivera-Madrid *et al.* (2006), describen tipos botánicos en dos variantes: morfotipo de flor blanca y otra de flor rosa. De forma similar, la dehiscencia del fruto maduro se agrupan en dehiscentes o indehiscentes (Narciso-Reyes, 2012). Adicional, el color del pigmento agrupan variantes en amarillo con semillas color café y rojo con semillas color rojo anaranjado (Narciso-Reyes, 2012). Estos recursos de clasificación se presentan al comenzar la vida reproductiva, que inicia durante el tercer o cuarto año de su cultivo, lo que resulta en una amplia variabilidad de rendimientos y compromete el estado del cultivo actual (poco rentable)(Pinzón *et al.* 2008).

Recientemente, Ambrósio-Moreira y colaboradores (2015), sugieren al achiote como especie domesticada, ya que la dehiscencia del fruto es una diferencia específica en plantas cultivadas, y propuesta como estrategia de dispersión, ya que expone a las semillas pigmentadas de rojo a potenciales dispersores para facilitar su transporte hacia otros lugares. Por lo tanto, la dehiscencia es ligado al color y abundancia del pigmento, lo que la hace objeto de mayor presión de selección para más semillas y pigmentos (Ambrósio-Moreira *et al.*, 2015). Características superiores de pigmentos se asociado a frutos de mayor

tamaño (Akshatha *et al.*, 2011), e indirectamente ha favorecido el carácter de la dehiscencia del fruto como consecuencia de este proceso.

### **1.1.9 Hibridismo y reproducción controlada**

La hibridación en plantas es un fenómeno observado desde principios de la agricultura y destinado hacia el mejoramiento de plantas. Este proceso se suele producir nuevas y mejores variedades con caracteres de interés fijados mediante métodos sexuales, así como cualidades mejoradas como resistencia a enfermedades, enriquecimientos nutricionales, altos rendimientos en la producción, entre otros. De manera práctica, la hibridación es la acción de fecundar dos individuos de distinta constitución genética para conseguir reproducir en la descendencia, algunos de los caracteres genéticos proveniente de los parentales. Este proceso se suele producir mediante métodos sexuales y ha sido aprovechado en la producción de nuevas y superiores cultivares (Joseph *et al.*, 2014; Joseph *et al.*, 2012).

Los caracteres agronómicos del achiote son determinados en cuanto a la calidad de sus pigmentos y producción de semillas. Estas características son importantes como referentes de su comercialización (Medina *et al.*, 2001). Por lo tanto son objeto de interés para obtener más pigmento bixina y mejores rendimientos de semillas. En este sentido, Rivera-Madrid *et al.* (2006) desarrollaron un método de polinización controlada en el achiote. La polinización fue manipulada entre la interacción polen-pistilo en tratamientos de cruza entre parentales seleccionados con base al contenido de pigmentos y la presencia de dehiscencia e indehiscencia de la valva. La progenie fértil fue obtenida de cruzamientos de morfotipos de caracteres agronómicos opuestos, mientras escasa progenie en cruzamientos con el propio polen. Lo que representa una limitante en la búsqueda de parentales agronómicos entre las formas botánicas que actualmente se encuentran cultivadas. A pesar de ello, Joseph y colaboradores (2012) demostraron que la especie es auto-compatible. Observaron el crecimiento de los tubos polínicos a través de conducto estilar en tratamientos con polen propio y polen de otros individuos. La germinación del polen no fue limitante entre los morfotipos, y la hibridación por medios sexuales podría ser una herramienta útil hacia la mejora mediante la adopción de técnicas de reproducción controlada utilizando padres seleccionados específicamente.

La mezcla de híbridos ha sido el resultado de la selección arbitraria del hombre basados en caracteres agronómicos, al mismo tiempo, encaminado a la propagación de individuos con características deseables. No obstante, las plantas muestran gran variabilidad dentro de sus formas cultivadas (Rivera-Madrid *et al.*, 2006; Valdez-Ojeda *et al.*, 2008; Ambrósio-Moreira *et al.*, 2015).

Otros problemas asociados con el cultivo del achiote son la falta de disponibilidad de las formas altamente productivas, así como producción heterogénea de semillas, la floración asincrónica en la misma panícula y entre plantas diferentes (Joseph *et al.*, 2012). Esto ha impulsado a trabajos realizados para seleccionar caracteres del achiote con interés agronómico utilizando marcadores morfológicos y moleculares años atrás (Baer, 1976; Arce, 1984; Rivera y Flores, 1988; Mazzani *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2001; Valdez-Ojeda *et al.*, 2008).

Gracias a lo anterior se ha caracterizado este recurso fitogenético, y aunque se han relacionado a caracteres al fenotipo y hecho asociaciones entre ciertos caracteres reproductivos y de pigmentos (Rivera-Madrid *et al.*, 2006; Trujillo-Hdez *et al.*, 2016), aún faltan más investigaciones que permitan una mayor precisión en la identificación de material agronómico importante que conlleve hacia la mejora del achiote.

### **1.2 Caracterización de la variabilidad fenotípica del achiote (*Bixa orellana* L.)**

#### **1.2.1 Variabilidad morfológica**

El conocimiento de la variación fenotípica se realiza mediante descriptores morfológicos de herencia simple y fácilmente identificables fuertemente influenciadas por el ambiente y la variabilidad genética presente, que refleja la forma y estructura de una población. Esta diversidad en el fenotipo permite a las especies plasticidad de extenderse a nuevas áreas, multiplicarse, generar nuevas combinaciones y hacer frente a los distintos ambientes (Hidalgo, 2003).

En el transcurso de la agricultura, los caracteres morfológicos que tienen utilidad pertenecen a las características morfo-agronómicas. Entre éstos caracteres se encuentran los caracteres cualitativos como es la forma de las hojas; pigmentaciones en raíz, tallo, hojas y flores; color, forma y brillo en semillas; tamaño, forma y color de cápsulas;

arquitectura de planta expresada en hábito de crecimiento y tipos de ramificación; y los caracteres cualitativos, descriptores relacionados a los rendimientos (Hidalgo, 2003).

La posibilidad de usar marcadores morfológicos como una ayuda en la selección de caracteres cualitativos y cuantitativos en plantas fue sugerida por Sax (1923) hace ya más de 70 años. Este tipo de trabajo permite la identificación de las características morfológicas de interés agronómico o de valor comercial para la selección de los posibles parentales (Manshardt, 2004; Sleper y Poehlman 2006).

### **1.2.2 identificación de las variables morfológicas**

La caracterización morfológica se basa en la descripción de los caracteres fenotípicos, por lo cual se espera que sea el resultado de la expresión genética asociado a la interacción de las condiciones ambientales; además la mayoría de los caracteres de importancia económica sólo puede identificarse una vez que la planta haya comenzado su etapa reproductiva. Por lo que, la selección con marcadores morfológicos es muy limitada y frecuentemente relacionados a las condiciones edafológicas o del ambiente en cuanto a su expresión, pero indispensable herramienta en el desarrollo de un proceso de selección en los recursos vegetales.

Las evidencias del desarrollo de descriptores morfo-agronómicos de las especies vegetales provienen de Baer (1976). La forma y tamaño del fruto, número de semillas, pigmentación en la superficie de éstos y de semillas, y dehiscencia, en caso de los frutos secos, fueron caracteres más destacados. En el achiote, Arce (1999) representó descriptores como el color de la flor, tamaño (longitud y ancho), espinosidad y color de la cápsula, número promedio de semillas por cápsula, dehiscencia o indehiscencia, así como disposición de las cápsulas en la planta y tamaño de la misma. Actualmente, el contenido de pigmentos es un carácter cualitativo como cuantitativo que se ha empleado como descriptor (Medina *et al.*, 2001; Rivera-Madrid *et al.*, 2006).

### **1.2.3 Caracterización fenotípicas basada en marcadores morfológicos**

La especie presenta actualmente limitantes en el manejo del cultivo para fines comerciales por sus problemáticas de variabilidad y heterogeneidad, lo que origina un interés como un posible cultivo de explotación comercial (Godoy, 2000).

Narciso-Reyes (2012) describen tipos botánicos como variantes o morfotipos con base a sus caracteres fenotípicos expresados al crecer. Las diferencias exhibidas son características que las identifican y empleadas como descriptores en el orden de su variabilidad.

La necesidad de una caracterización más precisa se justifica debido no solo a la medida que se genera del conocimiento de la variabilidad sino que para propósito de la identificación del material agronómico en la búsqueda de la mejora es indispensable conocer la biología reproductiva y estructura genética de especies con potencial comercial de su cultivo. De esta manera, es posible calcular el nivel de variación genética que existe dentro de especie y el potencial que presentan algunos de los materiales de la colección de germoplasma para que sean incorporados en un futuro programa de mejoramiento genético (Guerrero Pinilla *et al.*, 2011).

En ese orden, vale la pena destacar los avances realizados por Brasil (Dequigiovanni *et al.*, 2014; Dias *et al.*, 2017), Venezuela (Mazzani *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2001), India (Akshatha *et al.*, 2011; Siril *et al.*, 2013; Joseph y Siril, 2014). En nuestro país por su parte, el limitado esfuerzo cuenta con caracterizaciones arbitrarias de las pequeñas áreas de cultivo rural, otros casos totalmente desconocidas por falta de recursos económicos, poca rentabilidad o por algún desastre natural hacia al abandono. Debido a lo recurrente de esta situación, se ha descrito que prácticamente no existen colectas formalmente resguardadas en México, lo que amplía el interés sobre la necesidad de estudios de base científica y determinar bancos de germoplasma, para garantizar la caracterización y conservación de este recurso en los próximos años (Pinzón *et al.*, 2008).

Material agronómico se ha podido diferenciar entre accesiones a través de variables del fruto como el tamaño de cápsula, espinosidad y el tamaño de semilla, al grado, de encontrar un grupo de asociación entre las variables espinosidad, longitud de espinas, dehiscencia y forma de ápice; y una asociación proporcional entre las variables tamaño de cápsula y semilla y entre las cápsulas dehiscentes con semillas de color marrón (Medina *et al.*, 2001). Aunque se han observado frutos grandes, éstos mayormente poseen menor número de cápsulas en la panícula; mientras que los mayores números de cápsulas por panícula es mayor la vulnerabilidad a patógenos, *Mildiu polvoriento* principalmente, afectando de manera negativa el rendimiento estimado (Mazzani *et al.*, 2002).

Otro carácter de importancia agronómica es la dehiscencia o la apertura de la cápsula en los frutos maduros. Características del fenotipo de flor se han relacionado con la dehiscencia. Fenotipos de flor blanca se han caracterizado por frutos cerrados o indehiscentes, mientras la dehiscencia es más frecuente en fenotipos de flor rosa (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). La presencia de espinas presenta un orden similar, la indehiscencia se asoció a frutos con espinas más densos, y se observó que estos frutos presentaban un ápice puntiagudo, mientras que frutos con menos espinas y de ápice obtuso presentaron mayor dehiscencia (Mazzani *et al.*, 2002; Valdez-Ojeda *et al.*, 2008).

Diferentes grupos se han identificado a través de éstas características morfológicas. Estos grupos muestran características deseables y otras derivadas como complementarias. Las características deseables representadas en los grupos son frutos con espinas de longitud corta a media, forma del ápice apiculado y/o redondeado y de mayores pigmentos, principalmente; mientras, la indehiscencia de frutos con espinas largas y ápice puntiagudo tomadas de complementarias, y de los grupos morfológicos diferentes emplearse para obtener descendencia híbrida potencial hacia la mejora del achiote (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008).

Caracteres del fenotipo se han asociado al contenido de pigmentos. La evidencia científica ha demostrado que las plantas caracterizadas de fenotipo rosa poseían dos veces más pigmento que las de fenotipo blanca (Ramos-Solórzano, 1991; Fortuny-Fernández, 2007). Sin embargo, la dehiscencia fue frecuente en el fenotipo rosa, y de esta forma, las semillas pueden resultar expuestas a sufrir foto-oxidación y como resultado, la disminución del contenido del pigmento (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Por lo cual, cápsulas dehiscentes exponen las semillas a la luz solar lo que conlleva a la pérdida del pigmento, por lo que se compromete el rendimiento del cultivo (Roberts *et al.*, 2002). Los análisis sobre pigmentos se emplean al inicio de la etapa reproductiva, es decir, a partir del 3er año, lo que genera grandes costos y exceso de trabajo en mano de obra, lo que impulsa la búsqueda de alternativas como el uso de marcadores a nivel de DNA moleculares para acortar los plazos de caracterización (Correa-Navarro, 1995).

La caracterización a nivel DNA o molecular proporciona información directamente con la base genética de la variación; resulta entonces, de suma utilidad al revelar el genotipo, independientemente de las condiciones ambientales o de cultivo (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008;

Dequigiovanni *et al.*, 2014). La caracterización en los trabajos de evaluación de la variabilidad de los materiales biológicos ha evolucionado desde el uso de caracteres morfológicos hasta los modernos análisis moleculares (Rentarías-Alcántara, 2007).

### **1.2.4 Diversidad genética base del mejoramiento genético**

En el mejoramiento genético un objetivo clave es la generación de una población altamente variable en sus características agrónomicamente deseables. Este proceso es teóricamente simple y se puede simplificar en dos pasos fundamentales. El primero se lleva a cabo identificando parentales que poseen características complementarias visibles y heredables con el fin de generar una población altamente variable en sus características de interés comercial. Estas características son principalmente obtenidas de los caracteres del fenotipo o morfológicos. El segundo paso, es seleccionar e identificar entre la progenie segregante los individuos que combinan las mejores características de los padres como resultado de la manipulación en la polinización de los parentales por la recombinación sexual.

Los mejoradores han manipulado numerosos ciclos de selección en la progenie propuesta a mejorar y dirigiéndose hacia su relativa domesticación en función a los caracteres morfológicos. Sin embargo, con el advenimiento de los marcadores moleculares, ha sido posible explorar además de morfológicamente, molecularmente las poblaciones en la identificación de los posibles parentales, y poder decidir si seleccionando los parentales que son genéticamente similares, se restringe la cantidad de variación que será evaluada en la descendencia. O si se quiere, por otro lado, cruzar parentales divergentes genéticamente, se obtiene un rango de variación fenotípica, lo cual sería mucho más exitoso e interesante, el resultado de la descendencia (McCouch, 2004; Manshardt, 2004).

Actualmente limitantes de manejo en cultivo para fines comerciales presenta una carencia de colecciones de esta especie. La estructura genética heterogénea de sus poblaciones origina una gran desuniformidad en los ciclos de producción y divergencia en la fenología, de lo que nace el interés hacia la mejora de la especie como un posible cultivo de explotación comercial. Por su creciente importancia comercial, el recurso achiote debe ser aprovechado racionalmente, tomando en cuenta su colecta, conservación y caracterización, que faciliten los programas de mejoramiento genético que deben implementarse con base a su diversidad en México (Pinzón *et al.*, 2008).

### **1.3 Caracterización de la variabilidad genética en el achiote**

Las variaciones específicas de su secuencia nucleotídica representan un organismo genéticamente único. En el transcurso de la evolución, el flujo genético constante crea nuevas variaciones nucleotídicas, lo que resulta en una amplia diversidad e individualidad genética.

Las características fisiológicas y bioquímicas de todo organismo están contenidas en su genoma. Los genomas de bacterias, hongos, plantas, animales y algunos virus están compuestos por moléculas de ácido desoxirribonucleico (comúnmente llamado DNA). El DNA es una estructura química cuyos elementos fundamentales (nucleótidos) se organizan de manera lineal generando enormes secuencias de información. Esta información es la que define y codifica un carácter determinado y se denomina gen (Lewin, 1995). Los genes se organizan linealmente y se agrupan formando estructuras llamadas cromosomas, los cuales pueden ser vistos bajo el microscopio durante ciertas etapas del ciclo de vida de la célula. Cada cromosoma es esencialmente una molécula de DNA, asociado a proteínas, que contiene numerosos genes que almacenan y transmiten toda la información genética requerida para el desarrollo de un individuo.

#### **1.3.1 El DNA genómico como base de la herencia**

El DNA genómico es el destinado para los trabajos de investigación moleculares. Este DNA afecta un amplio rango de características, incluyendo tasa de división celular, sensibilidad a la radiación, comportamiento ecológico en las poblaciones de plantas y para el óptimo desarrollo en cultivos (Bennett y Leitch, 1995). Estas afectaciones, en su mayoría, implican modificación del material genético, por lo que es la mayor fuente de información para los programas de mejoramiento genético.

La expresión del genotipo es afectada en gran medida por el medio ambiente, determinando así la apariencia o rendimiento de un individuo (fenotipo). La genética estudia como son transmitidos el genotipo y el fenotipo de los parentales a la progenie. Con el uso de la biología molecular se han desarrollado técnicas de análisis de DNA en poblaciones y en organismos que permiten ubicar, caracterizar y explicar la heredabilidad de genes u otros fragmentos de DNA entre los individuos (Lewin, 1995).

El DNA es capaz de replicarse para producir copias complementarias de sí mismas, asegurando de esta manera que el material genético sea heredado íntegro y fielmente, de generación en generación. En angiospermas se ha observado contenido de DNA genómico menores en comparación con otros organismos. En el caso de *B. orellana*, Fayy colaboradores (2005) determinaron su contenido de DNA nuclear equivalente a  $1C = 0.39$  en ( $1C$ , centimorgan es la cantidad de DNA en el núcleo gamético no replicado de un organismo), representando uno de los de menor cantidad entre las angiospermas estudiadas.

### 1.3.2 Citogenética

El análisis de la estructura de la constitución genética de manera ordenada se ha realizado como paso importante en los estudios de evolución y taxonómicos, ya que los cromosomas pertenecen al sistema dinámico del proceso de evolución cuya variación se expresa en características fenotípicas del número, forma y tamaño de los cromosomas y no está relacionada con complejidad del genoma. Lombello y Pinto-Maglio (2014) presentaron el cariotipo de los cromosomas mitóticos del achote. Especie diploide con 7 pares de cromosomas (seis pares de cromosomas metacéntricos y 1 par submetacéntricos) de tamaños pequeños ( $1,4-3,2 \mu\text{m}$ ). Similar reportaron, De Almeida *et al.* (2006), demostraron que presenta  $2n = 2x = 14$ , sin embargo, observaron 5 conjuntos metacéntricos (1, 2, 3, 4 y 6) y 2 pares de cromosomas sub-metacéntricos (5 y 7).

### 1.3.3 Mutaciones fuente de variabilidad genética

Las mutaciones en la secuencia nucleotídica son las principales generadoras de las diferencias genéticas entre las poblaciones. Estas modificaciones van generando diferencias en el arreglo lineal de la secuencia original, lo que produce formas alternas de los genes, llamados alelos. Estas modificaciones son pueden emplearse como un medio de marcaje llamados marcadores de DNA, que pueden ser empleados como una medida para describir cómo estos cambios se mantienen o cambian (frecuencias alélicas y genotípicas) cuando conforman una población.

Esencialmente los marcadores de DNA pueden revelar diferencias genéticas que pueden ser visualizadas por diferentes técnicas, por ejemplo, aplicando un campo eléctrico con

geles de poliacrilamida de tinción química, detección con pruebas colorimétricas con usos de sondas o sistemas automatizados. Además, estas herramientas permiten comprender los diferentes mecanismos genéticos, control en el desarrollo y entender los factores que desencadenan las diversas respuestas a los distintos estímulos externos.

Los marcadores de DNA son principalmente usados si ellos identifican y diferencian un individuo de otro de una misma especie. Si pueden discriminar se les nombra polimórficos, mientras que los marcadores que no, son llamados marcadores monomórficos (Collard *et al.* 2005). El principal objetivo de estos trabajos es determinar la secuencia nucleotídica modificada y su uso como herramienta para identificar y diferenciar genotipos de una misma especie.

### **1.3.4 Polimorfismos genéticos y su uso en genética**

Los genes se caracterizan por tener un número relativamente común de alelos, que permiten clasificar a los miembros de una población dentro de fenotipos altamente homólogos. Los polimorfismos actúan como señales o etiquetas ya que son secuencias específicas, que permiten distinguir el patrón de herencia de un gen en estudios familiares; aunque generalmente pueden o no representar genes blancos en sí mismos, denominados como marcadores genéticos (Collard *et al.* 2005). La gran mayoría de los loci polimórficos se caracterizan por tener un alto número de alelos diferentes, y la proporción de heterocigotos es mucho mayor. Por lo que, al menos dos alelos deben presentar frecuencias mayores al 1% entre una población y cuando la frecuencia de heterocigotos en la población es de al menos 2%. A los alelos con frecuencias menores de 1% se le llaman variantes raras.

Su utilidad como herramienta en el análisis de ligamiento de mapeos en genomas, análisis de heterocigosidad en variabilidad genética, la identificación inter- e intra-varietal, selección asistido por marcadores en mejoramiento genético (MAS), entre otros (Varshney *et al.*, 2005; López Anido *et al.*, 2010; Espósito *et al.*, 2011)

### **1.3.5 Polimorfismos a nivel del DNA**

Los polimorfismos en la estructura del DNA son la base de los análisis genéticos. Los recientes avances en genética molecular han permitido explorar la variabilidad directamente

en el DNA, logrando así el desarrollo de poderosos sistemas de genotipificación que han revolucionado una gran parte del área biológica (Rentarúa-Alcántara, 2007).

Diversas metodologías se han desarrollado para ayudar a establecer las características de interés dentro de un genoma; tales como secuencias simples repetidas (SSR), amplificación de fragmentos de longitud polimórfica (AFLP), amplificación polimórfica al azar de DNA (RAPD) y polimorfismos en único nucleótido (SNP). Estas herramientas son usadas en biología molecular para observar las variantes que se presentan dentro de una población, o las características de interés que se requieren, las cuales pueden ser necesarios para futuros trabajos (Collard et al. 2005).

### **1.3.6 Regiones hipervariables**

Wyman y White (1980) demostraron la existencia de regiones hipervariables (HVRs) de un segmento de DNA, a la cual definieron como *locus* multialélico y fue observado en el DNA humano. Estas regiones también se han observado en los genomas de animales como de plantas; cuya región hipervariable consiste de repeticiones en tándem de secuencias cortas (2 a 4 pares de bases; Manifesto *et al.*, 1998).

La hipervariabilidad deriva del cambio en el número de repeticiones, presumiblemente inducida por recombinación desigual entre las regiones homologas mal alineados o por deslizamiento de la horquilla principal de replicación, originando ganancia o pérdida de unidades repetidas. Como resultado de esto, se genera una alta variabilidad de alelos de diferentes longitudes y una frecuencia de heterocigotos para éstos en algunos casos de hasta el 100% (Morgante y Olivieri, 1993).

Las regiones hipervariables en donde la secuencia principal (core) que se repite en tándem tiene un tamaño de 2 a 5 pb, se denominan microsatélites o polimorfismos de repeticiones cortas en tándem (de sus siglas en inglés STRs o SSRs). En la cual, el carácter polimórfico de los loci SSR es el resultado de la variabilidad en el número de repeticiones en tándem de un alelo a otro. Diferentes tipos de loci SSR se han observado incluyendo di-, tri- y tetranucleótidos (Tautz *et al.*, 1986; Rentarúa-Alcántara, 2007); son altamente conservadas en la evolución (Brohede y Ellegren, 1999) y se encuentran tanto en regiones codificantes como no codificantes, siendo más frecuentes en estas últimas (Metzgar et al. 2000;

Morgante et al. 2002).

El análisis de los SSR mediante la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas del inglés) es un método ampliamente utilizado para realizar la identificación de individuos; además, se pueden amplificar varios loci SSR mediante PCR multiplex y detectar los fragmentos con tinción con compuestos químicos o en forma automatizada utilizando diferentes compuestos fluorescentes (Saiki *et al.*, 1988; Schumn, 1996).

### **1.3.7 Marcadores genéticos**

Existen tres tipos de marcadores genéticos: (1) morfológicos (también “clásicos” o visibles) los cuales en sí mismos son características fenotípicas o caracteres tales como color de la flor, forma de la semilla, habito de crecimiento o pigmentación; (2) Bioquímicos, los cuales incluyen variantes alélicas de enzimas e isoenzimas, y (3) Marcadores de DNA (o moleculares), los cuales revelan sitios de variación en el DNA (Winter y Kahl, 1995). Las principales desventajas de los marcadores morfológicos y bioquímicos es que ellos pueden estar limitados en número y son influenciados por factores ambientales o el estado de desarrollo de la planta.

Los marcadores de DNA son el tipo de marcador más ampliamente usado debido a su abundancia. Estos marcadores surgen de diferentes clases de mutaciones de DNA tales como mutaciones de sustitución (sustitución puntal), reordenamientos (inserciones o deleciones) o errores en la replicación del DNA repetido en tándem (Paterson 1996). Estos marcadores son selectivamente neutrales porque ellos están localizados usualmente en regiones no codificantes del DNA. Diferente a los marcadores morfológicos y bioquímicos, los marcadores del DNA son prácticamente ilimitados en número y no son afectados por factores ambientales y/o estado de desarrollo de la planta (Avisé, 1994; Winter & Kahl 1995).

Los marcadores de DNA son útiles cuando revelan diferencias entre individuos de la misma o diferentes especies. El uso de marcadores de DNA ellos tienen numerosas aplicaciones en el mejoramiento de plantas tales como la evaluación del nivel de la variación genética dentro de un germoplasma, la identidad de los cultivares, y en mapeo de genes (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008).

Esencialmente las diferencias genéticas son reveladas y visualizadas por diferentes técnicas, por ejemplo, la aplicación de campo eléctricos y que al separarse en una matriz polimérica producirán bandas similares o diferentes. Estos marcadores de naturaleza diferente son llamados marcadores polimórficos, mientras que los marcadores que no discriminan entre genotipos son llamados marcadores monomórficos (Collard et al. 2005).

### **1.3.8 Marcadores moleculares**

En la actualidad existen varias técnicas moleculares que nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de análisis del DNA. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos (variación) en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Simpson, 1997). Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, bio-medicina, ciencias forenses y estudios de diversidad (Martínez-Cortés *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Rajwant *et al.*, 2011).

### **1.3.9 Microsatélites (SSR)**

Los marcadores microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) tienen un elevado polimorfismo, son co-dominantes, y muestran resultados altamente reproducibles, por lo que una herramienta útil para evaluar la diversidad genética y la estructura de las poblaciones de plantas (Kalia *et al.*, 2011). Este marcador son secuencias de DNA formadas de 1 a 4 pares de bases, por ejemplo, mononucleótidos (TT)<sub>n</sub>, dinucleótidos (AT)<sub>n</sub>, o tetranucleótidos (AAGG)<sub>n</sub>. Estos loci se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del DNA y es probable que se formen por eventos de rompimiento que generan polimorfismos con valores superiores al 90% (Coltman *et al.*, 1996).

Aunque originalmente diseñados para la investigación en humanos, los análisis de microsatélites se han convertido en una poderosa herramienta para la investigación en otros organismos, incluyendo a las plantas (Dayanandan *et al.*, 1997; White y Powell, 1997; Steinkellner *et al.*, 1997; Cipriani *et al.* 1999; Roa et al. 2000; Collevatti et al. 2001). Los microsatélites proveen información relevante para la identificación y conservación para la investigación de procesos genéticos (Heywood *et al.*, 2003). En la actualidad, los

microsatélites son comúnmente empleados para los análisis de variabilidad genética de poblaciones en plantas silvestres (Zucchi *et al.*, 2002) y cultivables (Espósito *et al.*, 2011) por su naturaleza co-dominante y altamente informativos (Oliveira *et al.* 2006).

Una característica esencial de los microsatélites es su habilidad para detectar polimorfismos en paneles de diversos genotipos. Se ha reportado que los microsatélites varían en el polimorfismo que ellos detectan dependiendo algunas veces en la longitud y secuencia del motivo repetido que ellos contienen y su localización en segmentos codificantes y no codificantes del genoma (Thoquet *et al.*, 2002; Eujay *et al.*, 2002; Oliveira *et al.* 2006). Los marcadores microsatélites fueron desarrollados para el achiote nativo de Brasil para describir su diversidad genética y la estructura, así como para apoyar los estudios de conservación (Dequigiovanni *et al.*, 2014).

En los últimos años, los marcadores microsatélites se han convertido en los marcadores predilectos para análisis de genotipado y diversidad genética debido a su elevado grado de polimorfismo, reproducibilidad, estabilidad, facilidad de manejo, herencia co-dominante y multiallelismo (Goldstein y Pollock, 1997; Cornide *et al.* 2002).

### **1.3.10 Polimorfismo Amplificado de Secuencia Relacionada (SRAP)**

Marcos de lectura abierto (ORF, siglas en inglés) son blanco de los marcadores SRAP debido al diseño de sus cebadores. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés) utiliza 2 cebadores específicos, que están constituidos de 17 y 19 nucleótidos de largo, en-sentido y anti-sentido, respectivamente. La secuencia núcleo posee 14 a 16 bases, donde las primeras 10 u 11 bases del extremo 5', son secuencias de constitución no específica, seguido de la secuencia CCGG (Citosina, Citosina, Guanina, Guanina) en el cebador en-sentido y AATT (Adenina, Adenina, Timina, Timina) en el cebador anti-sentido, y en el extremo 3' posee 3 bases de función selectiva. Las secuencias CCGG son con frecuencia encontradas en regiones de exones; y las secuencias AATT de los cebadores han sido encontradas en intrones y promotores. Por lo tanto, los fragmentos de DNA amplificados durante la PCR pueden corresponder a secuencias de regiones codificantes (Li y Quiros, 2001). El mecanismo de reacción utiliza baja temperaturas de alineamiento (35°C) en los primeros ciclos de PCR, proporcionando mayor número alineamientos; la especificidad se asegura en los ciclos posteriores, donde la temperatura es aumentada

(50°C).

Los marcadores SRAP detectan fragmentos de DNA con alta resolución, polimorfismo y reproducibilidad, así como elevado número de marcadores dominantes (80%). Proporcionan un alto contenido de información (polimorfismo genético), por lo que ha permitido ser utilizados para el análisis taxonómico, generación de mapas genéticos, análisis de biología poblacional (paternidad, flujo de genes) y mejoramiento de plantas (determinación de híbridos) (Li y Quiros, 2001).

El marcador SRAP se ha relacionado con la variabilidad morfológica. En *Curcubita pepo* observaron correlaciones entra la variación genética y morfológica en comparación con otros marcadores moleculares (Ferriol *et al.*, 2003). De manera similar, los SRAPs ha permitido diferenciar cultivares estrechamente relacionados en *Buchloe dactyloides* (Budak *et al.*, 2004). El uso de SRAP ha permitido diferenciar entre cultivares de diferentes localidades de cultivo y describir la variación genética de *Pogostemon cablin* (Wu *et al.*, 2010); así como diferenciar inter e intra varietal de una especie cultivada *Cynara cardunculus* (Espósito *et al.*, 2011). Cabe mencionar el alto polimorfismo, alta capacidad informativa, alta correlación con datos morfológicos que permite utilizar y acelerar la identificación temprana de la materia prima útil en programas de mejoramiento (Espósito *et al.*, 2011).

Las condiciones del sistema del marcador molecular SRAP en *Bixa orellana* ya se encuentra establecido (Valdez-Ojeda, 2004). Se demostró, que este sistema marcador SRAP detectó el polimorfismo entre variantes (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008), y utilizado para la evaluación de parámetros del sistema de entrecruzamiento (Valdez-Ojeda *et al.*, 2010).

### **1.3.11 Estudios de la variabilidad genético-molecular**

En la actualidad, con la manipulación del material hereditario (DNA) y el uso de secuencias nucleotídicas, permiten el desarrollo de herramientas adicionales para acelerar de caracterización de la variabilidad en las especies vegetales. La generación de datos moleculares tiene la ventaja de trabajar directamente con la base de la variación genética (Hillis y Wiens, 2000).

Estas herramientas, permite establecer diferencias o similitudes entre individuos de una

misma especie, en función a la identificación de productos y/o composición genómica a través de la variación (polimorfismo; Hidalgo, 2003). La información generada es utilizada en el mejoramiento convencional, para la identificación y facilitar la selección de los parentales genéticamente diferentes o similares de manera objetiva (Rodríguez y Arencibia, 2002).

En el achiote, Medina *et al.* (2001), identificaron la variabilidad genética a través de la comparación simultánea de patrones electroforéticos de proteínas hidrosolubles e isoenzimas específicas ( $\alpha$ -esterasa,  $\beta$ -esterasa y peroxidasa) de 34 accesiones entre muestras colectadas de Venezuela y Brasil. Los patrones obtenidos manifestaron un alto grado de polimorfismo, reflejo de la heterogeneidad existente en la población estudiada. Además, se ha observado que los genotipos se agrupan de acuerdo a su ubicación geográfica cuando se emplean este tipo de marcador genético (Portela de Carvahlo *et al.*, 2005).

Por otra parte, el empleo de marcadores a nivel DNA se ha reportado en achiote. Valdez-Ojeda *et al.* (2008), reportan una alta variabilidad en la especie y agrupación en relación a su ubicación geográfica de dos regiones agrícolas del sur-este de México, demostrando el alto porcentaje de polimorfismo utilizando marcadores de DNA de nombre SRAP (*Sequence Related Amplified Polymorphism*), sugiriendo una herramienta eficaz en la determinación de la variación y determinación del polimorfismo en la especie. Por otra parte, Dequigiovanni *et al.* (2014), reportan el empleo de microsatélites para evaluar la alta variación genética y la estructura de variedades locales y las poblaciones silvestres recolectados en la región amazónica, así como su evaluación en la generación de polimorfismo entre las 50 accesiones evaluadas.

Trujillo-Hdez *et al.* (2016), demostraron el polimorfismo de la  $\beta$ -ciclase del licopeno en la que diferenciaron en tres grupos en función a las características del fenotipo y contenido de pigmentos en semilla inmadura. Los tres grupos se constituyeron en grupo 1 (frutos verdes con flores blancas), grupo 2 (frutos verdes con espinas rojas y flores rosadas) y grupo 3 (frutos rojos con flores de color púrpura). Y en el grupo 2 se asociaron a los dos veces mayor el contenido de pigmentos.

Debido a esta variabilidad así como a la falta de variedades agronómicas registradas del

achiote y escasa información sobre la caracterización de la variabilidad en la especie, así como el interés en su aprovechamiento en búsqueda de alternativas médicas y de salud, esto es lo que ha generado el desarrollado de estrategias hacia el mejoramiento genético del achiote, para obtener el mayor aprovechamiento de los metabolitos secundarios que esta planta sintetiza. Así lograr la obtención de variedades de alto rendimiento de sus metabolitos ha sido uno de los principales retos a vencer (Michelangeli *et al.*, 2002; Rivera-Madrid *et al.*, 2006).

El fitomejoramiento tradicional ha dado las herramientas conceptuales para analizar la herencia de caracteres fenotípicos evidentes, tales como tamaño, color, productividad, forma de frutos, etc. (Griffiths *et al.* 1993). Por otra parte, el área de marcadores moleculares ha permitido generar y analizar múltiples puntos de información independientemente de su funcionalidad en referencia a los fenotípicos. Y es la integración de los dos métodos la que permite acelerar el proceso de mejoramiento genético de poblaciones e individuos por correlación entre la información fenotípica y la molecular.

Según Vallejo (1991), la variabilidad también se observa entre arbustos, e incluso entre las panículas de un mismo árbol (evaluando el rendimiento de semilla y número de semillas por planta). Esta variación en el número de semilla depende de la variedad, de la polinización, y del tipo de reproducción (Zotyen, 2002).

Con el propósito de mejoramiento genético es indispensable conocer la biología reproductiva y estructura genética de la especie. De esta manera, se podrá conocer el nivel de variación genética que existe dentro de especie y el potencial que presentan algunos de los materiales de la colección de germoplasma para que sean incorporados en un programa de mejoramiento genético.

### **1.4 Sistema apareamiento del achiote.**

#### **1.4.1 El apareamiento en la determinación de sistema reproductivo.**

En la actualidad, las plantas domesticadas se cultivan en sistemas más controlados a diferencia de sus formas naturales o silvestres. Esta adaptación ha permitido mejora en cuanto a calidad, rendimiento, formas, producción, etc.; también, en el transcurso se ha producido cambios genéticos en el sistema de reproducción, y otros caracteres como la

dormancia, mecanismos de protección, propiedades tóxicas y mecanismos de dispersión naturales (Rick, 1988; Schwanitz, 1966) debido principalmente por la selección humana (selección artificial) y otras técnicas tradicionales de domesticación (Ramírez, 2006).

Modelos de estimaciones estadísticas y segregación alélica han facilitado la determinación del sistema de reproducción mediante caracteres reproductivos. En plantas, estos caracteres involucran las formas y diseños florales ligado a patrones de apareamiento. El apareamiento sirve como sistema cuyo papel fundamental es definir la biología reproductiva (Abarca y López, 2007). El sistema de apareamiento está ligado a la expresión caracteres reproductivos como el diseño floral, la auto-incompatibilidad genética, la sexualidad, el aislamiento temporal en la maduración de los sexos (dicogamia) o las barreras morfológicas florales (hercogamia) (Abarca y López, 2007; Bawa y Beach, 1981).

Las plantas domesticadas exhiben una variedad de sistemas de apareamiento, que van desde el entrecruzamiento obligatorio, la autofecundación o apomixis (Ross-Ibarra *et al.*, 2007), o bien, entrecruzamiento predominante (Miller y Gross, 2011) o autocruza predominantes (Sousa *et al.*, 2012).

#### **1.4.2 Medida del sistema de apareamiento**

Los métodos tradicionales de evaluación del sistema de apareamiento se basan en observaciones en el propio sistema, comportamiento de los polinizadores, en diversas características de morfología floral, experimentos controlados de cruzamientos, entre otros. Estas medidas directas muestran el éxito del apareamiento, sin embargo, son medidas inadecuada para el análisis de la transmisión genética (Shaw *et al.*, 1981).

El uso de marcadores genéticos han demostrado ser una herramienta útil en el estudio de la diversidad genética, mejoramiento asistido por marcadores (MAS) y caracterización de genes, entre otros; también, han permitido el desarrollo de estadísticos útiles para obtener estimaciones cuantitativas del apareamiento (Silva *et al.*, 2011). Las estimaciones se basan en que la segregación de alelos de uno o varios *loci* derivan de la combinación de la auto- y fertilización cruzada; es decir, se asume que los productos resultan de la mezcla de la autofecundación mixta y del apareamiento al azar, a partir de la cual se desarrolló el denominado modelo de apareamiento mixto (Ritland 1983; Hayman, 1953).

### 1.4.3 Modelo de apareamiento mixto.

Ritland y Jain (1981) diseñaron un modelo para la estimación de la tasa de entrecruzamiento basado en el modelo de apareamiento mixto. El cálculo se realiza mediante la proporción de cada uno de los tres genotipos de la progenie a partir de un parental materno con un genotipo heterocigo ( $A_1A_2$ ) u homocigo ( $A_1A_1$  y  $A_2A_2$ ). En el cual, la frecuencia alélicas  $p$  y  $q$  representan a los alelos  $A_1$  y  $A_2$  en el polen,  $t$  y  $s$  representa la tasa de entrecruza y de autocruzamiento, respectivamente. Así,  $N$  loci utiliza una matriz de transición de probabilidad cuyo elemento  $ij$  es la probabilidad de observar el genotipo descendencia  $i$  dado el genotipo del parental materno  $j$ ; estos elementos son una función de la tasa y las frecuencias génicas del polen de entrecruzamiento. La matriz es post-multiplicada por un vector columna de las frecuencias de genotipo materno para dar frecuencias de la descendencia.

Este procedimiento estadístico permitió el desarrollo de la teoría multilocus, donde la progenie de cada genotipo materno representan un conjunto genético derivado de óvulos de la polinización cruzada con probabilidad  $t$  para un acervo de polen con frecuencia génica  $p$ , y la autofertilizan con probabilidad  $(1-t)$ .

### 1.4.4 Tasa multilocus de cruzamiento ( $t_m$ )

Este es el parámetro que estima la frecuencia de los individuos dentro de la progenie de cada planta que son producto de entrecruzamiento (Harvey y Sáñez, 2007). Ritland y Jain (1981) desarrollaron un modelo de máxima verosimilitud que permite estimar las tasas de cruzamiento en organismos con sistemas mixtos. Por simulación, la estimación multilocus con un gran número de marcadores dominantes con frecuencias de los genes intermedios y varios loci, permitieron la adecuada estimación del apareamiento (Shaw y Allard, 1982).

La distribución de la estimación del parámetro multilocus o tasa multilocus de cruzamiento ( $t_m$ ) se expresa en valores de 0 a 1, de autocruza a entrecruzamiento, respectivamente; mientras que valores intermedios representa un sistema mixto. La autocruza se asume cuando la planta se desempeñe como parental materno y paterno; la entrecruza, se hace referencia a la progenie de una planta madre en la que al menos otra planta funciona como parental paterno; y mixto, cuando existe variación en la tasa de entrecruzamientos. Además

de las tasas de entrecruzamiento ( $t_m$ ), se determinan las tasas de autocruza ( $1 - t_m$ ), cruces endogámicos y biparentales (BI), y otros parámetros. Diversos marcadores moleculares han sido utilizados en la determinación de estos parámetros, entre ellos las isoenzimas (Pometti *et al.*, 2011), polimorfismos de DNA amplificados al azar (RAPD) (Chiari *et al.*, 2010), polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) (Cheng-Jiang *et al.*, 2009) y microsatélites (Andrade-Bressan *et al.*, 2013).

Estimaciones de  $t_m$  asumen importantes implicaciones prácticas en el mantenimiento de las colecciones de germoplasma y utilizados para proyectar las estrategias de mejoramiento genético sobre el recurso fitogenético (Camacho-Domínguez, 2010). En este sentido, métodos de mejoramiento aplicables a los cultivos de especies autocruza (Sousa *et al.*, 2012) son distintas de las que se aplican a aquellas de entrecruza (Chen *et al.*, 2007) y a aquellas que son adecuadas para cultivos con un sistema mixto (Ferreira *et al.*, 2000; Chiari *et al.*, 2010).

Factores ecológicos y ambientales también influyen de manera importante en el apareamiento. En *Kosteletzkya virginica*, el mayor número de visitas florales se presentan en días soleados ( $t_m=0.753$ ), mientras las visitas en días lluviosos y frío son menores ( $t_m=0.532$ ) (Cheng-Jiang *et al.*, 2009). Estas variaciones en las frecuencias de cruzamiento determina la frecuencia de los genotipos, y por lo tanto, también la variación de fenotipos y composición genética de la población (Brown, 1990).

Dempewolf *et al.*, (2012) describen transiciones en el apareamiento entre la autocruza y la entrecruza en las especies cultivadas. Especies que poseen altos valores de entrecruza tienden a la autocruza cuando se someten a condiciones de cultivo o manejo agronómico, causando cambios genéticos de la ruptura parcial de los sistemas de autoincompatibilidad, por ejemplo. Lo que ha motivado a estudios con el objetivo de entender los mecanismos de transmisión genética en la especie a través de su condición agronómica (Valdez-Ojeda *et al.*, 2010) y útil para una visión detallada de la diversidad genética de los recursos del achiote para futuros programas de mejora (Sleper y Poehlman, 2006).

#### **1.4.5 Evaluación del sistema de apareamiento del achiote.**

En condiciones naturales o de cultivo, es difícil saber quién o quiénes fueron los donadores

de polen de los frutos en una planta, pero a través de su DNA y el de su progenie, se puede reconstruir los eventos de apareamiento que dieron origen a tales frutos gracias a un marcador molecular. En este contexto, Valdez-Ojeda (2004 y 2008) estableció las condiciones SRAP y estimaron una  $t_m$  de 0.748 indicando un sistema mixto (Valdez-Ojeda *et al.*, 2010). Lo anterior ha generado el interés sobre el conocimiento del sistema de apareamiento en las distintas prácticas de cultivo para el establecimiento de colecciones de germoplasma, diseños hacia la mejora genética, y estudios del efecto de flujo genético en la dinámica evolutiva.

El achiote se ha descrito una planta de entrecruza predominante, autocompatible, de floración asincrónica y dicógama, particularmente protándrica (Joseph *et al.*, 2012); por lo tanto, una mezcla de híbridos resultan de la selección arbitraria del hombre propagando individuos asociado a mayores rendimientos (Leal y Michelangeli, 2010). Sin embargo, variantes productivos (Akshatha *et al.*, 2011), falta de plantaciones homogéneas (da Silva *et al.*, 2018) y la carencia de colecciones (Pinzón *et al.*, 2008), han motivado la caracterización con base a caracteres del fenotipo con el objetivo de seleccionar caracteres de interés para atender las diversas problemáticas (Rivera-Madrid *et al.*, 2016).

## **PREGUNTAS A RESOLVER**

1. ¿Cuál es nivel de variabilidad genética de la colección de variantes de achiote en este estudio?
2. ¿Cuales genotipos son prometedores por sus caracteres agronómicos de interés y características deseables de la colección de achiote?
3. ¿Cuál es el nivel de entrecruzamiento de las plantas de achiote en diferentes sistemas de cultivo?

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar las características morfológicas y genético-molecular para la identificación de genotipos deseables en el achiote (*Bixa orellana* L.) para su utilización agroindustrial.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a. Determinar las características morfológicas para la clasificación de las variantes a partir de caracteres flor, fruto y semilla en el achiote del Estado de Yucatán.
- b. Comparar el perfil de bixina para la determinación de las variables morfológicas asociadas al contenido de pigmentos.
- c. Identificar las características genético-moleculares determinados por los polimorfismos generados con microsatélites.
- d. Determinar parámetros de cruzamiento de tres sistemas agronómicos de achiote.

## **JUSTIFICACIÓN**

La evaluación morfológica y análisis de la diversidad genética del achiote en Yucatán promueve las bases para la identificación de caracteres agronómicos y moleculares, cuyo esfuerzo precise criterios de selección para el desarrollo de programas de mejora y conservación que facilite la identificación de caracteres deseables en asociación a la producción de bixina, principalmente.

De lo anterior, aproximaciones moleculares como morfológicos, ambos enfoques siguen desempeñando un papel crucial en el estudio de la diversidad en casi todos los grupos de organismos. Hasta en nuestros días, las especies se describen, identifican y agrupan con

base en tales enfoques, por ello es necesario generar conocimiento con base a su diversidad, que permita conocer el estado genético del recurso y proponer las estrategias de manejo y conservación. Asimismo, este conocimiento permitirá plantear estrategias de reproducción, selección de progenie, mejoramiento genético y producción de variedades comerciales.

### ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

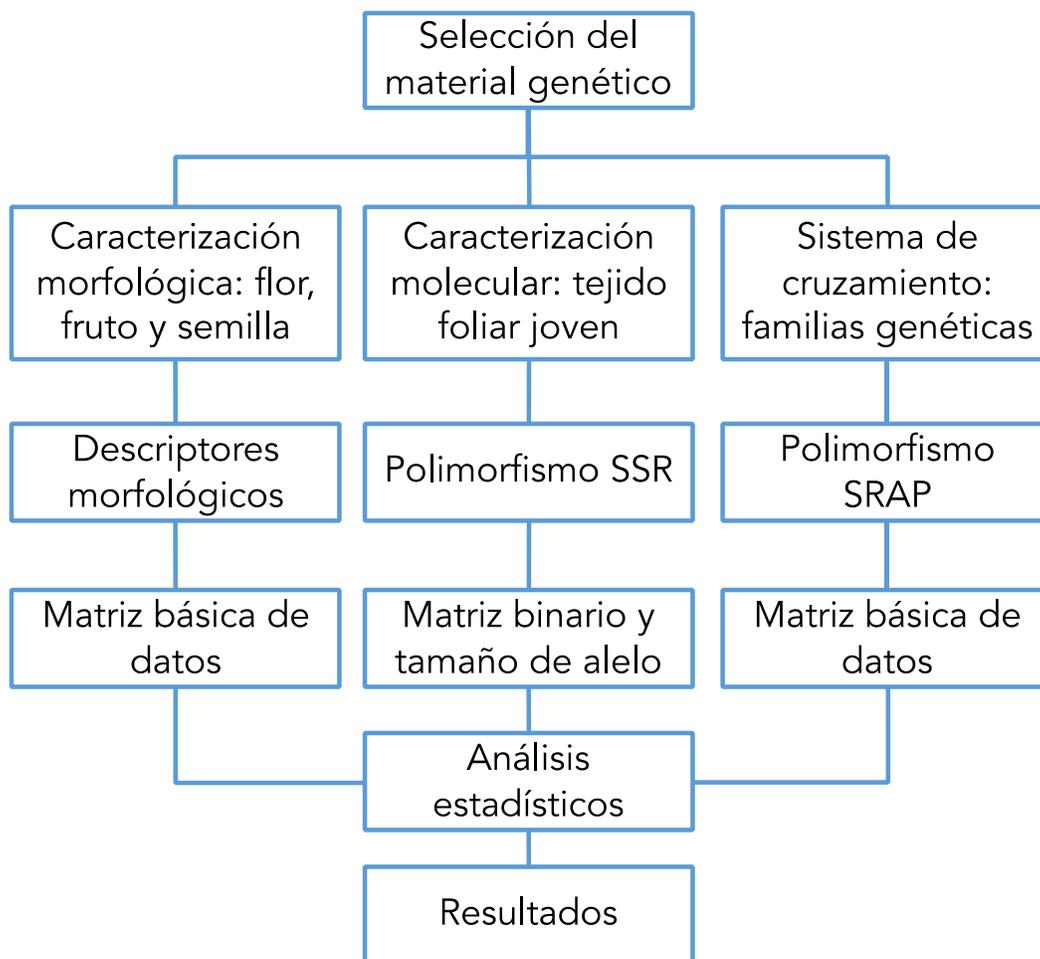


Figura 1.9 Estrategia experimental.

## CAPÍTULO II

### CARACTERIZACIÓN MORFOAGRONÓMICA DE LA COLECCIÓN DEL ACHIOTE (*Bixa orellana* L.).

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

Los recursos fito-genéticos han sido utilizados en productos alimenticios, medicamentos y cosméticos desde la antigüedad, y su aprovechamiento como especies útiles ha generado una intensa búsqueda de material con un alto valor agronómico e industrial. En la actualidad, especies vegetales sirven de fuentes para obtener conservadores, potenciadores de sabor, aromatizantes y colorantes de utilidad a nivel industrial (Sarif *et al.*, 2017; Yusuf *et al.*, 2017). En este contexto, *Bixa orellana* L. (Bixaceae) es valorada por sus pigmentos naturales presentes en las semillas, de uso tradicional culinario como especia, ampliamente utilizado en la industria de alimentos, farmacéutica, cosmética y textil como colorante (Rather y Mohammad, 2016; Avendaño-Arrate *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2010). También se emplea en el tratamiento de diversos padecimientos en humanos y se emplea como una alternativa terapéutica promisorio contra el cáncer y diabetes (Raddatz-Mota *et al.*, 2017; Kumar y Periyasamy, 2016; Vilar *et al.*, 2014), por lo que su comercialización ha ido en aumento mundialmente.

*Bixa orellana* es mejor conocida como achiote en México. Su cultivo se observa principalmente en los huertos familiares y parcelas campesinas que corresponde a bajos niveles de producción (Leal y Clavijo 2010; Godoy-Hernández, 2000). Una tercera parte del consumo se deben a importaciones de semillas, principalmente Perú y Guatemala (Correa, 1997). El cultivo con fines comerciales es limitado debido a la falta de tipos altamente productivos (Akshatha *et al.*, 2011), falta de plantaciones homogéneas (da Silva *et al.*, 2018), carencia de colecciones (Pinzón *et al.*, 2008) y bancos de germoplasma con base genética poco explorada (Dequigiovanni *et al.*, 2017). Para cubrir las diversas necesidades, el desarrollo de programas de mejoramiento genético ha sido realizado en el achiote (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Sin embargo, una caracterización del material biológico de partida para dichos programas es requerido. En estudios previos sobre la caracterización del achiote, ha sido limitada en número de plantas y restringido solo a comunidades locales.

Así dos morfotipos contrastantes en sus características morfológicas son reconocidos (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008); una de ellas, plantas de flor blanca y fruto verde; y la otra, de flor rosa y fruto rojo. Recientemente, se caracterizó un tercer morfotipo de flor rosa claro o tenue y frutos verdes espigas rojas (Trujillo-Hdez *et al.*, 2016) descritos a partir de materiales provenientes de Yucatán. En el cual el morfotipo de flor rosa fue caracterizado por presentar mayor contenido de pigmentos (bixina, principal componente en semillas), mientras en el morfotipo de flor blanca fue relacionado a la indehiscencia del fruto (Rodríguez-Ávila *et al.*, 2011; Rivera-Madrid *et al.*, 2006), rasgo importante involucrada a mejores rendimientos (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008). Estas características son mayormente valoradas por los agricultores (Ambrósio Moreira *et al.*, 2015). Así, morfotipos de achiote son preseleccionadas a fin de obtener mayores rendimientos (Leal y De Clavijo, 2010). Lo que podría ocasionar efecto sobre la base genética de esta especie, o puede causar disminución de la diversidad genética y suceder, incluso, pérdida de material genético valioso (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008). Sin embargo, es necesario una caracterización más precisa que abarque caracteres adicionales de valor agronómico y la identificación de genotipos valiosos para su uso en futuros programas de conservación, manejo y mejoramiento genético.

Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue analizar la variabilidad genética que permita la identificación de material valioso agronómicamente en función a sus características morfológicas y genéticas que facilite la adecuada y acertada selección de genotipos de interés como potenciales parentales para programas de mejoramiento genético del achiote.

## **2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1 Selección del material genético**

Semillas cosechadas de 58 variantes de achiote se colectaron entre 2012-2018. De las cuales, veintinueve variantes pertenecen a la colección establecida en un lote de 2 ha., del Centro Regional Universitario de la Península de Yucatán (CRUPY) de la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH) Temozón Norte, Mérida, Yucatán ubicado a 21°4'28.449"N y 89°33'22.075"O. Tres variantes adicionales, se obtuvieron del jardín botánico del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) en Mérida, ubicado a 21°01'46.4"N y

89°38'21.4"O. Las variantes colectadas procedían de zonas agrícolas y huertos familiares del Estado de Yucatán. Otras veintiséis variantes se obtuvieron de zona agrícola Chan Dzinub, Tekax, ubicado en 19°52'23.711"N y 89°28'54.512"O. Para la selección de las plantas se consideró que los materiales colectados fueran diferentes lo que permitiría a priori suponer que eran distintos entre ellos.

## 2.2.2 Caracterización de las variables morfológicas

Para este trabajo se evaluaron diferentes caracteres que incluyeron características cuali- y cuantitativas (tabla 2.1). Las accesiones se obtuvieron de morfotipos previamente descritos con base a caracteres reproductivos como la coloración de la flor en blanca, rosa claro y rosa; tamaño y color del fruto y de semillas (tabla 2.1). Un total de dieciséis características propuestas (tabla 2.1), 7 pertenecen al tipo cualitativo y 9 al tipo cuantitativo, y agrupadas en características agronómicas, caracteres de rendimiento y de interés específico (Akshatha *et al.*, 2011; Valdez-Ojeda *et al.*, 2008; Medina *et al.* 2001).

Tabla 2.1 Descriptores agronómicos propuestos para achiote (*Bixa orellana* L.).\*Promedio de 100 semillas.

| Descriptores propuestos            | Tipo de característica |               |
|------------------------------------|------------------------|---------------|
|                                    | cualitativos           | cuantitativos |
| <b>Características agronómicas</b> |                        |               |
| Longitud de fruto                  |                        | +             |
| Ancho del fruto                    |                        | +             |
| Razón longitud/anchura del fruto   |                        | +             |
| Longitud de semilla                |                        | +             |
| Ancho de semilla                   |                        | +             |
| Razón longitud/anchura la semilla  |                        | +             |
| Contenido de bixina                |                        | +             |
| <b>Componentes de rendimiento</b>  |                        |               |
| Número de semillas/fruto           |                        | +             |
| Peso de semillas*                  |                        | +             |
| Dehiscencia                        | +                      |               |
| <b>De interés específico</b>       |                        |               |
| Color de la flor                   | +                      |               |
| Color de la cápsula                | +                      |               |
| Forma de la cápsula                | +                      |               |
| Forma del ápice de la cápsula      | +                      |               |
| Densidad de espinas                | +                      |               |
| Color de la semilla                | +                      |               |

Las particularidades y categorías de algunos descriptores se describen en la tabla 2.2. Las variables categóricas se determinaron al inicio de la etapa reproductiva, entre los 2 y 4 años

de vida. El color de flor se estableció en tres categorías: blanco, rosa claro y rosa. Cuatro categorías en el color de la cápsula, desde albina (amarilla) a rojo; tres en forma de la cápsula, de ovoides a cónicas; y cuatro en el ápice del fruto, es decir, desde ápices de forma redondea a los de forma acorazonados o de punta; la densidad se registró desde alta intensidad a la ausencia de ellas. La característica de la dehiscencia se registró en dos categorías para los frutos naturalmente cerrados o abiertos. El color de la semilla se utilizó la tabla de colores RAL®. Todas las medidas se tomaron de materiales maduros, excepto el color de la cápsula, que se registró a partir de materiales inmaduros. Las medidas aleatorias de 5 cápsulas se tomaron de cada variante (fig, 2.1).



Figura 2.1 Características del fenotipo en variantes de achiote. Diferencia en cuanto a color de la flor (a) rosa, (b) rosa claro y (c) blanca; color del fruto inmaduro (a) rojo, (b) verde/rojo, (c) verde, (d) amarillo; (e) coloración de semillas; en cuanto a su forma del fruto (f) redonda, (g, h) hemisférica y (i) cónica.

Las variables cuantitativas fueron: cantidad de bixina, longitud de la semilla y cápsula (cm; de punta a abajo); ancho de la semilla y cápsula (cm; de la parte más ancha); relación de longitud por anchura de la semilla y cápsula fue utilizado un calibrador vernier (fig 2.1).

### 2.2.3 Determinación del contenido de Bixina

El contenido de bixina fue cuantificada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para la extracción de pigmentos se utilizaron semillas maduras y secas que fueron liofilizadas y maceradas. Los pigmentos fueron extraídos con cloroformo (800uL  $\text{CHCl}_3$ ) a partir de 10mg semillas pulverizadas. Posteriormente se extrajo la fase no polar del extracto utilizando previa separación de la fase polar con metanol y agua (1:1 v/v); después, la fase

no polar fue evaporada por N<sub>2</sub> gas, y almacenada a -80°C, hasta su posterior análisis. Las muestras fueron re-suspendidas con 500 uL dimetilsulfóxico (DMSO), de los cuales 5 uL fueron inyectados para su análisis en el HPLC. El sistema de análisis consistió en un HPLC agilent 1200 de bomba cuaternaria con inyector automático y detector de arreglo fotodiodo PAD Vis-UV mediante una columna de fase reversa Hypersil ODS C18 (250 x 4.60 mm y 5µm). Las fases móviles de H<sub>2</sub>O Mili-Q HPLC y ácido fórmico (0.1% V/V), y acetonitrilo grado HPLC (100%) fueron utilizados. La detección se realizó a longitud de onda 450 nm y la cuantificación fue en función del tiempo de retención en relación con la curva estándar de bixina (ASB-00002320-005 Chromadex, Irvine, CA, USA; Carballo-Uicab *et al.*, 2019).

#### **2.2.4 Análisis de datos**

Los datos se organizaron en una matriz básica de datos para facilitar el almacenamiento, acceso y recuperación de los mismos. El paquete de software estadístico SPSS v25 (SPSS Inc; Chicago, IL) fue utilizado para obtener datos de frecuencia y medias de los datos. Adicionalmente, se realizó un análisis de conglomerados para agrupar a los individuos de acuerdo a sus rasgos morfológicos de flor, fruto y semilla de las colecciones de plantas de achiote. Este análisis permite formar grupos y probar las relaciones entre estos grupos y el contenido de bixina, se ejecutó un algoritmo de análisis de conglomerados de dos pasos utilizando el software estadístico SPSS v25 (SPSS Inc; Chicago, IL). Este análisis consiste en un paso de preagrupamiento, en el que los datos se agrupan en numerosos subgrupos y luego, se agrupan utilizando un enfoque de agrupamiento jerárquico aglomerativo.

Los datos de las medidas normalizadas se analizaron por métodos de componentes principales y de correspondencia múltiple mediante el programa PAleontological STatistics (PAST3 versión 3.16 2017; Hammer, 2001). Estos métodos se fundamentan en la reducción de la dimensionalidad de la estructura original de los datos de tal manera que se facilita la visualización de las interrelaciones entre accesiones y entre descriptores. El análisis multivariado permitió establecer los caracteres con mayor capacidad discriminadora y aquellos que lograron explicar la mayor parte de la variación. Se realizó un análisis de correlación entre todas las variables con la finalidad de detectar variables altamente correlacionadas por medio del coeficiente de asociación de Spearman (Hauke y Kossowski, 2011), y se establecieron los grupos (*clúster*) que concentraban a las accesiones con mayores similitudes.

Tabla 2.2 Porcentaje de incidencia interespecífica de caracteres cualitativos

| Descriptor          | Cualidad           | Porcentaje de incidencia interespecífica (%) | Frecuencia |
|---------------------|--------------------|--|------------|
| Color de flor       | 1= flor blanca     | 44.8   | 26         |
|                     | 2= flor rosa claro | 44.8   | 26         |
|                     | 3= flor rosa       | 10.3   | 6          |
| Color de la cápsula | 1= amarillo        | 1.7  | 1          |
|                     | 2= verde           | 50.0   | 29         |
|                     | 3= verde/rojo      | 44.8   | 26         |
|                     | 4= rojo            | 3.4  | 2          |
| Forma de la cápsula | 1= ovoide          | 70.7   | 41         |
|                     | 2= hemisférica     | 25.9   | 15         |
|                     | 3= cónica          | 3.4  | 2          |
| Ápice del fruto     | 1= redondeada      | 52.2   | 32         |
|                     | 2= obtusa          | 31.0   | 18         |
|                     | 3= aguda           | 6.9  | 4          |
|                     | 4= puntiaguda      | 6.9  | 4          |
|                     | 0= s/espinas       | 1.7  | 1          |
| Densidad de espinas | 1= baja            | 22.4   | 13         |
|                     | 2= media           | 46.6   | 27         |
|                     | 3= alta            | 29.3   | 17         |
| Dehiscencia         | 1= dehiscentes     | 31.0   | 18         |
|                     | 2= indehiscente    | 69.0   | 40         |
| Color de semilla    | 1= naranja         | 12.1   | 7          |
|                     | 2= rojizo          | 29.3   | 17         |
|                     | 3= rojo/violeta    | 55.2   | 32         |
|                     | 4= marrón          | 3.4  | 2          |

Tabla 2.3 Estadísticos simples aplicados en variables cuantitativas. Miligramo de bixina por gramo de peso seco ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ ); y relación de medida largo y ancho (L/A).

| Variable  | Media   | Des. Estándar | Máximo | Mínimo |
|---|---------|---------------|--------|--------|
| Bixina ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ ) | 27.6402 | 12.2785       | 58.009 | 8.203  |
| Longitud semilla (mm)                             | 4.2402  | 0.2012        | 4.667  | 3.667  |
| Ancho semilla (mm)                                | 3.1689  | 0.2051        | 3.667  | 2.833  |
| Relación de semilla L/A                           | 0.1343  | 0.0101        | 1.523  | 1.148  |
| Longitud del fruto(cm)                            | 2.9626  | 0.7717        | 5.000  | 1.967  |
| Anchura del fruto (cm)                            | 3.5068  | 0.6255        | 5.067  | 2.600  |
| Relación del fruto L/A                            | 0.8474  | 0.1831        | 1.464  | 0.648  |
| Peso de semillas (g)                              | 2.4091  | 0.3054        | 3.120  | 1.633  |
| Número de semilla/fruto                           | 34.9207 | 6.2065        | 50.60  | 21.00  |

Además, con la matriz de datos establecida se generó un dendrograma a través del análisis de conglomerados siguiendo un criterio de agrupamiento jerárquico a través del método de Ward, utilizando el programa análisis genético-molecular evolutiva (MEGA7 versión 7.0; Kumar *et al.*, 2016), empleada comúnmente para conocer correlacionados entre grupos de poblaciones.

## 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Análisis de similitudes morfológicas.*

La caracterización de las variables morfológicas cuali- y cuantitativas mostraron variaciones que permite suponer que existe suficiente variación dentro de la colección de plantas analizadas. Estos resultados pueden servir como base para la descripción e identificación del de otras colecciones disponibles en diferentes regiones del país donde se cultiva el achote. El carácter heredable expresado en el morfotipo se utilizó como base de los descriptores durante las observaciones en campo de los sitios de estudio.

Los resultados del análisis de la caracterización de los caracteres cualitativos se pueden ver en la tabla 2.2. De manera similar, los resultados de los caracteres cuantitativos se muestran en la tabla 2.3, a los cuales se les aplicaron estadísticos simples como la varianza y la relación de medias con el fin de conocer el rango de variación superior o inferior de los datos con respecto a la media aritmética para cada variable cuantitativa.

El análisis de agrupación en nuestro estudio mostró aglomerados en tres grupos con características morfológicas similares de la colección de plantas de *B. orellana* con base al análisis de dos pasos de los descriptores cualitativos (fig. 2.2) y de los cuantitativos (fig 2.3). La distribución de las agrupaciones mostraron que 10 (17.2%), 22 (37.9%) y 26 (44.8%) individuos conformaron al 1, 2 y 3 grupos, respectivamente.

Entre las variables cualitativas, el grupo 1 representó características más variables entre los caracteres evaluados, plantas de flor color entre blanca y rosa, esta última con mayor frecuencia, correspondieron a frutos amarillos y rojos de formas más variable entre ovoide a cónica (ápice entre redonda a puntiaguda) y densidad media de espinas; sin embargo, este grupo presentó mayor frecuencia en la dehiscencia del fruto. En el grupo 2, plantas de color de flor rosa claro y frutos verde/rojos fueron predominantes, constituido por frutos de ápice redondeada y obtusa, y densidad media de espinas; mientras en el grupo 3, se caracterizó por plantas de flor blanca, frutos verdes, y por densidad alta e indehiscencia de sus frutos como las características más importantes (figura 2.2). Resultados similares se observaron también en los trabajos realizados por Valdez-Ojeda et al., (2008) en el achote utilizando 13 descriptores. Nuestros resultados reforzaron la asociación de los grupos 2 y 3 de las plantas analizadas con la presencia de cápsulas indehiscentes (Fig. 2.2 C); esta

asociación es muy importante debido a que la indehiscencia permite mejorar los rendimientos de semillas y conservar mejor los pigmentos de la planta, contrariamente se ha visto que los frutos dehiscentes además de exponer a las semillas a la fotooxidación de disminuyendo el contenido del pigmentos debido a la luz solar, también hay pérdida de semillas, bajando así el rendimiento en su cultivo (Rivera-Madrid et al., 2006).

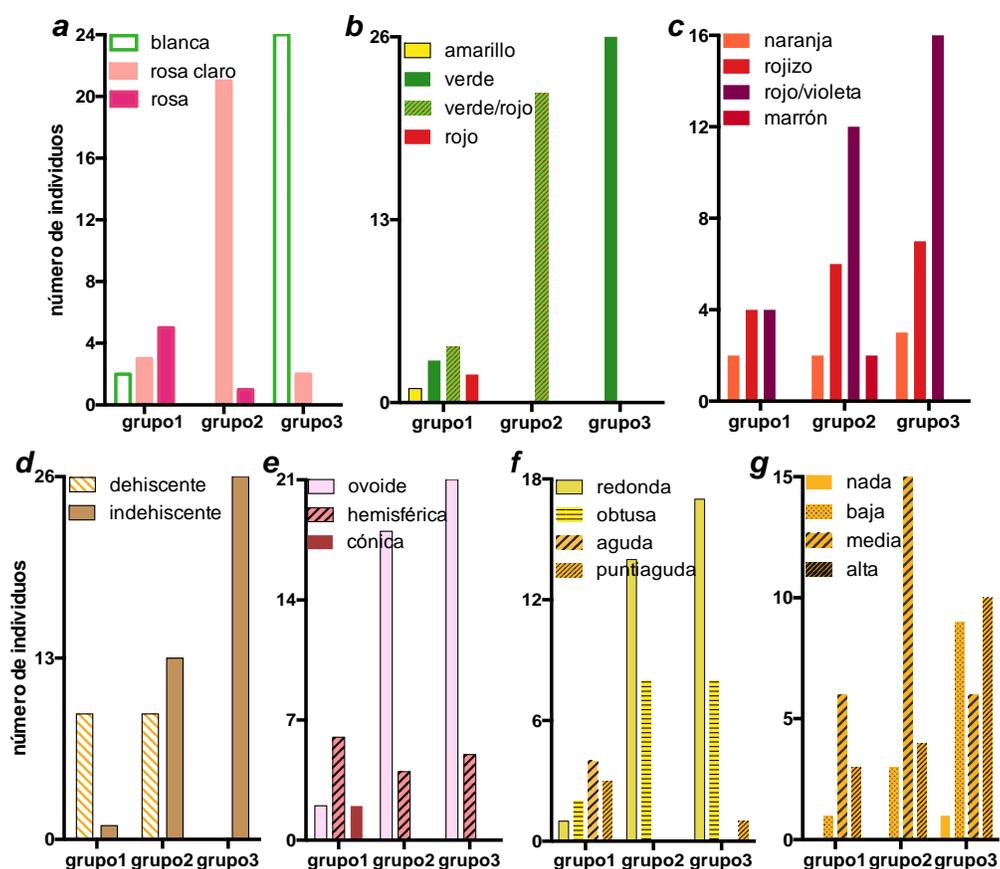


Figura 2.2 Diferencias morfológicas entre las variables cualitativas dentro de los grupos obtenidos de la colección de achiote. Diferencias de color en flor (a), fruto (b) y semilla (c); diferencias del fruto en cuanto a la dehiscencia (d), forma (e), ápice (f) y densidad de espinas (g).

En el análisis de los resultados sobre las variables cuantitativas (fig. 2.3) se observó claramente que existen diferencias en cuanto al número de semillas/fruto, tamaño del fruto y semillas. Las variables cuantitativas presentaron diferencias en el grupo 1, observándose un mayor valor en cuanto al número de semillas por fruto, longitud del fruto, relación longitud y ancho del fruto (frutos más grandes) y anchura de semillas como características destacadas, en comparación de los otros grupos morfológicos (fig. 2.3), lo cual nos indica

que este grupo de plantas pueden emplearse como fuentes potenciales en un esquema de mejoramiento y establecimiento de germoplasma.

El número de semillas por fruto varió entre las accesiones, observándose un rango de 21 a 50 semillas por fruto (tabla 2.3), con un promedio fue  $34.9 \pm 6.2$  semillas por fruto. Resultados similares fueron observados por López-Medina *et al.* (2018), con  $35 \pm 6.59$  semillas por fruto, y relativamente mayor a los obtenidos por Rivera-Madrid *et al.* (2006) con  $28.7 \pm 6.5$  semillas por fruto, muy similares a los obtenidos por Akshatha *et al.* (2011) con  $38.1 \pm 4.2$ . En cuanto a los conglomerados, en el grupo 1 se observó un valor promedio superior de número de semilla con  $43.3 \pm 4.397$  semillas por fruto, mientras  $33.2 \pm 5.016$  entre ambos 2 y 3 grupos. Los promedios del número de semillas por fruto es muy importante desde el punto de vista de rendimientos, ya que a mayor número de semillas mayor será el rendimiento.

Trabajos anteriores muestran una diferencia entre los morfotipos contrastantes de color en el fruto, donde se reporta una media  $46 \pm 4.7$  para frutos de color rojo, mientras  $37.2 \pm 4.2$  de las de fruto verde (Akshatha *et al.*, 2011). Nuestros resultados no se encontró dicha relación, los valores observados indicaron que no diferencia en el número de semillas por fruto entre los morfotipos de color de flor y fruto, debido al número de semillas por fruto relativamente similar entre las accesiones evaluadas, una media de  $34.9 \pm 6.58$  se obtuvo de las variantes de tonalidades rosa y rosa claro, mientras una media de  $33.6 \pm 5.54$  semilla por fruto en las variantes de flor blanca.

La longitud del fruto fue visiblemente variable, se observaron medidas de 1.9 a 5 cm entre las accesiones evaluadas (tabla 2.3), donde la longitud del fruto del grupo 1 fue  $4.3 \pm 0.456$  cm en promedio, a diferencia del  $2.7 \pm 0.499$  cm en promedio de los grupos restantes. En relación longitud y anchura (L/A) del fruto también fue una característica muy variable, se obtuvieron de 1.464 a 0.648 cm tabla (2.3); con respecto a L/A del fruto, presentó un promedio de  $1.16 \pm 0.225$  cm en el grupo 1, mientras los grupos restantes promediaron  $0.78 \pm 0.080$  cm. En cuanto a la anchura de semillas fue relativamente variado, se obtuvo medidas de 3.667 a 2.833 mm (tabla 2.3); los valores con respecto al grupo 1, presentó un valor promedio de  $4.06 \pm 2.974$  mm, en comparación a  $3.18 \pm 0.194$  mm de los grupos 2 y 3.

La longitud de semilla, la relación longitud y anchura de semilla, y peso de 100 semillas

fueron características que oscilaron de 4.667 a 3.667 mm, 1.523 a 1.148 mm y 3.120 a 1.633 g, respectivamente (tabla 2.3). Estas características fueron pocas variables entre las accesiones, ya que el 89.6% de la población fueron muy similares; donde, en el caso de la longitud de semillas medidas  $\geq 4$ mm fue observado con mayor frecuencia; la relación longitud y anchura de semilla los tamaños fue  $\geq 1.2$ cm entre la mayoría de las accesiones; y, peso de 100 semillas, valores  $\geq 2$ g fueron observados. Éstas características fueron poco variables entre los grupos obtenidos. Por lo tanto, el tamaño como el peso es muy similar entre las accesiones evaluadas. De manera similar, se presentó en la anchura del fruto, oscilando de 5.067 a 2.600 cm (tabla 2.3) y valores  $\geq 3$ cm se observaron en el 77.6% de las accesiones.

El componente más importante de las semillas lo constituye la bixina. Por lo tanto, su contenido es el precio al que se cotiza en el mercado. Actualmente, los contenidos de bixina de  $\geq 2.5\%$  son deseables para exportar semillas (ITC, 1994). En el presente trabajo, se observaron valores en el contenido de bixina entre 0.8 a 5.8% (tabla 2.3), de los cuales el 48.3% presentaron valores superiores, y el resto (51.7%) estuvieron por abajo al requerido. Los valores promedios entre grupos mostraron alta variación. En el grupo 1 se obtuvo una media de  $32.97 \pm 17.37 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ ; el grupo 2, con una media de  $30.34 \pm 11.66 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ ; y en el grupo 3, una media de  $23.30 \pm 9.12 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ . Por lo tanto, las oscilaciones solapadas de los valores de bixina fue observado entre los grupos, y accesiones presentaron valores  $\geq 2.5\%$  distribuido entre los grupos evaluados. Arce (1984) afirmaba que los contenidos menores de bixina con regularidad se presentaban en frutos de alta espinosidad, esta relación se observó en el presente trabajo, ya que el contenido menor de bixina y alta espinosidad se presentaron con mayor frecuencia en el grupo 3. Por lo tanto, en cuanto a la interpretación del contenido de bixina se puede observar que este caracter no es muy significativa su asociación entre los grupos evaluados.

Los reportes previos por Valdez-Ojeda *et al.* (2008), indicaron una mayor diferencia entre las variables cuantitativas, sin embargo en el presente trabajo no se observó dicho comportamiento, quizás debido a que en esta ocasión la colecta fue enfocada a seleccionar plantas con caracteres morfológicamente distintos; en el caso de Valdez-Ojeda *et al.* (2008), las plantas se colectaron de dos localidades agrícolas sin importar su aspecto morfológico. La diferencia entre los caracteres evaluados sugieren alta variabilidad dentro de las

acciones, y en algunos casos, presentaron valores superior a los reportados, por lo que se asume que estas plantas se encuentran sujetas a un proceso de domesticación y presiones de selección similares entre ellas (Ambrósio-Moreira *et al.*, 2015; Valdez-Ojeda *et al.*, 2008).

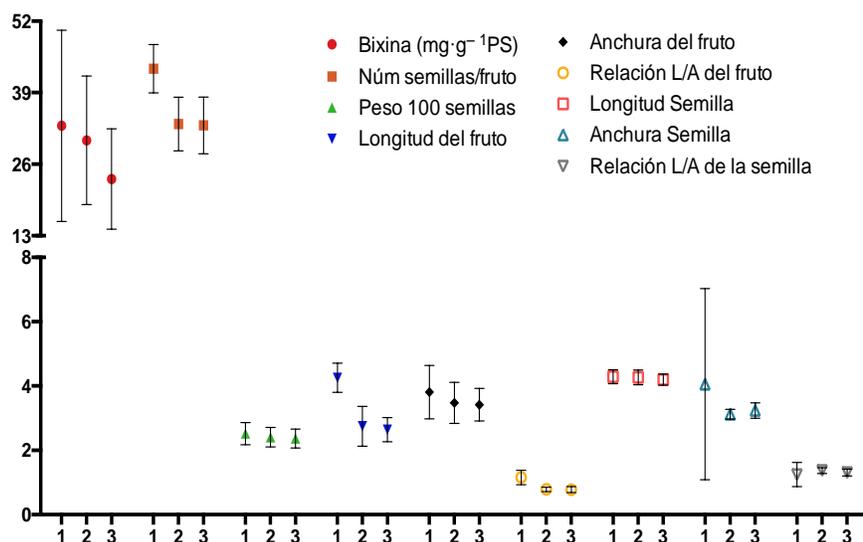


Figura 2.3 Diferencias en las características morfológicas cuantitativas entre las agrupaciones de la colección de achote. grupo1 (1), grupo 2 (2) y grupo 3 (3).

El análisis morfológico determinó las características de plantas con frutos de mayor tamaño y mayor número de semillas; semillas de base más anchas y del pigmento bixina como diferencias importantes dentro del grupo 1. Estas características podrían ser claves en la determinación de variantes del achote (Akshatha *et al.*, 2011) y su posible uso en los futuros esquemas de mejoramiento y establecimiento de germoplasma de caracteres superiores o de alto rendimiento (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008; Pinzón *et al.*, 2008).

#### *Caracterización de la variabilidad morfológica.*

El análisis estadístico multivariado de componentes principales (PCA) mostró la capacidad de generar variables con base a la información contenida en el conjunto original de datos según las características morfológicas de flor, fruto y semillas de la colección de plantas evaluadas (tabla 2.1). El análisis estadístico mostró que 4 de los 16 factores aplicados lograron explicar el 66.7% de la variación de las variables originales (tabla 2.4). La identificación de los caracteres incluidos en este estudio, comparado con el de Valdez-

## CAPÍTULO II

---

Ojeda *et al.* (2008), permite entonces reducir el número de descriptores con alto valor discriminatorio para la caracterización e identificación del material con alto valor agronómico.

De acuerdo a los resultados de los coeficientes propios de la matriz (tabla 2.4), las características de mayor interés son: la coloración de la flor y fruto, dehiscencia, ápice y longitud del fruto, relación longitud/anchura del fruto, anchura y longitud de la semilla, y la bixina; por lo que enfocarse en estas características permitirá la identificación de material con alto potencial y correlacionado a las características de valor agronómico, debido a su orden discriminatorio en la medida de la caracterización.

Tabla 2.4 Valores propios de la matriz de correlación de componentes principales.

|    | <b>Valor propio</b> | <b>Proporción</b> | <b>Acumulado</b> |
|----|---------------------|-------------------|------------------|
| 1  | 4.31849             | 30.75             | 30.75            |
| 2  | 2.21233             | 15.753            | 46.503           |
| 3  | 1.57953             | 11.247            | 57.75            |
| 4  | 1.25754             | 8.9544            | 66.7044          |
| 5  | 0.960798            | 6.8414            | 73.5458          |
| 6  | 0.824452            | 5.8706            | 79.4164          |
| 7  | 0.695714            | 4.9539            | 84.3703          |
| 8  | 0.556051            | 3.9594            | 88.3297          |
| 9  | 0.484909            | 3.4528            | 91.7825          |
| 10 | 0.412252            | 2.9355            | 94.718           |
| 11 | 0.301614            | 2.1477            | 96.8657          |
| 12 | 0.238443            | 1.6979            | 98.5636          |
| 13 | 0.127892            | 0.91067           | 99.47427         |
| 14 | 0.0733506           | 0.5223            | 99.99657         |
| 15 | 0.00039325          | 0.0028001         | 99.9993701       |
| 16 | 3.11E-05            | 0.00022124        | 99.9995913       |

Los resultados de los coeficientes propios de la matriz de los primeros dos componentes mostraron correlación entre las variables originales de color de flor, forma del ápice y longitud del fruto, color, peso y número de las semillas están positivamente correlacionadas, en cuanto a la dehiscencia, peso de semillas y ancho del fruto fue inversamente correlacionada (tabla 2.5, valores en negritas).

Los resultados de los análisis de componentes I y II, se puede observar que la combinación de ambas explicaron el 46.5% de la variabilidad morfológica. Los coeficientes observados a partir de las variables originales de flor, fruto y semillas, fue similar a la caracterización en frutos de achiote en estudio previo sobre este análisis previamente por Medina *et al.* (2001),

cuya relación morfológica del 48% entre los dos primeros componentes. Una gráfica de dos dimensiones con base a los componentes I y II como ejes de coordenadas se señalan en la figura 2.4. En este gráfico, se observó que plantas de flor blanca, de frutos verdes y redondos con ápice redondeado, indehiscentes (fig. 2.4, cuadrante II), mientras se observó un grupo de flor rosa ligero, fruto verde/rojo de forma redonda (fig. 2.4, cuadrante III). Las características flor rosa y rosa ligero, fruto verde/rojo a rojo, de formas hemisférica a cónica, de ápice aguda a puntiaguda, dehiscentes se agruparon de manera diferente y más dispersa (fig. 2.4, cuadrante I y IV). Las formas del fruto ovaladas (promedio en la relación longitud y anchura 0.76 cm) presentaron correlación con la coloración de la flor blanca; en cuanto a las formas hemisféricas y cónicas (promedio de 1.14 cm) a la de coloración de tonalidades rosas; relación descrita previamente por Arce (1984), Akshatha *et al.* (2011) y López-Medina *et al.* (2018).

Tabla 2.5 Coeficientes o cargas de los cuatro primeros factores o componentes principales (PC1, PC2, PC3 y PC4) de la matriz de correlación de las variables morfológicas.

| Variable                 | PC 1            | PC 2            | PC 3            | PC 4            |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Color de flor            | <b>0.34456</b>  | 0.27359         | -0.2236         | <b>0.32057</b>  |
| Color de fruto           | 0.23131         | 0.3087          | -0.23918        | <b>0.52158</b>  |
| Forma del fruto          | 0.2557          | 0.17169         | <b>0.44654</b>  | -0.074817       |
| Forma del ápice          | <b>0.3082</b>   | 0.21964         | 0.26677         | -0.22759        |
| Densidad de espinas      | 0.065844        | 0.19032         | <b>0.41282</b>  | 0.20567         |
| Dehiscencia              | <b>-0.42131</b> | 0.018845        | -0.053253       | -0.113          |
| Color de semilla         | -0.060387       | <b>0.42236</b>  | -0.11267        | -0.19912        |
| Número de semillas/fruto | <b>0.3217</b>   | -0.062758       | 0.15534         | -0.16176        |
| Peso de semillas         | 0.17109         | <b>-0.45844</b> | -0.047945       | 0.11614         |
| Longitud del fruto       | <b>0.4216</b>   | -0.1649         | 0.13142         | -0.16706        |
| Ancho del fruto          | 0.25697         | <b>-0.37801</b> | -0.25049        | -0.12136        |
| L/A Fruto                | 0.055217        | 0.024131        | 0.075727        | -0.017673       |
| Longitud de semilla      | 0.11246         | -0.30663        | 0.0030247       | <b>0.43264</b>  |
| Ancho de semilla         | -0.16738        | -0.24153        | <b>0.47307</b>  | 0.13778         |
| L/A semilla              | 0.020832        | 0.0017482       | -0.037607       | 0.016161        |
| Bixina                   | 0.24747         | 0.0065266       | <b>-0.31446</b> | <b>-0.42902</b> |

Los resultados de los coeficientes en la caracterización morfológica (tabla 2.5, comp. I y II), se observó correlación entre la dehiscencia y el color de la semilla. Las semillas de color rojizo/violeta están asociadas con frutos dehiscentes, mientras la presencia de semillas de color naranja a la indehiscencia. Resultados similares, sugieren esta asociación observada entre las semillas de color rojizo/violeta y la dehiscencia se debe a una foto-oxidación del

pigmento de las semillas expuestas a la radiación solar directa, mientras en frutos indehiscentes mantienen su color natural (Rivera-Madrid *et al.*, 2006; Medina *et al.*, 2001). El hecho de que frutos dehiscentes también presenten semillas de color distinto al rojo/violeta probablemente se deba al tipo de apertura de las valvas, ya que la dehiscencia, en algunos casos, se presentó de manera parcial; otra observación, fue el manejo y cosecha de los frutos, ya que una práctica común de los agricultores fue la cosecha prematura de los frutos que conservan las semillas en su color original. Además, esta la característica de color de semilla ha sido empleada para diferenciar los tipos de achiote a manera de clasificarlos asociado al color de sus frutos inmaduros, como plantas de frutos amarillos con semillas color café y plantas de frutos rojos con semillas color rojo anaranjado (Narciso-Reyes, 2012).

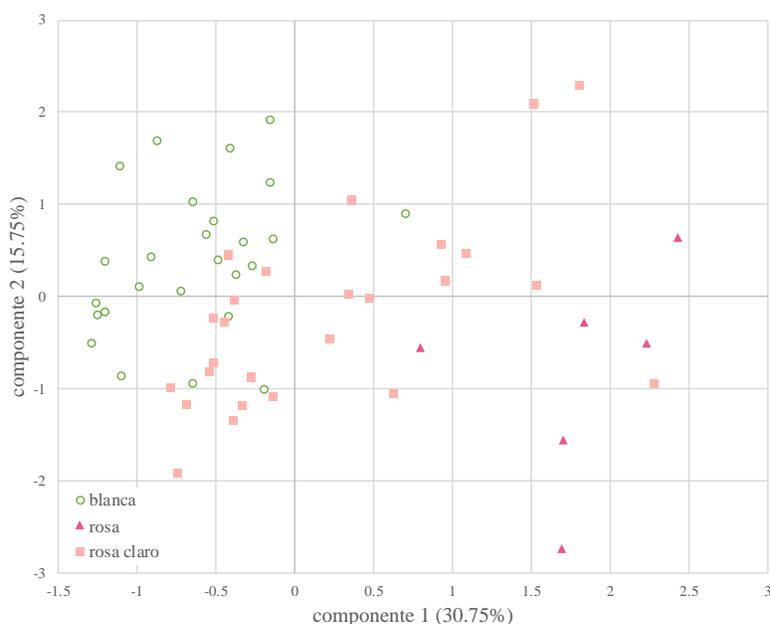


Figura 2.4 Gráfico de los componentes principales I y II (PC1, PC2) basado en características morfológicas de color de flor de 58 accesiones de achiote.

La correlación positiva de color de flor, color y forma del fruto, forma y dehiscencia del fruto e inversa al contenido de bixina se observa en los coeficientes de los componentes principales I y IV (tabla 2.5). La distribución gráfica de coordenadas de éstos componentes se muestra en la figura 2.5. El presente trabajo, el contenido de bixina promedio en las plantas con características de fenotipos de flor rosa y rosa claro fue de  $32.4 (\pm 1.2064) \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$

<sup>1</sup>PS, mientras en fenotipo de flor blanca tuvo como promedio  $21.7(\pm 0.3553)$   $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS; lo que representa 1.5 veces mayor del fenotipo de flor rosa en comparación a las de fenotipo de flor blanca. Resultados similares muestran dicha relación entre el fenotipo y contenido de pigmento bixina; sin embargo, en cuanto a este pigmento, mostraron cantidades relativamente menores, promediando  $14.1 (\pm 0.727)$   $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS en el fenotipo de tonalidades de flores rosadas y  $7.9 (\pm 0.377)$   $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS en el fenotipo de flor blanca (Trujillo-Hdez *et al.*, 2016; Rivera-Madrid *et al.*, 2006).

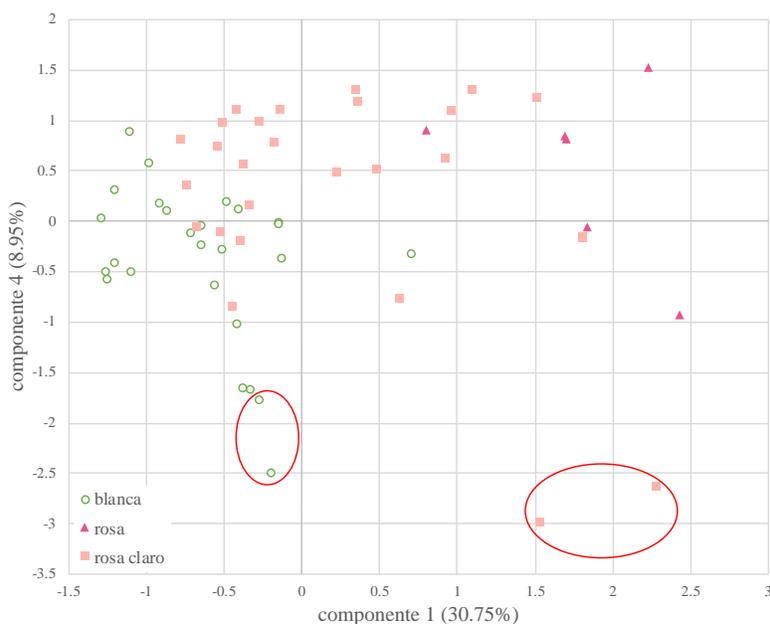


Figura 2.5 Gráfico de los componentes principales I y IV (PC1, PC4) basado en características morfológicas de color de fruto de 58 accesiones de achiote. Accesiones con alto contenido de bixina se indican en círculo.

Estudios previos, Arce (1984) demuestra la correlación positiva entre el número de semillas, la longitud del fruto y el contenido de bixina. En el presente trabajo, mostró relación similar, ya que un valor promedio de 44.4 semillas por fruto, longitudes de 4.4 cm y  $36.6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS de bixina, mostraron una correlación a los mayores rendimientos, en comparación al valor promedio de 30 semillas por fruto, longitudes de 2.4 cm y  $21.1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS de bixina, a partir de los factores obtenidos de las variables originales; lo que indica que a mayor contenido de bixina, mayor número de semillas y frutos con mayor longitud. De forma similar, Rivera-Madrid *et al.* (2006) observaron la correlación positiva entre la coloración de flor y fruto con los contenidos de bixina, observaron que los mayores rendimientos de bixina fueron hasta

4.3 veces mayor entre variantes contrastantes, asumiendo que mayores contenidos de bixina se presentó en la variante de flor rosa y fruto rojo, mientras los valores menores de bixina en la variante de flor blanca y fruto verde. Adicionalmente, los mayores contenidos de bixina se correlacionaron a las formas cónicas y hemisféricas del fruto; anteriormente los resultados han observado dicha relación, donde las características de fenotipo de flor rosa contienen mayores contenidos de bixina con relación al fenotipo de flor blanca (Trujillo-Hernández *et al.*, 2016; Akshatha *et al.*, 2011; Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Sin embargo, se observó algunas accesiones con características deseables de fenotipo de la flor y fruto contrastantes, con media de  $39.15 \pm 10.54$  número de semillas y media de  $42.58 \pm 10.16$   $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS de contenido de bixina (fig. 2.5, indicado en círculo del lado izquierdo), lo que supone su posible uso de progenitores en programas de reproducción controlada hacia variedades de alto contenido de bixina (Rivera-Madrid *et al.*, 2018).

La densidad de espinas fue relacionado con el color y forma del fruto e inverso para la bixina, a partir de los coeficientes de los factores (tabla 2.5, componente III y IV). Por lo tanto, alta espinosidad en frutos verdes y redondos fue relacionado con los bajos rendimientos de bixina. Al contrario, la mediana espinosidad presente en frutos de color evaluados (amarillo a rojo) se relacionó a los mayores rendimientos. Estudios previos, sugieren la espinosidad como una característica poco deseable, ya que dificulta el manejo de los frutos en la cosecha, que por lo general se realiza manualmente (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 2001). Por lo tanto, hallar frutos de espinosidad baja a mediana asociada a altos rendimientos, es considerado deseable en este cultivo ya que pueden ser considerados como material agronómico importante en procesos de reproducción controlada (Joseph *et al.*, 2012) o por cultivo *in vitro* de plantas propagadas con características deseables (Siril y Joseph, 2013).

La relación inversa del contenido de la bixina y la dehiscencia, sugiere que frutos dehiscentes presentaron los mayores contenidos de bixina. En el presente trabajo, el porcentaje de la población dehiscente fue del 31% con una media de contenido de pigmento de  $29.63 \pm 14.44$   $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS, mientras el 69% de la población fue indehiscente con una media de  $26.74 \pm 11.12$   $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS, demuestran dicha relación. La dehiscencia es propuesta como estrategia de dispersión, ya que expone a las semillas pigmentadas de rojo a potenciales dispersores que contribuyen a la distribución natural de esta especie; sin embargo, la

distribución aleatoria de este cultivo es reconocida a la influencia antrópica. Por lo tanto, la selección para más semillas, color y abundancia de los pigmentos ha estado indirectamente asociado a la dehiscencia (Ambrósio Moreira *et al.*, 2015). Previamente, características superiores de pigmentos (altos contenidos de bixina) asociado a frutos de mayor tamaño (Akshatha *et al.*, 2011), muestran indirectamente la dehiscencia del fruto como consecuencia de la actividad humana. La dehiscencia ha sido otra forma de clasificar a las plantas de achiote, tipos agrupados en plantas dehiscentes o indehiscentes (Narciso-Reyes, 2012; Pinzón *et al.*, 2008).

Tabla 2.6 Estadísticos de correlación de Spearman de características morfológicas de achiote. Color de flor (CFL); color (CFR), forma (FF), forma del ápice (AP), densidad de espinas (DS) y dehiscencia (DE) del fruto; color de la semilla (CSE); número de semillas por fruto (NS) y peso de 100 semillas (PS); longitud (LFR) y anchura (AFR) del fruto y su relación largo/ancho (SFR); longitud (LSE) y anchura (ASE) de la semilla y su relación largo/ancho (SSE); y, bixina (BIX). Significancia del valor p(\* p<0.05, \*\* p<0.01)

|     | CFL             | CFR            | FF             | AP             | DS     | DE             | CSE             | NS             | PS             | LFR            | AFR    | SFR     | LSE            | ASE             | SSE    |
|-----|-----------------|----------------|----------------|----------------|--------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|--------|---------|----------------|-----------------|--------|
| CFR | <b>0.838**</b>  |                |                |                |        |                |                 |                |                |                |        |         |                |                 |        |
| FF  | 0.233           | 0.154          |                |                |        |                |                 |                |                |                |        |         |                |                 |        |
| AP  | 0.295*          | 0.141          | <b>0.506**</b> |                |        |                |                 |                |                |                |        |         |                |                 |        |
| DS  | 0.129           | 0.083          | 0.153          | <b>0.324*</b>  |        |                |                 |                |                |                |        |         |                |                 |        |
| DE  | <b>0.615**</b>  | <b>0.459**</b> | <b>0.483**</b> | <b>0.448**</b> | 0.103  |                |                 |                |                |                |        |         |                |                 |        |
| CSE | 0.053           | 0.088          | -0.061         | 0.16           | 0.096  | -0.164         |                 |                |                |                |        |         |                |                 |        |
| NS  | 0.237           | 0.094          | 0.316*         | 0.239          | 0.119  | <b>0.438**</b> | -0.24           |                |                |                |        |         |                |                 |        |
| PS  | 0.022           | -0.038         | -0.038         | 0.117          | -0.005 | <b>0.329*</b>  | <b>-0.434**</b> | 0.127          |                |                |        |         |                |                 |        |
| LFR | 0.253           | 0.086          | <b>0.447**</b> | <b>0.478**</b> | -0.01  | <b>0.710**</b> | -0.163          | <b>0.486**</b> | 0.284*         |                |        |         |                |                 |        |
| AFR | 0.087           | -0.001         | -0.038         | 0.06           | -0.199 | <b>0.396**</b> | -0.172          | 0.197          | <b>0.455**</b> | <b>0.656**</b> |        |         |                |                 |        |
| SFR | 0.255           | 0.17           | <b>0.519**</b> | <b>0.518**</b> | 0.214  | <b>0.494**</b> | -0.097          | <b>0.409**</b> | -0.014         | <b>0.673**</b> | -0.003 |         |                |                 |        |
| LSE | 0.118           | 0.122          | 0.028          | 0.02           | 0.02   | 0.144          | -0.247          | 0.162          | 0.282*         | 0.242          | 0.235  | 0.146   |                |                 |        |
| ASE | <b>-0.415**</b> | <b>-0.311*</b> | -0.061         | -0.189         | 0.116  | -0.191         | -0.19           | -0.199         | 0.177          | -0.186         | -0.076 | -0.112  | 0.087          |                 |        |
| SSE | <b>0.374**</b>  | 0.302*         | 0.035          | 0.133          | -0.128 | 0.271*         | -0.004          | 0.273*         | 0.075          | <b>0.334*</b>  | 0.24   | 0.209   | <b>0.605**</b> | <b>-0.702**</b> |        |
| BIX | <b>0.353**</b>  | 0.198          | -0.068         | 0.03           | 0.007  | 0.073          | -0.008          | 0.037          | 0.077          | -0.199         | 0.074  | -0.270* | -0.234         | -0.178          | -0.049 |

La correlación de Spearman mostró relación entre caracteres evaluados, indicando que caracteres de interés específico (color de flor, color de la cápsula, dehiscencia, forma de la cápsula, forma del ápice, densidad de espinas y color de semilla) del presente trabajo pueden ser implementados en la diferenciación a caracteres agronómicos del fruto, semillas y bixina (tabla 2.6). Este último por su importancia, la bixina fue correlacionada al color de la flor (35.3%, p<0.01). También se encontró asociación entre las variables de color de flor y del fruto (83.8%, p<0.01), a su vez con la dehiscencia (61.5%, p<0.01). La caracterización morfológica demostró la relación entre las características de coloración entre la flor y la dehiscencia (tabla 2.5), plantas con flores de tonalidades rosadas presentaron dehiscencia. Además la dehiscencia fue correlacionado a la longitud (71%, p<0.01) y forma del fruto (48.3%, p<0.01), y al número de semillas (43.8%, p<0.01), características relacionadas por los coeficientes de los componentes descritos anteriormente. La relación longitud y anchura

del fruto mostró correlación de 51.9% ( $p < 0.01$ ) con la forma y 51.8% ( $p < 0.01$ ) con ápice del fruto. Frutos de mayor tamaño (relación  $1.13 \pm 0.232$  cm), se caracterizaron por formas hemisféricas y de ápice agudo a puntiagudo. El color de la semilla se correlacionó con la variable de peso de semillas (43.4%,  $p < 0.01$ ), donde el análisis morfológico mostró que el 55.2% de la población se caracterizó por las semillas color rojo/violeta relacionado a una media en peso de  $2.29 (\pm 0.293)$  g, fue menor en comparación a la media  $2.57 (\pm 0.247)$  g de semillas naranjas a rojizo (representado en 41.2%).

El análisis de jerarquización muestra de manera gráfica la cercanía de caracteres fenotípicos correlacionados entre sí, y estimar de manera comparativa las accesiones con caracteres fenotípicos más incipientes, con base en la clasificación y selección de atributos obtenidos por conglomerados de Ward (Espósito *et al.*, 2011). Los grupos ordenados mostraron gran diversidad entre las características evaluadas (fig. 2.6). El análisis de agrupamiento permitió la conformación de reducidos grupos (>40% réplicas de remuestro), presentando amplia variabilidad dentro del material biológico evaluado de la colección (fig. 2.6). Estudios previos, muestran la gran heterogeneidad entre las formas del achiote (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008), variación entre caracteres de agrónomos (Trujillo-Hdez *et al.*, 2016; Akshatha *et al.*, 2011) y condiciones de cultivo (Dequigiovanni *et al.*, 2017).

Como se observa en el análisis de agrupamientos (fig. 2.6), las características del flor, fruto y semilla no están asociadas con alguna zona o condición de cultivo específicas. Estudios previos, el uso de marcadores morfológicos mostraron una marcada diferencia en función del sitio geográfico de origen, donde 15 cultivares de una misma especie, fueron separados en cuatro grupos homogéneos (Onamu *et al.*, 2012). Por otra parte, grupos taxonómicos diferentes de una misma especie no mostraron una separación clara entre las accesiones a partir de los datos morfológicos (Hurtado y Herrera, 2013). La falta de correspondencia sugiere la presencia de una influencia antrópica en la distribución aleatoria del cultivo, donde las fuerzas selectivas directas del hombre producen gran variabilidad y derivan en la distribución de cultivares procedentes de diversos orígenes en una misma área (Medina *et al.*, 2001). Esto podría deberse a su práctica de propagación tradicional, principalmente por semilla (Leal y De Clavijo, 2010), la característica de entrecruzamiento natural (Pech-Hoil *et al.*, 2017) y el alto porcentaje de polinización cruzada (Joseph *et al.*, 2012); por lo tanto, los factores que conllevaron a una gran heterogeneidad en la descendencia, podría

traducirse en una gran diversidad de formas, tamaño y coloración de las características fenotípicas de las plantas de achiote (Valdez-Ojeda *et al.*, 2010). En el presente trabajo, la deficiente correspondencia observada entre los marcadores morfológicos muestra una amplia variación; si bien se establecen variantes de características agronómicas importantes, se hace necesario una interpretación de correspondencia con respecto al material genético, por medio de marcadores a nivel de DNA con fines de conservación y diversificación en la construcción de colecciones más caracterizadas. Por lo anterior, es necesario realizar trabajos posteriores de correspondencia entre los marcadores morfológicos y moleculares que puedan ser útiles para la caracterización, si bien pertenecen a niveles de estudio de caracterización diferentes, son complementarios para lograr resultados óptimos (Onamu *et al.*, 2012).

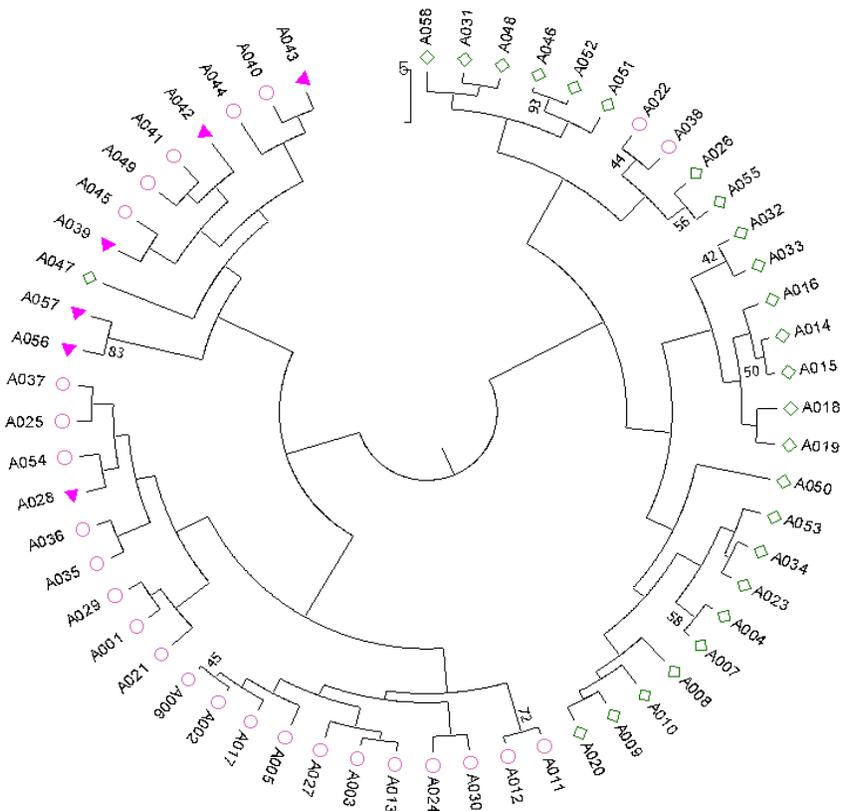


Figura 2.6 Acciones jerarquizadas a partir de la matriz de las distancias Euclidianas por el método de Ward.

## 2.4 CONCLUSIONES

La mayor variabilidad explicada por las variables morfológicas alcanzaron 66.7% debido al

polimorfismo expresado en el fenotipo entre la colección evaluada. Las características morfológicas con mayor valor discriminatorio fueron las características agronómicas de la semilla, principalmente, correlacionada a las variables de interés específico propuestas como las características morfológicas de la flor y fruto, cuyo mayor peso de discriminación se encontraron entre las características del fruto y semilla. Por lo tanto, las características expresadas de la flor, el fruto y la semilla, proporcionaron información congruente sobre el valor agronómico y fueron determinantes en la identificación del material genético disponible dentro de la colección de plantas de achiote. Así, el material genético de la colección mostró características correspondientes a los descriptores propuestos, de interés agronómico y de rendimiento, cuya relación acata las demandas específicas de los fitomejoradores y/o agricultores con el fin de seleccionar progenitores que permitan desarrollar óptimamente el potencial de esta especie.

La caracterización basada en los descriptores descritos en este trabajo exhiben diferentes características, lo que evidencia la amplia variabilidad así como de la alta diversidad genética de las accesiones evaluadas. Factores de su distribución y reproducción natural, contribuyen al mantenimiento de la variabilidad y manifiestan diversas formas o tipos de achiote, lo que supone una amplia base genética que debe considerarse en planes de selección y desarrollo potencial del cultivo que exploten la variación genética para alcanzar una producción más homogénea encaminadas al mejoramiento genético de esta especie.

## CAPÍTULO III

### CARACTERIZACIÓN DE LA VARIACIÓN GENÉTICA DE LA COLECCIÓN DE ACHIOTE (*Bixa orellana* L.) EN YUCATÁN.

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

En plantas domesticadas, la práctica común de selección intencionada o no intencionada, exige presión adicional sobre la base genética con posibles efectos negativos a la dinámica genética (depresión endogámica, deriva génica, cuellos de botella, etc.), por lo que presión de selección juega un papel crucial en la conservación y mantenimiento de la variabilidad genética de una especie (Meyer *et al.*, 2012).

El achiote (*Bixa orellana* L.) es descrita como una especie domesticada (Ambrosio-Moreira *et al.*, 2015) cuyo interés económico de su cultivo se debe al colorante natural de sus semillas, utilizado como tinte natural en diversas industrias como la de alimentos y fuente de medicamentos por su acción terapéutica (Shahid-ul-Islam y Mohammad, 2016). Esta especie presenta polinización cruzada que favorece el entrecruzamiento, lo que se expresa en formas botánicas heterogéneas (Joseph y Siril, 2014; Valdez-Ojeda *et al.*, 2010), conserva una elevada variabilidad genética y facilita su posible uso para propósitos de mejoramiento genético (Rivera-Madrid *et al.*, 2016; Joseph y Siril, 2012). La selección previa sometida a ciertos tipos botánicos es una práctica común (López *et al.*, 2018; Leal y Michelangeli de Clavijo, 2010; Arce, 1999) y utilizada como base genética de colecciones de semillas en la mejora de esta especie (Trujillo-Hdez *et al.*, 2016; Akshatha *et al.*, 2011; Rivera-Madrid *et al.*, 2006). En estudios previos, se ha mostrado que hay varias accesiones de achiote genéticamente relacionados y una base genética estrecha, comprometiendo la diversidad genética y posible pérdida de material genético valioso (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008; Pinzón *et al.*, 2008), estos mismos autores sugieren la presencia de los efectos de la presión de selección por parte de los agricultores sobre la variabilidad genética en las poblaciones cultivadas por lo que es necesario profundizar en el conocimiento de la variación genética de las accesiones en colecciones disponibles en Yucatán para poder contar con una base más sólida sobre la variabilidad genética del achiote.

La repetición de secuencia simple (SSR, por sus siglas en inglés) ha sido una herramienta básica para evaluar la diversidad genética y la estructura genética de las poblaciones, ha

demostrado ser muy útiles por varias de sus características como: presentar una amplia distribución y abundancia en el genoma, tener expresión co-dominante, detectar marcadores neutros y estables, detectar polimorfismo, presentar alta resolución y rapidez (Vieira *et al.*, 2016). Además, los motivos SSR de di, tri- y tetranucleótidos se han reportados para el achiote (Dequigiovanni *et al.*, 2014; Dequigiovanni *et al.*, 2018a) y aplicado a estudios de diversidad genética de poblaciones naturales y de colecciones de achiote de Brasil (Dequigiovanni *et al.*, 2018; Dequigiovanni *et al.*, 2017). Por lo tanto, la precisa genotipificación de accesiones de achiote es posible.

El objetivo del presente estudio fue caracterizar genéticamente una colección de achiote con accesiones de Yucatán, con marcadores SSR y determinar su diversidad genética y estructura poblacional, en la perspectiva de generar bases para desarrollar programas de conservación y mejoramiento genético de esta planta.



Figura 3.1 Grupos o morfotipos del achiote. Flor blanca (a) con fruto verde (d); flor ligeramente rosa (b) con fruto verde/rojo (e); y, flor rosa (c) con fruto rojo (f).

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 Material vegetal

La colección consistió en treinta y dos accesiones de una colección establecida en un lote de 2 ha., del Centro Regional Universitario de la Península de Yucatán (CRUPY) de la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH) en Temozón Norte, Mérida, Yucatán. Además,

---

26 accesiones colectadas procedentes de parcelas de la unidad de manejo para la conservación de la vida silvestre, zona protegida de Benito Juárez (SEMARNAT-UMA-EX0112-YUC-07) en ChanDzinub, Tekax.

El total de 58 accesiones fueron identificadas por características morfológicas contrastantes en tres grupos o morfotipos, previamente descritos (Trujillo-Hdz *et al.*, 2016; Valdez-Ojeda *et al.*, 2008): 1) flor blanca con fruto verde, 2) flor ligeramente rosa con fruto verde/rojo, y 3) flor rosa con fruto rojo (fig. 3.1). Así mismo, grupos a partir del origen de la colecta fue utilizado en la evaluación genética de la colección: ChanDzinup (TKC), Temozón (TEM), Chicxulub (CHP) y Mérida (MID).

### 3.2.2 Análisis molecular SSR

#### *Obtención de DNA genómico*

El DNA genómico se extrajo de hojas jóvenes recién expandidas para cada accesión. El proceso de extracción se realizó siguiendo el protocolo de manufactura con modificaciones de Valdez-Ojeda *et al.* (2010), del paquete comercial DNeasy Plant (Qiagen Cat. No. 69106) a partir de  $\approx 100$  mg de muestra pulverizada con nitrógeno líquido (NL2). La concentración del DNA fue determinada por la absorbancia A260 nm y el índice de pureza aceptada fue  $\approx 1.8$  en la relación de absorbancias A260/A280 nm, lecturas obtenidas por medio del espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). La integridad del DNAg se determinó electroforéticamente en bandas completas de geles de agarosa (1.2% p/v) bajo Luz UV. La electroforesis consistió en un sistema de tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 40 mM de ácido acético y 2mM etilendiamino tetracético, EDTA) de BIO-RAD Power-Pac 1000 (Hércules, CA, USA). Las muestras fueron corridas a 80V durante 20 min; GelRed (Química Valaner Cat. No. 41003) y 1kb plus de invitrogen (DNA Ladder, Cat. No. 10787-018) fueron utilizados para la tinción química y medida estándar. Las observaciones se realizaron mediante fotodocumentador BIO-RAD Gel Doc XR.

#### *Amplificación de regiones SSR*

El protocolo SSR con 23 marcadores microsátélites específicos para *B. orellana* fueron utilizados (Tabla 3.1; Dequigiovanni *et al.*, 2014 y 2018a). Fluorescencia IRDye 700 e IRDye 800 fueron unidos al final 5' de la secuencia M13 universal (5'-CACGACGTTGTTAAACGA-

C-3'), cebador *forward* con una extensión adicional “en cola” de 18 pb en su extremo 5' idéntica a la secuencia del cebador M13 (TGTAACGACGGC-CAGT) y un cebador regular *reverse* fueron incluidos en una reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR; LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EE.UU.). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 10 µL que consiste de 10 ng del templado de DNA, tampón PCR 1X (Invitrogen), 80 µM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 pM de los cebadores *forward* y M13 marcado (700 o 800 IRDye), 2 pM del cebador *reverse* (3 pM para BorA2) y 1U de la enzima DNA polimerasa (Taq Platinum; Invitrogen 10966-030). Las reacciones de PCR se realizaron en un proceso de dos pasos (Schuelke, 2000) como sigue: el primer paso consistió de un paso inicial de desnaturalización 5 minutos (min) a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos (s) a 94°C, 45 s a temperatura de alineamiento (tabla 4.1), y 45 s a 72°C. El segundo paso consistió de 8 ciclos de 30 s a 94°C, 45s a 53°C y 45s a 72°C, y una extensión final de 5 min a 72°C en un termociclador MyCycler T100 (Bio-Rad). Adicionalmente, un programa de ciclos touchdown (Tabla 3.1; Don *et al.*, 2001) se agregó a algunos loci SSR, el cual consistió: una desnaturalización de 5 minutos (min) a 94°C, seguido de 10 ciclos de 30 s a 95°C, 30s de cada ciclo la temperatura inicial de 1°C, y 50s a 72°C. El segundo paso consistió de 25 ciclos de 30s a 95°C, 45s a 50°C y 45s a 72°C; y un tercer paso de 8 ciclos de 30s a 94°C, 45s a 53°C y 45s a 72°C, y una extensión final de 5 min a 72°C.

Electroforesis en gel comprendió paneles de marcadores multiplexados basado con la fluorescencia infrarroja (IR) de los cebadores marcados. Previo a la separación de fragmentos, los productos de amplificación fueron verificados por electroforesis en geles de agarosa (1.8% (p/v)) en condiciones descritas antes. La identificación de fragmentos fue realizada en un analizador de DNA IR2 4300 (LI-COR Biosciences). El sistema consiste de un láser dual que detecta las dos longitudes de onda del IRDye, y crean dos imágenes independientes a partir del mismo gel durante la electroforesis. Los fragmentos de cadena terminados marcados del colorante infrarrojo IRDye se separaron según el tamaño en un gel de acrilamida (gel matriz KB 6.5%, LI-COR Biosciences) con buffer TBE 1X (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM) durante 1 h y 30 min a 1500 mV (condiciones de manufactura LI-COR Biosciences). Los productos de PCR fueron teñidos con Blue Stop Solution (10:1.5 v/v; LI-COR Biosciences) y desnaturalizadas 5 min a 94°C; luego, se mantuvieron en frío, previo a la electroforesis. El tamaño de las bandas se estimó por

comparación con medida estándar IRDye (fragmentos de DNA marcados con infrarrojo de 50-350 pb rango de medidas; Cat. No. 4000-44B IRDye 800 y 4200-44 IRDye 700; LI-COR Biosciences).

Tabla 3.1 Loci microsatélites SSR de achiote. Temperatura de alineamiento (Ta) en touchdown (TD).

| Locus   | Motivo                                | Secuencia (5'-3')                                     | Rango (pb) | Ta (°C)                      |
|---------|---------------------------------------|---|------------|------------------------------|
| BorA2   | (AC) <sub>7</sub>                     | F: CGAGGGGATGTGAAATTAGG<br>R: CTGTTAGGGGACATTTTCATTG  | 241-259    | TD <sub>3</sub>              |
| BorA3   | (TC) <sub>16</sub>                    | F: GGTGGTTTTGGCATTGAAA<br>R: GGAAGCGAATTGAAGAGTG      | 228-239    | 60.0                         |
| BorA5   | (TG) <sub>12</sub> (GA) <sub>22</sub> | F: CACATGCCCTTTGATGGTTA<br>R: CTTGATCTGGTGGTTGCAG     | 245-248    | 62.0                         |
| BorA9   | (CAA) <sub>5</sub>                    | F: CTCCTCCGCCAAAATCTC<br>R: GTCCAAGATGCAGCAAATCA      | 237-245    | TD <sub>2</sub>              |
| BorB1   | (TG) <sub>8</sub> N(TG) <sub>11</sub> | F: GGATATGGTTTATTCGTGCAA<br>R: AAGACCTGTTCACTTGCCCTCA | 207-237    | 62.0                         |
| BorB4   | (GA) <sub>16</sub>                    | F: GCATCATCTCTGTGGGATCA<br>R: ACGAGAAAATGAACGAGCTG    | 228-237    | TD <sub>2</sub>              |
| BorB5   | (CA) <sub>19</sub>                    | F: CTTGGTGTGTTTCCTTTCC<br>R: ACCGGATAGGTTAATGAGA      | 252-290    | 58.0                         |
| BorB10  | (AG) <sub>14</sub>                    | F: CATGCCTCCTCTCGATCTCT<br>R: ATCATTTCCCTTGCCCAACTG   | 186-213    | 56.0                         |
| BorB12  | (TG) <sub>14</sub> (AG) <sub>19</sub> | F: CACATGCCCTTTGATGGTTA<br>R: TCATGTCCGATCCTATGTGA    | 183-193    | 56.0                         |
| BorC5   | (CT) <sub>14</sub> (CA) <sub>9</sub>  | F: GATGGGAGGAGATTAGGATC<br>R: GGGGGCAACAAATGAGTAGA    | 239-258    | 60.0                         |
| BorC12  | (CAT) <sub>4</sub>                    | F: GAGATTGTGTCATGGGTA<br>R: AGGAGGAAGGAAAGGAGGTG      | 209-215    | TD <sub>2</sub>              |
| BorD1   | (TG) <sub>8</sub> (GA) <sub>4</sub>   | F: CAAGCACACAGACCACAGGG<br>R: GGGCTAGGATGACGAGTTCT    | 171-179    | 58.0                         |
| BorD2   | (TG) <sub>10</sub>                    | F: GGATCTATAAGTTGACGACGA<br>R: CTCACCTTTGGCTTCTGGAC   | 242-244    | 62.0                         |
| BorD7   | (GT) <sub>9</sub>                     | F: GTTCGTGGTTGGAGCATAACA<br>R: CAGCAGGAAGTGGAGGTGA    | 228-230    | TD <sub>2</sub>              |
| BorE12  | (ATC) <sub>3</sub>                    | F: GTCATGCCAAGTTGTTTTCC<br>R: AGGTGTTTAGGCGAAAGTGG    | 204-211    | TD <sub>1</sub>              |
| BorF1A  | (TG) <sub>6</sub> (CT) <sub>17</sub>  | F: CGTTCGTCTGAAAATCTG<br>R: CATTTCAGTCAAGACC          | 169-172    | TD <sub>2</sub>              |
| BorF9_2 | (TA) <sub>6</sub> (TG) <sub>10</sub>  | F: CCATTCTGGCAGTCAAAGAA<br>R: CAGCCTTTTTCACCTAATTC    | 289-310    | 60.0                         |
| BorG3   | (GT) <sub>7</sub>                     | F: GTGTACCCACAGAACACAA<br>R: TGTTTCCAAGAAGCTAATGCAG   | 187-192    | TD <sub>2</sub>              |
| BorG4   | (CA) <sub>16</sub>                    | F: TCCCTTTGTTTTCCATTGCT<br>R: TATCCACCAGCAACATTGAC    | 195-233    | <sup>8</sup> TD <sub>1</sub> |
| BorG11  | (TA) <sub>6</sub> (GA) <sub>21</sub>  | F: CATGCAACATGCCAACAC<br>R: CACATGCCTCTCATAAAATC      | 297-314    | 56.0                         |
| BorH3   | (TG) <sub>8</sub>                     | F: GCACGTCACTAGCAAATG<br>R: TCGTATGTGGGAGGTTTGTG      | 233-237    | 60.0                         |
| BorH7   | (AC) <sub>8</sub>                     | F: GATGTGAAGAACCAGAAATCC<br>R: GTTGTGCCCTGTTTGGTTG    | 260-268    | 56.0                         |
| BorH10  | (TA) <sub>4</sub> (CA) <sub>9</sub>   | F: CTTTTGAGTCCTTGCCATCT<br>R: TGTTTGGTTGTGAACGCTC     | 193-309    | 58.0                         |

TD<sub>1</sub>= programa de temperatura de 55°C, disminuyendo 1°C por ciclo hasta 45°C;

TD<sub>2</sub>= programa de temperatura de 60°C, disminuyendo 1°C por ciclo hasta 50°C;

TD<sub>3</sub>= programa de temperatura de 65°C, disminuyendo 1°C por ciclo hasta 55°C.

### *Análisis de los datos SSR*

A partir de los patrones de bandas se codificó la información alélica en una matriz binaria de datos (ausencia/presencia), la cual fue utilizada para análisis de similitud. Un dendrograma de unión vecinos cercanos (NJ; Saitou y Nei, 1987) fue utilizado para representar las relaciones entre individuos y poblaciones con Phylip 3.5 (Felsenstein, 2005), basados en la distancia de similitud de Kosman (Kosman y Leonard, 2005) obtenidos con el paquete R. La confianza de las relaciones se evaluó con 100 repeticiones de re-muestreo. Los árboles finales se formatearon en MEGA versión 7.0 (Kumar *et al.*, 2016).

La estadística básica de diversidad fue calculada: 1) número promedio de alelos por locus; 2) riqueza alélica por locus y por población; y 3) diversidad genética de Nei. Derivado de las frecuencias alélicas de heterocigosidad se estimó: a) el índice de fijación de Nei (Fis); b) la heterocigosidad total media esperada; c) la heterocigosidad media esperada por población; d) el coeficiente de diferenciación de genes (Fst); y e) el contenido de información polimórfica (PIC, por sus siglas en inglés). Para el PIC, se analizó a través de lo descrito por Botstein *et al.* (1980). Este índice se define como:

$PIC = 1 - \sum p_i^2$ , siendo  $p_i$  la frecuencia del alelo  $i$ -ésimo.

Posteriormente, se utilizó un análisis de las coordenadas principales (PCoA) de la distancia genotípica, esto fue para observar la distribución de localidades en un plano dimensional reducido. La distribución de la variación genética dentro y entre las poblaciones de la colección, y dentro y entre los grupos de acuerdo por su origen de colecta se evaluó utilizando un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) "locus-by-locus" con GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). El número de alelos privados por locus y localidad fue obtenido. Los valores se calcularon con el complemento del programa Microsoft Excel GenAlex 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

Para describir la estructura de la población se utilizó el software STRUCTURE 2.3.4. El análisis se llevó a cabo con 100,000 reproducciones para el quemado de datos y 750,000 registros de reproducciones para cada K, repetidas 20 veces por cada K de K=1 a K=5, con individuos agrupados en grupos de acuerdo con el análisis del software.

---

### 3.2.3 Caracterización genética de la *Boβ-LCY1*.

#### *Heterocigosidad del $Bo\beta$ -LCY1*

La caracterización genética con base al polimorfismo del gen de la beta ciclasa del licopeno (*Boβ-LCY1*) fue utilizado como indicador de relación genotipo y fenotipo en las accesiones evaluadas (Trujillo-Hdez *et al.*, 2016). Cebadores en sentido diseñados para la amplificación de alelos en el gen *Boβ-LCY1* y un cebador anti sentido, permite la detección de la cigosidad para este gen en tres genotipos denominados genotipos HA, HB y HC. Los cebadores en sentido F-HA y F-HC, y el anti sentido B7 se emplearon para la amplificación de los alelos (Trujillo-Hdez *et al.*, 2016). El F-HA (5'-CCAATTCTAGCACTCTCACG-3') presenta especificidad del último nucleótido (G) al genotipo A. Por otra parte, F-HC (5'-CAAGAAGGAGAATCTTGAGC-3'), el último nucleótido (C) confiere especificidad al genotipo C. Por lo tanto, el patrón homocigota determina los genotipos HA y HC, mientras que heterocigota en el genotipo HB, (Trujillo-Hdez *et al.*, 2016).

#### *Condiciones de reacción y determinación de genotipos*

El método consiste en reacción simple de PCR. Un volumen total de 15 uL que contiene 10 ng del templado de DNA, tampón PCR 1X (Invitrogen), 1.5 mM de  $MgCl_2$ , 0.2 mM de cada dNTP, 20  $\mu$ M de los cebadores *forward* y *reverse*, y 1U de la enzima DNA polimerasa (Taq Platinum; Invitrogen 10966-030). El programa de PCR consistió en un paso inicial de desnaturalización 5 min a 95°C, seguido de 28 ciclos de 95°C a 30s, 62°C a 30s y 50s a 72°C; y una extensión final de 5 min a 72°C por 7min, en un termociclador MyCycler T100 (Bio-Rad). La visualización de las bandas mediante la electroforesis en agarosa (1.2% p/v) bajo UV en condiciones descritas más arriba. El análisis genotipificado asociado a los grupos fenotípicos se determino por el patrón de bandas observadas.

## 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.3.1 Análisis de SSR en la colección de achiote de Yucatán

#### *Concentración del DNA y amplificación SSR*

Concentraciones de DNA oscilaron entre valores de 6.6 a 71 ng/ $\mu$ l, con coeficientes de

absorbancia entre 1.54 a 2.34 (A260/A280; datos NanoDrop; fig. 3.2a) en las muestras analizadas. La amplificación SSR (fig. 3.2b) se optimizó a partir de ensayos entre cebadores, del cofactor cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) y de las unidades monómericas de DNA (desoxinucleótidos, dNTPs) y modificaciones de manufactura del sistema LiCor 4300 (Tailed primers, Technical Support LiCor Biosciences Lincoln, Nebraska USA).

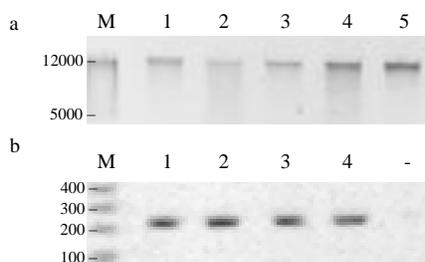


Figura 3.2 DNA genómico y fragmentos amplificados de regiones SSR. (a) DNA genómico de cinco diferentes muestras, y (b) productos de PCR del SSR B4 en 1=10, 2=15, 3=25, 4=50 ng, respectivamente. M, medida estándar y (-), control negativo.

### *Polimorfismo del SSR*

Inicialmente se probaron 26 loci microsatélites utilizados en el achiote (Dequigiovanni *et al.*, 2014 y 2018a). Alrededor de 23 mostraron polimorfismos en los loci evaluados, con un rango de tamaño de alelo de 169 a 314 pb entre los loci evaluados (tabla 3.1). El número de alelos obtenidos por loci varió en un rango de 2 a 7, con un total de 75 alelos, con un promedio de 3.26 por marcador fueron identificados (tabla 3.2).

El locus H10, junto a los loci F9\_2, B10 y C5 se obtuvo un mayor número de alelos 7 y 5, respectivamente. Estos loci SSR presentaron alelos similares en poblaciones cultivadas de achiote (Dequigiovanni *et al.*, 2018a); sin embargo, el locus B10 se obtuvo un número menor de alelos al reportado para este marcador con 10 alelos en 63 accesiones de una colección brasileña (Dequigiovanni *et al.*, 2017). El menor número de alelos con únicamente dos, se presentaron entre los loci A2, A3, D1, D2, D7, E12, F1A, G3, H3, y H7. Mientras, con tres alelos se observaron en los loci A5, B12 y C12; y cuatro para los loci A9, B1, B4, B5, G4 y G11 (tabla 3.2). Estudios previos, números similares de alelos se obtuvieron para D2, G4 (Dequigiovanni *et al.*, 2014), A5, B12, G3 (Dequigiovanni *et al.*, 2017), D1, H3 y H7 (Dequigiovanni *et al.*, 2018a); y, un número menor de alelos se observaron en A2, A3, B12

(Dequigiovanni *et al.*, 2017) y F1A (Dequigiovanni *et al.*, 2014). Los SSR E12 y D7, mostraron polimorfismo, aunque no han sido utilizados para estudios de diversidad genética (Dequigiovanni *et al.*, 2018a).

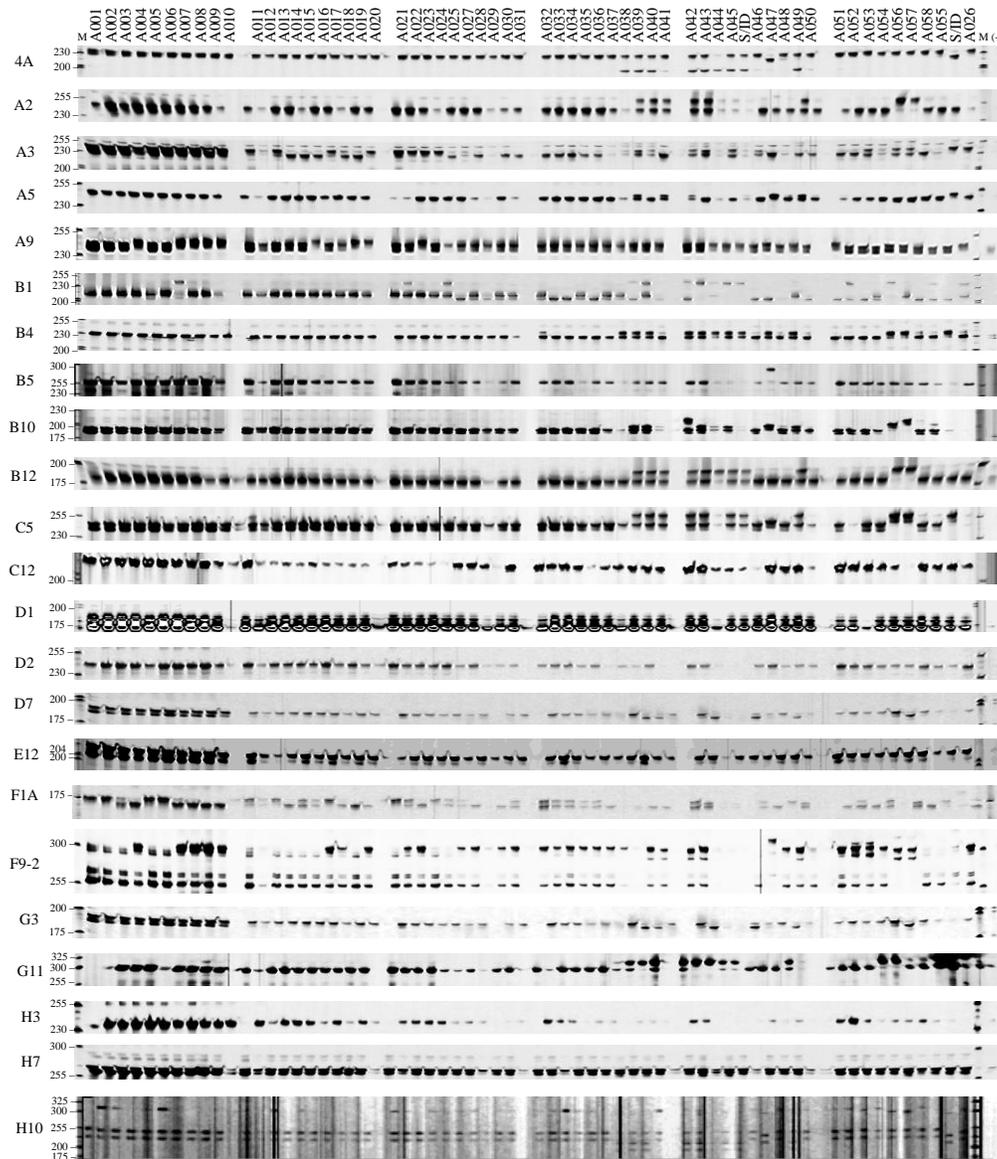


Figura 3.3 Patrones de segregación de 23 loci SSR en la colección de achiote. Accesiones (arriba), loci SSR (izquierda), y medida estándar (M) se muestran.

El número de alelos (A) y el rango de tamaño de alelo (bp) fue similar a los reportados por Dequigiovanni *et al.* (2014; 2018a), con promedio de 3.8 y de 154 a 228 pb en los tamaños de alelo para una colección de achiote; y de 3.04 con 167 a 327 pb en el análisis de

poblaciones cultivadas de la amazonia brasileña, respectivamente. La diferencia en los marcadores con número de alelos menores probablemente se debe al método utilizado, ya que la resolución para la separación de 2 alelos que difieren en una repetición (2 bases) fue difícilmente observado en las lecturas para algunos marcadores. Sin embargo, los patrones de bandas obtenidos muestran claramente el polimorfismo o alelos correspondientes a diferentes loci genéticos; además se observaron genotipos heterocigotos y en algunos casos homocigotos en la colección evaluada (fig. 3.3).

Por otro lado, la variación en los números de alelos observados en la colección evaluada provenientes de Yucatán, pertenecen a genotipos colectados de poblaciones de probable acervo genético común como posible resultado de efectos genéticos de cuello de botella durante la domesticación en las poblaciones cultivadas en comparación a las silvestres (Dequigiovanni *et al.*, 2018a; Dequigiovanni *et al.*, 2014; Valdez-Ojeda *et al.*, 2010). Por lo que se sugiere la inclusión de variantes provenientes de diferentes sitios geográficos, como posible base de diferentes acervos genéticos. El achiote se reporta distribuido en 14 estados de México, adicional a la Península de Yucatán, sobresale los estados de Oaxaca, Veracruz, Guerrero y Chiapas (Pinzón *et al.*, 2008), y con esto, aumentar la base genética a su diversidad en México.

Los valores del contenido de información polimórfica (PIC) mostraron una amplia variación, con un rango entre 0.05 (D1) a 0.88 (F9\_2) y promedio de 0.62 (tabla 3.2). Este promedio de información polimórfica de los SSR evaluados en la colección, indican que son marcadores altamente informativos (Anderson *et al.*, 1993), donde valores de PIC >0.5 es apropiado para la caracterización genética de una población (Ghislain *et al.*, 2009). Los valores obtenidos de PIC fueron más altos a los reportados en una colección de Brasil, con un rango de 0.03 a 0.80 y promedio de 0.43 (Dequigiovanni *et al.*, 2017). Es posible que los valores de PIC altamente informativos del presente trabajo se deba a la alta heterocigosidad de estas plantas que permite encontrar un mayor número de formas alélicas (Valdez-Ojeda *et al.*, 2010). Los SSR D1 y H7 presentaron marcadores menos informativo con un PIC de 0.05 y 0.10, mientras que, por el contrario, se demostró que SSR F9\_2 y H10 fueron los más informativos con un PIC de 0.88 y 0.84, respectivamente (tabla 3.2). Los SSR con valores PIC cercanos a la unidad, poseen potencial de revelar la variación entre alelos y podrían usarse de manera más efectiva para el análisis de la variación genética en una

población y mapeo genético (Andersen y Lubberstedt, 2003).

Tabla 3.2 Riqueza alélica de 23 loci SSR en la colección de achiote. Número de individuos (N), número de alelos (A), frecuencia del alelo principal (F) y contenido de información polimórfica (PIC).

| Locus           | N         | A           | F            | PIC         |
|-----------------|-----------|-------------|--------------|-------------|
| A2              | 58        | 2           | 0.775        | 0.59        |
| A3              | 56        | 2           | 0.703        | 0.51        |
| A5              | 57        | 3           | 0.593        | 0.52        |
| A9              | 58        | 4           | 0.430        | 0.80        |
| B1              | 57        | 4           | 0.391        | 0.83        |
| B4              | 58        | 4           | 0.399        | 0.61        |
| B5              | 53        | 4           | 0.706        | 0.82        |
| B10             | 58        | 5           | 0.472        | 0.72        |
| B12             | 57        | 3           | 0.524        | 0.61        |
| C5              | 57        | 5           | 0.481        | 0.72        |
| C12             | 56        | 3           | 0.405        | 0.71        |
| D1              | 58        | 2           | 0.525        | 0.05        |
| D2              | 50        | 2           | 0.802        | 0.58        |
| D7              | 40        | 2           | 0.911        | 0.75        |
| E12             | 56        | 2           | 0.758        | 0.41        |
| F1A             | 55        | 2           | 0.622        | 0.59        |
| F9_2            | 51        | 5           | 0.483        | 0.88        |
| G3              | 54        | 2           | 0.785        | 0.62        |
| G4              | 58        | 4           | 0.605        | 0.63        |
| G11             | 56        | 4           | 0.301        | 0.80        |
| H3              | 47        | 2           | 0.599        | 0.67        |
| H7              | 58        | 2           | 0.582        | 0.10        |
| H10             | 58        | 7           | 0.431        | 0.84        |
| <b>promedio</b> | <b>55</b> | <b>3.26</b> | <b>0.578</b> | <b>0.62</b> |

### *Diversidad genética*

La variación en los patrones de fragmentos amplificados de los 23 marcadores SSR (tabla 3.1) se usaron para la caracterización y el análisis de diversidad genética de la colección de achiote. Un total de 75 alelos se utilizaron para dicho análisis. El valor medio del número de alelos diferentes ( $N_a$ ) fue 2.54, de los cuales, el 2.11 fue el promedio del número de alelos efectivos por locus ( $N_e$ ) (tabla 3.3). Los valores  $N_a$  y  $N_e$  son considerados cercanos, lo que indica frecuencias alélicas similares y se asume limitados alelos considerados raros en la colección (Laurentin, 2009). Esto es de esperarse, ya que las plantas de la colección provienen de una selección artificial de caracteres de interés humano como resultado de la domesticación (Moreira *et al.*, 2015). El Índice de Shannon-Weaver (I) que permite establecer la relación entre la frecuencia de un determinado alelo y el número de individuos en la población en términos de riqueza y uniformidad de su distribución, osciló en un rango entre 0.234 a 1.223, con un valor medio de 0.747 (tabla 3.3), lo que corrobora la alta heterocigosidad y riqueza de diversidad dentro de la colección (Magurran, 1988).

Tabla 3.3 Resumen de la diversidad genética en la colección de achiote. Número de alelos diferentes (Na), número de alelos efectivos (Ne), índice de Shannon (I), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He) y heterocigosidad total esperada (Ht); error estándar entre paréntesis.

| Locus           | N                   | Na                  | Ne                   | I                    | Ho                   | He                   | Ht           |
|-----------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------|
| A2              | 14.5 (4.805)        | 1.50 (0.289)        | 1.341 (0.203)        | 0.296 (0.172)        | 0.118 (0.118)        | 0.201 (0.117)        | 0.349        |
| A3              | 14.0 (4.813)        | 2.00 (0.000)        | 1.617 (0.190)        | 0.518 (0.114)        | 0.439 (0.123)        | 0.350 (0.091)        | 0.417        |
| A5              | 14.3 (4.854)        | 2.25 (0.250)        | 1.949 (0.030)        | 0.722 (0.044)        | 0.815 (0.079)        | 0.486 (0.008)        | 0.510        |
| A9              | 14.5 (4.805)        | 3.50 (0.500)        | 2.923 (0.522)        | 1.073 (0.210)        | 0.678 (0.137)        | 0.600 (0.108)        | 0.699        |
| B1              | 14.3 (4.768)        | 3.00 (0.408)        | 2.405 (0.248)        | 0.941 (0.110)        | 0.415 (0.177)        | 0.570 (0.047)        | 0.712        |
| B4              | 14.5 (4.805)        | 3.25 (0.479)        | 2.682 (0.344)        | 1.015 (0.131)        | 0.985 (0.015)        | 0.609 (0.047)        | 0.686        |
| B5              | 13.3 (4.905)        | 2.25 (0.479)        | 1.837 (0.415)        | 0.583 (0.233)        | 0.337 (0.127)        | 0.362 (0.144)        | 0.450        |
| B10             | 14.5 (4.805)        | 3.50 (0.866)        | 2.732 (0.608)        | 1.017 (0.214)        | 0.806 (0.059)        | 0.588 (0.070)        | 0.674        |
| B12             | 14.3 (4.854)        | 2.50 (0.289)        | 1.989 (0.188)        | 0.772 (0.099)        | 0.589 (0.103)        | 0.485 (0.044)        | 0.612        |
| C5              | 14.3 (4.768)        | 3.25 (0.750)        | 2.466 (0.394)        | 0.950 (0.164)        | 0.856 (0.063)        | 0.568 (0.057)        | 0.662        |
| C12             | 14.0 (4.967)        | 3.00 (0.000)        | 2.633 (0.093)        | 1.025 (0.022)        | 0.553 (0.066)        | 0.619 (0.013)        | 0.658        |
| D1              | 14.5 (4.805)        | 2.00 (0.000)        | 1.990 (0.007)        | 0.691 (0.002)        | 0.950 (0.030)        | 0.497 (0.002)        | 0.499        |
| D2              | 12.5 (4.646)        | 1.75 (0.250)        | 1.464 (0.188)        | 0.417 (0.146)        | 0.396 (0.160)        | 0.279 (0.101)        | 0.317        |
| D7              | 10.0 (3.937)        | 1.50 (0.289)        | 1.208 (0.121)        | 0.234 (0.136)        | 0.179 (0.104)        | 0.147 (0.085)        | 0.163        |
| E12             | 14.0 (4.743)        | 2.00 (0.000)        | 1.566 (0.170)        | 0.510 (0.088)        | 0.484 (0.141)        | 0.337 (0.075)        | 0.367        |
| F1A             | 13.8 (4.939)        | 2.00 (0.000)        | 1.837 (0.084)        | 0.643 (0.028)        | 0.455 (0.067)        | 0.452 (0.027)        | 0.470        |
| F9_2            | 12.8 (4.553)        | 3.50 (0.645)        | 2.833 (0.544)        | 1.059 (0.215)        | 0.699 (0.139)        | 0.590 (0.102)        | 0.665        |
| G3              | 13.5 (4.839)        | 1.75 (0.250)        | 1.513 (0.190)        | 0.441 (0.151)        | 0.096 (0.096)        | 0.300 (0.105)        | 0.337        |
| G4              | 14.5 (4.805)        | 2.75 (0.479)        | 1.985 (0.215)        | 0.763 (0.130)        | 0.730 (0.164)        | 0.474 (0.068)        | 0.532        |
| G11             | 14.0 (4.564)        | 3.00 (0.408)        | 2.733 (0.415)        | 1.016 (0.149)        | 0.523 (0.188)        | 0.607 (0.061)        | 0.746        |
| H3              | 11.8 (4.715)        | 2.00 (0.000)        | 1.723 (0.122)        | 0.597 (0.051)        | 0.297 (0.126)        | 0.410 (0.046)        | 0.481        |
| H7              | 14.5 (4.805)        | 2.00 (0.000)        | 1.929 (0.044)        | 0.674 (0.013)        | 0.836 (0.062)        | 0.481 (0.012)        | 0.487        |
| H10             | 14.5 (4.805)        | 4.25 (0.750)        | 3.215 (0.563)        | 1.223 (0.150)        | 1.000 (0.000)        | 0.666 (0.044)        | 0.737        |
| <b>Promedio</b> | <b>13.8 (0.871)</b> | <b>2.54 (0.109)</b> | <b>2.112 (0.081)</b> | <b>0.747 (0.038)</b> | <b>0.575 (0.035)</b> | <b>0.464 (0.020)</b> | <b>0.532</b> |

Por otra parte, el promedio de la heterocigosidad observada (Ho) para la colección fue 0.575 (tabla 3.3). El locus H10 presentó el valor más alto de Ho (1.000), mientras G3 presentó la más baja (0.096). En cuanto a la heterocigosidad esperada (He) de acuerdo al equilibrio de Hardy–Weinberg, el valor medio de He fue 0.464; los valores variaron de 0.201 (A2) a 0.666 (H10). La probabilidad de que un individuo sea heterocigoto para un loci obtenida por He fue menor que Ho, lo que sugiere una baja presencia de homocigotos. El valor promedio de Ho fue mayor al He, lo que indica un exceso de heterocigotos; sin embargo para algunos loci (A2, B1, B5, C12, G3, G11 y H3) valores de Ho menor a He, indicando un déficit de heterocigotos; esto se ha observado en plantas de colecciones, ya que estas plantas tienen orígenes diversos (sub-población) que son agrupadas en un solo grupo, y se asume su posible diferencia genética dentro de la colección (Dequigiovanni *et al.*, 2017; Dharmarajan *et al.*, 2013). Las medidas de variación genética demostraron que, en la colección de achiote de Yucatán en este estudio, existe alta heterocigosidad. Así mismo, también se encontró heterocigosidad total (Ht) de 0.532 (tabla 3.3), lo que indica que existe segregación

altamente heterocigota que conserva la alta diversidad genética, y mantenida debido al alto grado de entrecruzamiento en el achote (Valdez-Ojeda *et al.*, 2010).

El valor promedio del índice FIS obtenido fue de  $-0.207 (\pm 0.084)$ ; obtenido de un rango de 0.679 (G3) y  $-0.909$  (D1), donde 16 marcadores de los 23 evaluados fueron negativos (tabla 3.4). Este valor negativo confirmó un alto número de heterocigotos con respecto a lo esperado bajo las condiciones de equilibrio Hardy–Weinberg, lo cual era de esperarse al ser una colección construida entre plantas de diferentes poblaciones agrupadas en un solo grupo donde ciertos morfotipos son elegidos y preservados, como con las accesiones de los bancos de germoplasma, que se conoce como el efecto Wahlund (Hartl y Clark 1998). Los Loci SSR con índices positivos (A2, B1, B5, C12, G3, G11 y H3; tabla 3.4) sugieren un mayor número de homocigotos, lo que explica la deficiencia de heterocigotos y sugiere endogamia moderada, lo cual sin duda está relacionado con su sistema de reproducción que tolera auto- y entrecruzamiento, y a la visita de flores contiguas de una misma planta por parte de los polinizadores (Joseph *et al.*, 2012; Valdez-Ojeda *et al.*, 2010; Isabel *et al.*, 1995). El promedio de FIT presentó un valor de  $-0.072$  (0.086), corroborando un efecto nulo de la endogamia en la colección evaluada.

El índice de fijación de Wright ( $F_{st}$ ) compara  $H_e$  y  $H_o$ , y es una medida del grado de fijación alélica; Los valores  $F_{st}$  variaron de 0.003 (D1) a 0.424 (A2) (tabla 3.4), de los cuales fueron significativamente diferentes en dieciocho loci SSR (78.3 %). El promedio de  $F_{st}$  fue de  $0.127 (\pm 0.018)$  (tabla 3.4), lo cual indica una moderada diferenciación genética dentro de la colección y sugiere que las plantas estudiadas son muy parecidas genéticamente, debido probablemente a la selección humana por rasgos de interés (domesticación; Ambrosio-Moreira *et al.*, 2015) y/o cuestiones históricas (polimorfismos ancestrales), es decir, existe la posibilidad de que los genotipos colonizadores provengan de una misma fuente (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008). El grado de diferenciación indica que el 12.7% de la variación se debe a diferencias entre poblaciones, y el resto de la variación entre individuos (altos valores de heterocigosidad).

El flujo génico ( $N_m$ ) presenta un valor promedio de  $6.879 (\pm 4.010)$  (tabla 3.4). El valor de  $N_m$  mayor a unidad indica que existe alto flujo génico dentro de una población (Slatkin, 1987), por lo que el 91.3% de los loci evaluados presentaron alto flujo génico. Estos valores mayores a 1 contrarrestan la fuerza de la deriva genética y proporcionarán lugar a la

homogeneización donde el intercambio de individuos contribuyen a la migración y se integran en la estructura de la población; para valores menores de 1, la deriva genética dará como resultado una diferenciación de la población, que se observó de manera moderada. Desde una perspectiva evolutiva, la moderada diferenciación y el alto flujo genético, evidencia el impacto en la estructura de la población, y por lo tanto, se interpreta compartición de alelos por descendencia común o por homoplasia que se interpreta como evidencia de flujo genético (González Chavarro *et al.*, 2016).

Tabla 3.4 Estadística de índice de fijación (F) obtenidos para cada uno de los 23 loci SSR en la colección de achote. Los valores presentados por coeficiente de endogamia (Fis); coeficiente de endogamia total (Fit); coeficiente de diferenciación genética (Fst) y significancia del valor P (\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001); y tasa de flujo génico estimada (Nm).

| Locus           | Fis            | Fit            | Fst           |     | Nm            |
|-----------------|----------------|----------------|---------------|-----|---------------|
| A2              | 0.415          | 0.663          | 0.424         | *** | 0.339         |
| A3              | -0.256         | -0.053         | 0.161         |     | 1.298         |
| A5              | -0.675         | -0.597         | 0.046         |     | 5.143         |
| A9              | -0.129         | 0.031          | 0.142         | *** | 1.515         |
| B1              | 0.273          | 0.418          | 0.200         | *** | 1.001         |
| B4              | -0.617         | -0.437         | 0.112         | *** | 1.990         |
| B5              | 0.069          | 0.250          | 0.194         | *** | 1.039         |
| B10             | -0.370         | -0.196         | 0.127         | *** | 1.721         |
| B12             | -0.215         | 0.038          | 0.208         | *** | 0.952         |
| C5              | -0.508         | -0.293         | 0.142         | *** | 1.506         |
| C12             | 0.106          | 0.160          | 0.060         | *** | 3.943         |
| D1              | -0.909         | -0.904         | 0.003         | *** | 93.085        |
| D2              | -0.418         | -0.247         | 0.121         | *** | 1.817         |
| D7              | -0.219         | -0.098         | 0.099         | *   | 2.278         |
| E12             | -0.436         | -0.319         | 0.081         |     | 2.831         |
| F1A             | -0.007         | 0.033          | 0.039         | **  | 6.195         |
| F9_2            | -0.185         | -0.051         | 0.112         |     | 1.976         |
| G3              | 0.679          | 0.715          | 0.111         | *   | 2.006         |
| G4              | -0.540         | -0.373         | 0.108         | **  | 2.057         |
| G11             | 0.140          | 0.299          | 0.185         | *** | 1.098         |
| H3              | 0.274          | 0.381          | 0.147         |     | 1.446         |
| H7              | -0.739         | -0.718         | 0.012         | *** | 20.637        |
| H10             | -0.501         | -0.357         | 0.096         | *** | 2.344         |
| <b>Promedio</b> | -0.207 (0.084) | -0.072 (0.086) | 0.127 (0.018) |     | 6.879 (4.010) |

La alta heterocigosidad muestran diferencias de frecuencias génicas en el espacio geográfico. Si estas diferencias donde las subpoblaciones no intercambian genes (en forma de migrantes o granos de polen que fecunden a individuos de otras subpoblaciones), entonces cada una de ellas puede evolucionar independientemente y con el tiempo dar lugar a nuevas especies (González Chavarro *et al.*, 2016). Por lo que se analizó la existencia de estructura genética poblacional debido a que las poblaciones que presenten estructuración, pueden diversificar y diferenciarse genéticamente.

*Estructura genética poblacional*

Los parámetros de diversidad obtenidos a partir del origen de la colecta del achiote se muestran en la tabla 3.5. Los altos porcentajes de loci polimórficos (P), con un promedio de 92.39%, pueden ser atribuidos a la baja homocigosidad encontrada en diferentes genotipos, y por lo tanto, la heterocigosidad puede ser considerada como un indicativo de la existencia de variabilidad genética. La P de Temozón (TEM) presento el valor más bajo y valores para los otros grupos (Chan Dzinup, TKC; Chicxulub, CHP; y Mérida, MID) mostraron altos valores. El promedio de heterocigosidad observada ( $H_o$ ) fue de 0.576 con un intervalo de 0.479 (TEM) a 0.690 (TKC) y el de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) de acuerdo al equilibrio de Hardy–Weinberg fue de 0.464 con un intervalo de 0.361 (TEM) a 0.521 (CHP). En todas las poblaciones la heterocigosidad observada fue mayor que la esperada, indicando exceso de individuos heterocigotos, corroborada con los valores del PIC.

Tabla 3.5 Parámetros de diversidad genética en grupos a partir del origen de la colecta del achiote. Valores promedios de porcentaje del polimorfismo (P), número de las heterocigosidades observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), y contenido de información polimórfica (PIC).

| Población         | Tamaño      | P            | $H_o$        | $H_e$        | PIC          |
|-------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Chan Dzinup (TKC) | 26          | 95.65        | 0.690        | 0.491        | 0.566        |
| Temozón (TEM)     | 12          | 82.61        | 0.479        | 0.361        | 0.699        |
| Chicxulub (CHP)   | 17          | 95.65        | 0.597        | 0.521        | 0.660        |
| Mérida (MID)      | 3           | 95.65        | 0.536        | 0.483        | 0.649        |
| <b>promedio</b>   | <b>14.5</b> | <b>92.39</b> | <b>0.576</b> | <b>0.464</b> | <b>0.643</b> |

Estos resultados pueden ser explicados por una inmigración importante que conduce a la heterogamia, así también, una selección a favor de individuos heterocigotos (selección sobre-dominante), la naturaleza de entrecruzamiento de la especie, el estado de domesticación de los genotipos analizados, entre otros factores (Pech-Hoil et al 2017). Lo anterior se ve reflejado en el elevado valor de heterocigosidad obtenidos en el presente trabajo, así como el grado de loci polimórficos, lo cual es de suma importancia para explotar el potencial genético de la especie, el conocimiento de la variabilidad genética, la identificación de genotipos élites hacia mejorar la base genética del cultivo del achiote.

La matriz de distancias genéticas a partir del coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ( $F_{st}$ ) calculada entre pares para las cuatro poblaciones de achiote indicaron una diferencia genética de moderada a alta (tabla 3.6). Para las muestras de poblaciones

examinadas, los valores más altos de diferenciación genética sobre el pool genético fue indicado entre las poblaciones de Mérida y Temozón ( $F_{st}=0.163$ ), y la menor diferenciación se observó entre Mérida y Chicxulub ( $F_{ST}=0.051$ ).

Tabla 3.6 Multilocus estimado de  $F_{st}$  por pares (abajo) y valores de  $P F_{st}$  (arriba) de 23 loci SSR a partir del origen de la colecta del achiote. ChanDzinup (TKC), Temozón (TEM), Chicxulub (CHP) y Mérida (MID).

| <i>TKC</i> | <i>TEM</i> | <i>CHP</i> | <i>MID</i> |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|
|            | 0.002      | 0.002      | 0.021      | <i>TKC</i> |
| 0.104      |            | 0.001      | 0.005      | <i>TEM</i> |
| 0.095      | 0.064      |            | 0.063      | <i>CHP</i> |
| 0.160      | 0.163      | 0.051      |            | <i>MID</i> |

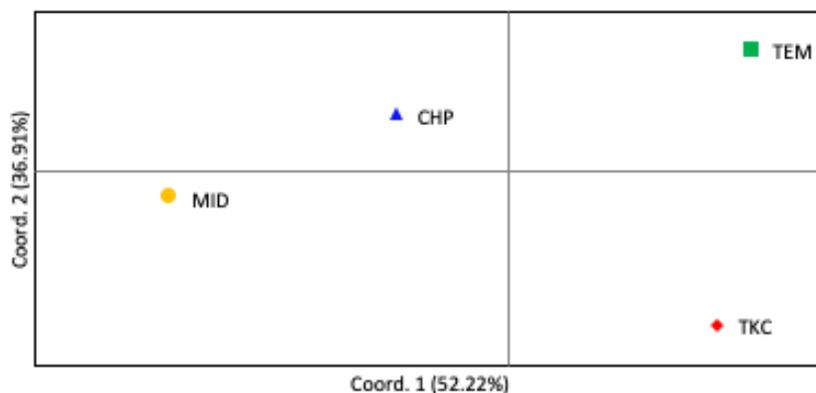


Figura 3.4 Análisis de coordenadas principales (PCoA). Gráfica basada en los valores del índice de  $F_{st}$  por pares entre poblaciones ChanDzinup (TKC), Temozón (TEM), Chicxulub (CHP) y Mérida (MID).

El análisis de coordenadas principales indica las tendencias de agrupamiento para algunas poblaciones a partir del origen de la colecta del achiote. Los datos obtenidos gráficamente mostraron una agrupación entre Mérida y Chicxulub (fig. 3.4), las cuales se agruparon del lado izquierdo; las poblaciones de Temozón y Chan Dzinup se mantuvieron aisladas de las agrupaciones, observadas en los extremos izquierdos superior e inferior, respectivamente (fig. 3.4).

El AMOVA reveló que el 20% de la variación genética estaba entre poblaciones, y el 80% restante estaba dentro de los individuos ( $p = 0.001$ ), lo que demuestra que, aunque la mayor parte de la diversidad está dentro de la colección como individuos, la variación debida a la subdivisión de las poblaciones fue significativa (tabla 3.7).

Tabla 3.7 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) realizado para 23 loci SSR de la colección de achiote. Datos de grados de libertad (gL), suma de cuadrados (SC), media cuadrática (CM), estimación de la varianza (EV) y porcentajes (%).

| Fuente            | gL  | SC      | CM     | EV    | %    |
|-------------------|-----|---------|--------|-------|------|
| Entre Población   | 3   | 67.106  | 22.369 | 1.658 | 20%  |
| Entre Individuos  | 54  | 294.687 | 5.457  | 0.000 | 0%   |
| Dentro Individuos | 58  | 396.500 | 6.836  | 6.836 | 80%  |
| Total             | 115 | 758.293 |        | 8.494 | 100% |

La diferenciación entre las agrupaciones permitió el análisis de alelos exclusivos correspondientes a una población conocidos como alelos privados y son indicativos del flujo génico entre las poblaciones que se analizan. Las accesiones a partir del origen de la colecta mostraron un total de 8 alelos privados distribuidos entre las poblaciones (tabla 3.8). Alelos del Locus H10 presentó dos alelos privados, un alelo (300 pb) con frecuencia alta de 33% y otro (242 pb) en baja frecuencia con 2.9%. Alelos privados de los *Locus* B5 (252) y A5 (247 pb), presentaron mayor frecuencia 26.9% y 17.7%, respectivamente. Alelos privados de los *Locus* B5 (290 pb), C5 (242 pb), F9\_2 (310 pb) y H10 (242), con frecuencia de 3.9% en promedio.

Los mayores valores de alelos privados se observaron en la población Chicxulub, con un total de 6, algunos de los cuales se encuentran en frecuencias elevadas, llegando en un caso a ser de 0.147; también, 1 alelo de la población Mérida y 1 en Chan Dzinup, presentaron altos valores en la frecuencia, 0.333 y 0.269, respectivamente (tabla 3.8).

Tabla 3.8 Lista de alelos privados por origen de la colecta de achiote. Poblaciones ChanDzinup (TKC), Temozón (TEM), Chicxulub (CHP) y Mérida (MID).

| Origen | Locus | Alelo | Freq  |
|--------|-------|-------|-------|
| TKC    | B5    | 252   | 0.269 |
| CHP    | A5    | 247   | 0.147 |
| CHP    | B5    | 290   | 0.033 |
| CHP    | C5    | 242   | 0.031 |
| CHP    | F9_2  | 310   | 0.042 |
| CHP    | G4    | 221   | 0.059 |
| CHP    | H10   | 242   | 0.029 |
| MID    | H10   | 300   | 0.333 |

El número de alelos privados en las poblaciones de Mérida y Chicxulub, relacionado a la agrupación por distancia genética, muestra la idea de una diferenciación relacionada de

origen común y antigua, y probablemente se debe a la distancia geográfica entre las poblaciones que muestra un limitado flujo genético (Lowe y Allendorf, 2010). La población de Chicxulub presentó alelos privados en frecuencias bajas, y relacionado al alto polimorfismo, lo que indica una reciente colonización (Nei et al., 1975).

El porcentaje de alelos privados encontrados podría estar relacionado con el porcentaje de loci polimórficos (P), ya que todos los loci estudiados para las poblaciones estudiadas mostraron un 92.39% de polimorfismo. Por lo que es importante resaltar que la selección de los marcadores SSR fue determinada por los trabajos previos de diseño y descripción de los SSR disponibles como los más polimórficos dentro de sus investigaciones (Dequigiovanni *et al.*, 2014; Dequigiovanni *et al.*, 2017; Dequigiovanni *et al.*, 2018a). Así mismo, es importante destacar que la especie posee un rango de distribución muy amplio, el presente trabajo se centra únicamente en la región del estado de Yucatán, siendo una pequeña porción del total y de tamaño de muestra variable, por lo que la diversidad genética analizada es únicamente representativa de esa región.

### **3.3.2 Análisis de similitud y variación genética.**

El análisis de conglomerados basado en la distancia de Kosman y el algoritmo de unión de vecinos cercano mostró una distribución heterogénea de los individuos, aunque se observaron conglomerados discretos entre individuos y agrupamientos por lugar de origen (Fig. 3.5). Las accesiones del grupo de plantas de sitio de colecta Chan Dzinup (A001 al A026), con excepción de algunas accesiones (A018, A025 y A026), mostraron discreto agrupamiento; mientras, las accesiones de entre los sitios de colecta restantes (A027 al A058) formaron grupos más heterogéneos y diferente entre ellos.

La distribución heterogénea de la colección cumple el papel de colección, comportamiento similar es observado en bancos de germoplasma, que son utilizados como fuente genética para materiales de conservación y diversificación de especies de cultivadas donde la base genética de los cultivares mejorados es lo suficientemente limitada (Dequigiovanni *et al.*, 2017; Kalivas *et al.*, 2011). Cabe mencionar que la intención desde la colecta del materia fue seleccionar materiales que presentaran mayores diferencias morfológicas.

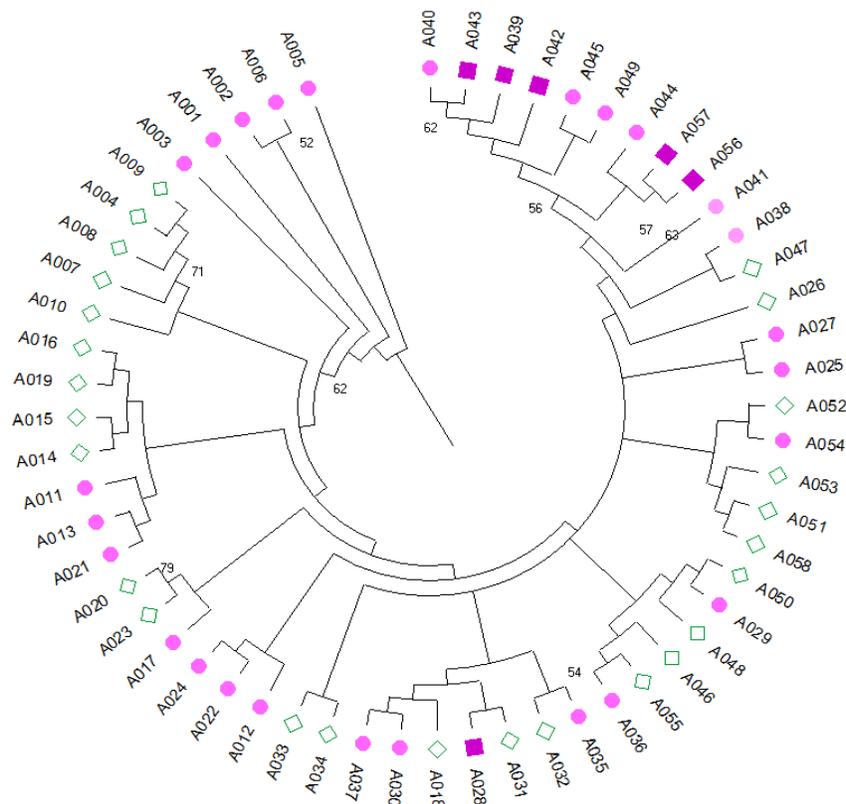


Figura 3.5 Árbol de unión de vecino cercano (NJ) de 58 accesiones de achote (coloreadas por fenotipo de flor), construidas con la distancia de Kosman en base a 23 loci SSR.

El análisis genético mostró agrupamiento por lugar de origen, sugiriendo una alta similitud genética con respecto a su origen, lo que fue observado también por Valdez-Ojeda et al (2008) estudiando la variación genética de dos poblaciones de Yucatán, Cooperativa y Yaxcabá. La variación heredada de los caracteres morfológicos observados no influyeron en la formación de los grupos. Similares resultados, sugieren una base genética diversa debido a las introducciones independientes de plantas en cortos periodos de tiempo y/o de lote de semillas con rasgos agronómicos deseables (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008). Así mismo, la formación de grupos distintos sugiere una diferenciación entre las accesiones evaluadas en función de su constitución genética y/o la existencia de cruzas entre individuos estrechamente relacionados (Dequigiovanni *et al.*, 2017; Valdez-Ojeda *et al.*, 2008; Rivera-Madrid *et al.*, 2006).

En el análisis de PCoA, el 29.43 % de la variación total fue obtenida de las dos primeras coordenadas principales y mostraron tendencias de agrupamiento a los lugares de origen

entre las accesiones de achiote. Accesiones de la colección de Chicxulub y Mérida tienden a formar un grupo separado de las accesiones del Chan Dzinup y de Temozón, agrupadas principalmente hacia de lado izquierdo sobre la primera coordenada principal (Fig. 3.6). Accesiones de Chan Dzinup formaron un grupo, lo que probablemente se debe a una estructura genética relacionada, debido a pocas fuentes introducidas de las accesiones, a diferencia de las accesiones provenientes sistemas agronómicos tradicionales (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008).

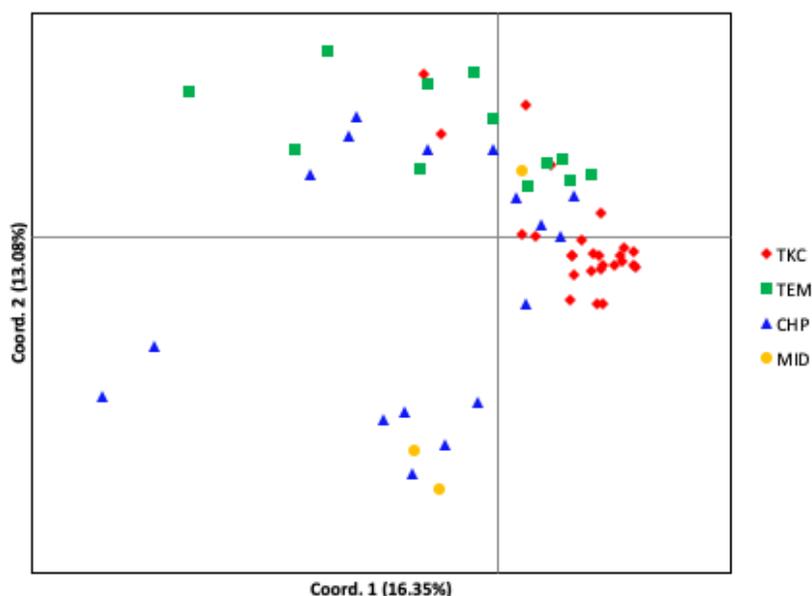


Figura 3.6 Análisis de coordenadas principales de la dispersión de los 58 accesiones de achiote evaluado con 23 marcadores de SSR. Poblaciones ChanDzinup (TKC), Temozón (TEM), Chicxulub (CHP) y Mérida (MID).

Con el fin de obtener mayor información respecto de las agrupaciones genéticas para valorar la diversidad genética de la colección, el Software STRUCTURE modeló el número de grupos genéticos obtenidos en el análisis Bayesiano con todas las sub-poblaciones. El análisis correspondiente a Delta K=2, mostró que las accesiones de la colección se agruparon de forma diferente en dos grupos genéticos, el grupo de mayor predominancia fue representado por un 77.6% (fig. 3.7, de color verde) y distribuido en las todas las poblaciones (ChanDzinup, Temozón, Chicxulub y Mérida); mientras que el otro grupo representado por el 17.3% (fig. 3.7, de color rojo), es distribuido en las poblaciones de Chicxulub y Mérida. Así también hubo un 5.1% de individuos que presentaron una configuración mezclada y se distribuyeron en todos los sitios (fig. 3.7).

El número de grupos genéticos con el modelo de Evanno *et al.* (2005), revela el promedio de cambio en la probabilidad logarítmica entre valores de K sucesivos (fig. 3.8). El cual determinó que la subdivisión óptima corresponde a Delta K=2 (fig. 3.7).

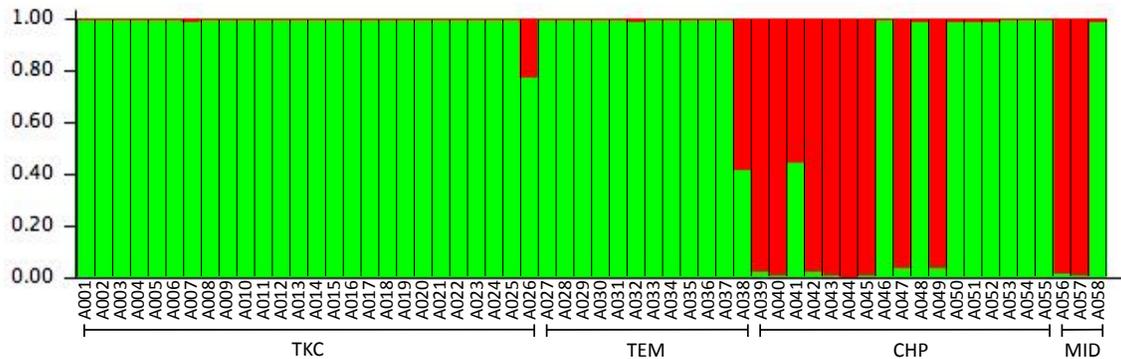


Figura 3.7 Estructura demográfica estimada de 58 accesiones de achote. Cada organismo está representado por una línea vertical, que está dividida por segmentos de colores que representan el porcentaje de cada asociación estimada de cada K. El número de accesiones aparecen abajo.

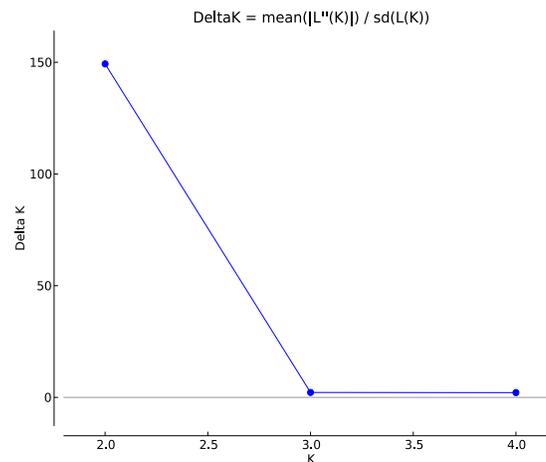


Figura 3.8 Modelación del número de grupos genéticos usando el software STRUCTURE. Delta K, calculada de acuerdo con Evanno *et al.* (2005).

El análisis genético indicó dos grandes grupos dentro de la colección que contienen accesiones diferentes genéticamente, y sugiere que esta diferenciación es el resultado de los agricultores (presión de selección) a ciertos morfotipos con características deseables y, por ende, de diferentes fuentes o introducidas independientemente en diferentes momentos (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008). Este comportamiento contribuye a la alta variabilidad genética que pueden expresarse en una amplia gama de variaciones fenotípicas potencialmente

útiles para una mayor selección de características (McCouch, 2004) y aumenta la posibilidad de explotación de la diversidad genética en procesos de reproducción con parentales genéticamente diversos (Dequigiovanni *et al.*, 2017; Joseph y Siril, 2014).

### 3.3.3 Determinación genética de la *Boβ-LCY1*

La caracterización genética de la *Boβ-LCY1* permitió la detección de tres genotipos, patrones específicos para cada grupo de plantas fue observado en la colección de achote (Trujillo-Hdez *et al.* 2016), (fig 3.9). Los patrones de bandas observados mostraron diferencias dentro de los grupos a partir del origen de la colecta de la colección y correspondieron a los haplotipos reportados por Trujillo-Hdez *et al.* (2016), permitiendo la identificación de los tres haplotipos en función del gen *Boβ-LCY1*. Con base a la determinación anterior, los perfiles electroforéticos de las accesiones de Chandzinup y Temozón, correspondieron al haplotipo A, mientras que las accesiones de Mérida al haplotipo A y C; Las accesiones de Chicxulub fueron el grupo más variable y presentaron los tres haplotipos (A, B, y C) (datos no mostrados). La mayoría de las accesiones correspondieron al haplotipo A, distribuido en un 81.8% de la colección; mientras, un grupo compacto se observó para los haplotipos B y C, distribuido en 10.3% y 6.9%, respectivamente.

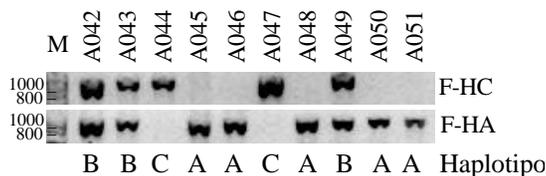


Figura 3.9 Heterocigosidad de la *Boβ-LCY1* en diez accesiones de achote. F-HC presente en los genotipos C y B. F-HA presente en los genotipos A y B.

La heterocigosidad de este gen es relacionado a rendimientos de contenido de bixina y características morfológicas del fenotipo de flor y fruto; de las cuales, características de flor de tonalidades rosa y fruta verde/rojo del grupo HB son relacionadas al mayor rendimiento de bixina, en comparación a los menores rendimientos de los grupos HA y HC, de características opuestas en flor, entre blanca a rosa, y fruto verde a rojo (Trujillo-Hdez *et al.*, 2016). En el presente trabajo, los datos de bixina obtenidos (capítulo II) muestran dicha correlación (fig. 3.10 a). El contenido de bixina fue mayor en el HB con un promedio de 37.3

mg•gPS<sup>-1</sup> ( $\pm 3.1164$ ), mientras HA y HC presentaron menores contenidos de bixina, con un promedio de 26.8 ( $\pm 0.5984$ ) mg•gPS<sup>-1</sup> y 23.1 ( $\pm 0.1050$ ) mg•gPS<sup>-1</sup>, respectivamente. Sin embargo, en cuanto a las características morfológicas del fenotipo no se correlacionaron en las poblaciones de Chan Dzinup y Temozón. Lo que sugiere una probable respuesta de su domesticación (Ambrosio-Moreira *et al.*, 2015), inintencionado, debido a su alto grado de heterocigosidad que ha llevado a una respuesta de variación aditiva (alelos aditivos) semi-dominante e híbrida entre parentales divergentes (Ding *et al.*, 2014) y/o una cuestión de ancestría genética, ya que las plantas provienen de diversos orígenes (Dequigiovanni *et al.*, 2018).

La actividad enzimática de Bo $\beta$ -LCY1 es propuesta clave en la biosíntesis y regulador en la producción de bixina (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015). Por lo tanto, el polimorfismo del gen (Trujillo-Hdez *et al.*, 2016) se ha relacionado a la biosíntesis de metabolitos cíclicos, como ABA (Rodríguez-Ávila *et al.*, 2011), o bien, promoviendo la acumulación de licopeno, principal precursor hacia la síntesis de bixina (Bouvier *et al.*, 2003). Sin embargo, la heterocigosidad del gen ha manifestado correlación con el polimorfismo enzimático, sugiriendo variación aditiva para la producción de bixina (Trujillo-Hdez *et al.*, 2016).

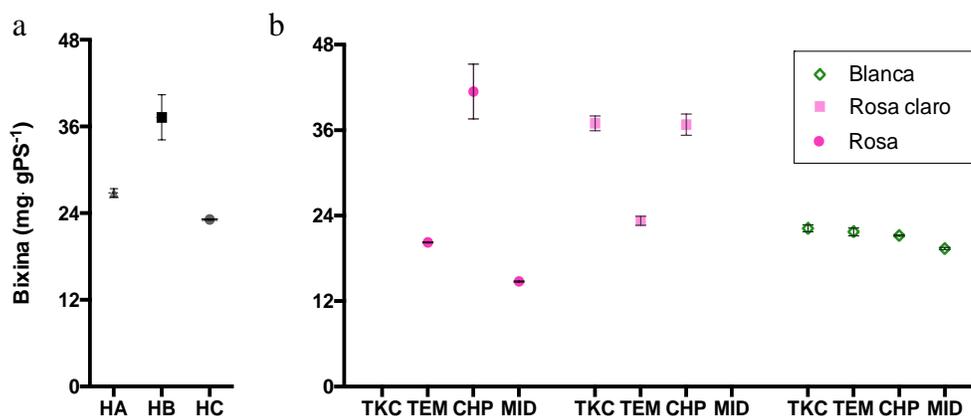


Figura 3.10 Variación en el contenido de bixina en la colección de achiote. Determinación de haplotipos A (HA), B (HB) y C (HC) vs Bixina (a); a partir del origen de la colecta por fenotipo de flor del achiote en las poblaciones de ChanDzinup (TKC), Temozón (TEM), Chicxulub (CHP) y Mérida (MID) vs Bixina (b).

En el presente trabajo, la heterocigosidad en *Bo $\beta$ -LCY1* relacionado a los mayores rendimientos de bixina, como lo muestran algunas accesiones de la colección de plantas

correspondientes al grupo HB, sugieren su posible uso como herramienta útil de temprana y eficiente relacionada a altos rendimientos del pigmento, y característica deseable para mejorar los rendimientos e identificación de parentales hacia mejoramiento genético de la especie (Akshatha *et al.*, 2011). Lo que se sugiere aumentar el número en la colección sobre material de posibles acervos diferentes para obtener mayor número de los grupos HB, material de posible interés agronómico, por lo que se requiere una mayor caracterización genética de este gen para comprender los mecanismos asociados a la producción del pigmento, así como otros compuestos de interés humano.

### **3.4 CONCLUSIONES**

Los resultados mostraron una alta variación genética en la colección de plantas de achiote, corroborado por los altos niveles en los parámetros de diversidad genética revelados por 23 marcadores SSR.

La colección de plantas mostraron acervos genéticos diferentes, altamente estructurada, corroborada con los niveles de endogamia moderadas y alto flujo genético. Curiosamente, las accesiones correspondientes a los sitios de colecta Chicxulub y Mérida, exhibieron los niveles más altos de diversidad genética, y a su vez, asociadas a mayores rendimientos de pigmento bixina, característica clave en este cultivo; estos materiales son muy prometedores para ser utilizados como material élite y de uso en procesos de selección de parentales para una descendencia con características agronómicas deseadas con el fin de conservación y mejoramiento genético en función al mayor rendimiento y más homogénea de los metabolitos secundarios producidos por esta especie, principales limitantes del cultivo.

La colección mostró alta diversidad con variantes locales, corroborado por un alto flujo genético que contribuyó a una moderada diferenciación entre los grupos de la colección, y determinó una base genética estrecha, por lo que se requiere el estudio de poblaciones adicionales que contribuyan a una mejor comprensión de la distribución de la diversidad genética en este país e incentiven la explotación comercial de este recurso en función a caracteres de rendimientos y otros componentes de interés para el hombre.

## CAPÍTULO IV

### CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL SISTEMA DE APAREAMIENTO DEL ACHIOTE (*Bixa orellana* L.) EN SISTEMAS AGRÍCOLAS.

Variation in the mating system of *Bixa orellana* L. (achiote) under three different agronomic systems (<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.05.031>)

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas domesticadas exhiben una variedad de sistemas de apareamiento, que van desde el entrecruzamiento (*outcrossing*) obligatorio, la autofecundación o apomixis (Ross-Ibarra *et al.*, 2007), o bien, entrecruzamiento predominante (Miller y Gross, 2011) o autocruza predominantes (Sousa *et al.*, 2012). Estos sistemas conducen a la evolución de los rasgos reproductivos y florales (Vogler y Kalisz, 2001; Eckert y *et al.*, 2009), es decir, se mantienen según la biología reproductiva de la especie (sistemas sexuales, sistemas genéticos de autoincompatibilidad y patrones de floración), así como los factores ecológicos y ambientales que afectan a la dispersión de polen a través de polinizadores o viento (Clegg, 1980; Hamrick y Murawski, 1990) y, por lo tanto, las frecuencias de cruzamiento (Schemske y Lande, 1985; Wolff *et al.*, 1988).

En los sistemas agrícolas, las prácticas del inter-cultivo y el intercambio de semillas resulta en altas tasas de entrecruzamiento en los cultivos domesticados (Barnaud *et al.*, 2008). En América Latina, los sistemas agrícolas son considerados ecosistemas domesticados de alta biodiversidad que varían de los sistemas tradicionales a las plantaciones comerciales (Altieri, 1992; Altieri 2009). Los sistemas tradicionales optan por cultivos intercalados y dirigido al autoconsumo, mientras, un aumento de la productividad de un cultivo principal que domina el sistema agrícola son considerados plantaciones comerciales (Altieri, 2009). Desde la época prehispánica, el policultivo fue el principal sistema agrícola de autoconsumo, con agricultura itinerante, cíclica y de larga duración (Hernández-Xolocotzi *et al.*, 1995; Cuanalo y Guerra, 2008). Actualmente, se establecen los monocultivos o sistemas de cultivo extensivo “más moderno”, plantaciones de varias hectáreas con requerimientos de insumos como fertilizantes, control de plagas y riego, típicamente integrada por diferentes variantes de una sola especie, asociadas frecuentemente a otras especies de árboles frutales (Cuanalo y Uicab, 2005).

*Bixa orellana* L. (familia Bixaceae) es valorada por sus semillas de coloración intensa, que sirven como colorante en diversos materiales alimentarios (Bittencourt *et al.*, 2005; Joseph *et al.*, 2010), sin embargo, es considerada una especie adaptada al entrecruzamiento y propagada convencionalmente por semillas (Joseph *et al.*, 2012), lo que resulta en la variación de los rendimientos, faltos de cultivares altamente productivos, y carentes de selecciones mejoradas con base científica, por lo que la evidencia de intentos de selección previa fue establecida con base a las características fenotípicas y mezcla de tipos de achiote (Leal y Michelangeli, 2010; Joseph *et al.*, 2010). En México, es conocida como achiote y su cultivo es realizado pequeños agricultores, cuya producción se destina al consumo local y no es suficiente para satisfacer a la industria local (consumo entre 100 y 150 toneladas/año) que es empleado principalmente como colorante alimentario y especia (Godoy, 2000). En Yucatán, las semillas son obtenidas de sistemas agronómicos tradicionales (en lo sucesivo, policultivo y solares) y ensayos de plantaciones extensivas (en lo sucesivo, monocultivo), que principalmente difieren en la extensión del campo, prácticas de manejo y diversidad biológica entre la densidad del achiote (Valdez-Ojeda *et al.*, 2010; Cuanalo y Guerra, 2008).

Debido al potencial económico y comercial del cultivo de *B. orellana*, el presente estudio tiene como objetivo caracterizar los sistemas de apareamiento de esta especie en diferentes sistemas agrícolas; las accesiones de achiote fueron caracterizados previamente por Rivera-Madrid *et al.* (2006) y Valdez-Ojeda *et al.* (2008) en dos fenotipos: 1) plantas con flores blancas, frutos indehiscentes y menor contenido de pigmentos y 2) plantas de flor rosa, frutos dehiscentes y mayor contenido de pigmentos. Debido a las diferencias en las tasas de cruzamiento entre los dos fenotipos, informados previamente por Valdez-Ojeda *et al.* (2010), en este estudio también se realizaron comparaciones entre los fenotipos dentro de cada sistema agrícola. Los resultados de este estudio, serán considerados para el mejoramiento en el cultivo del achiote.

## **4.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1 Material vegetal y sistemas agronómicos.**

Las semillas de *B. orellana* se obtuvieron de sistemas agronómicos presentes en el estado de Yucatán: a) solares traseros de la región sur del estado, b) policultivos de la región este;

y c) monocultivo de la región noreste (Fig. 4.1).

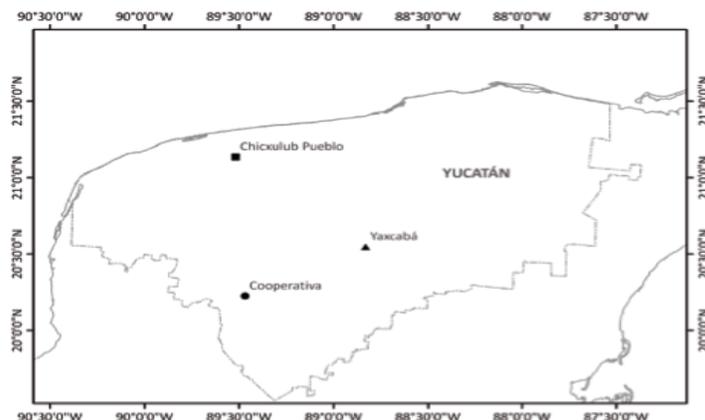


Figura 4.1 Sitios de recolección de achiote (*Bixa orellana* L.) en el estado de Yucatán, México.

Se tomaron muestras de doce solares en el municipio de Yaxcaba, ubicado a  $20^{\circ} 19'$  y  $20^{\circ} 49'$  N y  $88^{\circ} 36'$  a  $88^{\circ} 56'$  W. En estos solares, el achiote crece junto a árboles nativos de usos múltiples (como *Brosimum alicastrum* Sw., *Annona cherimola* Mill., *Spondias purpurea* L. y *Cordia dodecandra* A.DC.), árboles frutales introducidos (*Citrus* spp.) y otros vegetales como los chiles (*Solanum* spp.), cilantro (*Coriandrum sativum* L.) y ornamentales. Se tomaron muestras de una a dos plantas de *B. orellana* en los solares de Yaxcaba para obtener una muestra final de 20 plantas. Se observaron parcelas de policultivo en Cooperativa en el municipio de Oxkutzcab, ubicado entre  $20^{\circ} 21'$  y  $19^{\circ} 58'$  N y  $89^{\circ} 22'$  y  $89^{\circ} 46'$  W. En las parcelas de policultivos, el maíz, la calabaza y el frijol se siembran como cultivos principales, rodeados de árboles frutales (*Citrus* spp., *Pouteria sapota* (Jacq.) HE Moore & Stearn, entre otros) y palmas de guano (*Sabal* spp.), que se utilizan para construir techos de casas mayas. Aproximadamente 20-30 plantas en cada parcela se mezclaron con árboles frutales y palmas sembradas con al menos 3 m de separación. Un total de 20 árboles fueron muestreados en ocho parcelas diferentes. Adicionalmente, las muestras de semillas se obtuvieron de la región noreste ubicada a  $21^{\circ} 08'$  y  $21^{\circ} 13'$  N y  $89^{\circ} 30'$  y  $89^{\circ} 35'$  W en la localidad de Chicxulub Pueblo, donde se estableció una plantación comercial de achiote "La Extra" en un terreno de 4 Ha (Fig. 1). En esta plantación, los árboles se separaron con al menos 3m de separación. Veinte familias genéticas de 10 individuos sometidos a polinización abierta (OP) se seleccionaron al azar para las pruebas de progenie de 2007 a 2012. La población total consistió en 200 individuos de cada sistema agronómico.

Entre los árboles muestreados, seleccionamos de ambos fenotipos previamente caracterizados (Fig. 4.2) para comparar el sistema de apareamiento de diferentes fenotipos florales.



Figura 4.2 Variación morfológica en flor y fruto del achiote. (a) planta adulta; (b) fenotipo de flor blanca, fruto inmaduro verde, semillas inmaduras. (c) fenotipo de flor blanca, frutos inmaduros rojo, semillas inmaduras.

### 4.2.2 Aislamiento de DNA y procedimiento polimorfismo amplificado de secuencia relacionada (SRAP).

Un total de 100 mg de tejido foliar se obtuvo de plántulas entre 2 a 4 meses de edad. El tejido se pulverizó con nitrógeno líquido. El ADN genómico se obtuvo utilizando el paquete comercial Mini Kit DNeasy Plant (Qiagen, Inc., Valencia, CA, EE. UU.).

El protocolo SRAP (Li y Quiros, 2001) se implementó utilizando 10 pares de cebadores (Tabla 4.1), seleccionados en función del polimorfismo amplificado observado de diferentes combinaciones de cebadores (Valdez-Ojeda *et al.*, 2010). Cuarenta y seis bandas (*loci*) polimórficas fueron detectadas y utilizadas en el estudio de apareamiento. Para el análisis SRAP, los cebadores en sentido se etiquetaron con IRDye 800 o IRDye 700 (Li-Cor, Lincoln, NE) y fueron utilizados para una reacción de PCR de 15  $\mu$ L que contiene 1.5  $\mu$ L de buffer de PCR, 1.2  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (25 mM), 0.3  $\mu$ L de dNTP (6.25 mM), 1.0  $\mu$ L de cebador en sentido (1 mM), 1.0  $\mu$ L de cebador antisentido (1 mM), 0.02  $\mu$ L (1 unidad) de enzima comercial ADN polimerasa Taq Platinum (Invitrogen 10966-030), 1.0  $\mu$ L de ADN genómico (10 ng), y 8.0

$\mu\text{L}$  de ddH<sub>2</sub>O, y se realizó la amplificación bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94°C durante 2 min; 5 ciclos de 94°C durante 30s, 35°C durante 30s y 72°C durante 1 min; 35 ciclos de 94°C durante 30s, 50°C durante 30s y 72°C durante 1 min; seguido de una extensión final de 72°C durante 2 min. Los productos de PCR se les añadieron Blue Stop Solution (LI-COR, Lincoln, NE) antes de la desnaturalización a 94°C durante 5 min, y se mantuvieron en frío (10:1.5 v/v). La electroforesis se realizó en un secuenciador de ADN IR2 4300 (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, EE. UU.), utilizando 0,8  $\mu\text{l}$  de la mezcla reactiva en geles de acrilamida (gel matriz KB 6.5%, Li-Cor, Biosciences) con buffer TBE 1X. Cada banda por combinación de cebadores se consideró como un locus. Los pares de cebadores detectaron al menos tres a cinco bandas polimórficas en el ADN genómico de las muestras parentales se seleccionaron para su uso en el análisis de sistemas de apareamiento. Para el análisis de los datos, se construyó una matriz para cada uno de los sistemas agronómicos y para cada fenotipo dentro de los tres sistemas agronómicos. Las matrices fueron construidas en base a la presencia o ausencia de bandas.

Tabla 4.1 Combinaciones de cebadores y secuencias de cebadores SRAP.

| Combinación        | Secuencias                                  |
|--------------------|---|
| <b>Dc1 – Me7</b>   | TAAACAATGGCTACTCAAG – TGAGTCCTTTCCGGTCC     |
| <b>Em2 – Odd38</b> | GACTGCGTACGAATTCTGC – TACAGAAACTTAGAACCGAAA |
| <b>Me2 – Ga45</b>  | TGAGTCCAAACCGGAGC – AGTCCTATTTTTGCAGTTCTA   |
| <b>Odd3 – Ce12</b> | CCAAAACCTAAAACCAGGA – TTGCCTTACTGGGAATTTAC  |
| <b>Odd15 – Me2</b> | GCGAGGATGCTACTGGTT – TGATGCCAAACCGGAGC      |
| <b>Sa12 – Ga3</b>  | TTCTAGGTAATCCAACAACA – GTCCAATTGAGAGAGAG    |
| <b>Me2 – Odd11</b> | TGAGTCCAAACCGGAGC – ATTATTATTGGGATGCAAAGT   |
| <b>Em1 – Sa16</b>  | GACTGCGTACGAATTCAAT – AATGTTGTATGACCAAGGTAA |
| <b>Em1 – Odd19</b> | GACTGCGTACGAATTCAAT – CAGAGTAATTGCCATGAAATG |
| <b>Sa12 – Me8</b>  | TTCTAGGTAATCCAACAACA – TGAGTCCTTTCCGGTGC    |

### 4.2.3. Análisis del sistema de apareamiento.

Las estimaciones del análisis del sistema de apareamiento se calcularon asumiendo un modelo de apareamiento mixto para la especie, basado en la evidencia de autofecundación y fecundación cruzada en *B. orellana* (Rivera-Madrid *et al.*, 2006; Valdez-Ojeda *et al.*, 2010). Cada sistema agronómico y cada fenotipo dentro del sistema agronómico, se estimó la tasa de cruce de multilocus ( $t_m$ ), la tasa de cruce de un locus simple ( $t_s$ ), la correlación de autofecundación ( $r_s$ ), la correlación multilocus de paternidad ( $r_{pm}$ ) y de locus simple de

paternidad ( $r_{ps}$ ) utilizando MLTR versión 3.4 (Ritland, 2002). Los intervalos de confianza para las tasas de cruzamiento se obtuvieron a través del re-muestreo bootstrap (1000 iteraciones) de las progenies entre las familias. La endogamia biparental se infirió como la diferencia entre las estimaciones multilocus y de locus único de las tasas de cruzamiento y el coeficiente de correlación de paternidad (Ritland, 1989, 2002). Cuando el número de donantes de polen es limitado, el coeficiente de correlación de paternidad es diferente de cero, y el número efectivo promedio de donantes de polen por árbol de semilla y fruto puede estimarse como  $N_{ep} = 1/r_{pm}$  (Ritland, 1989).

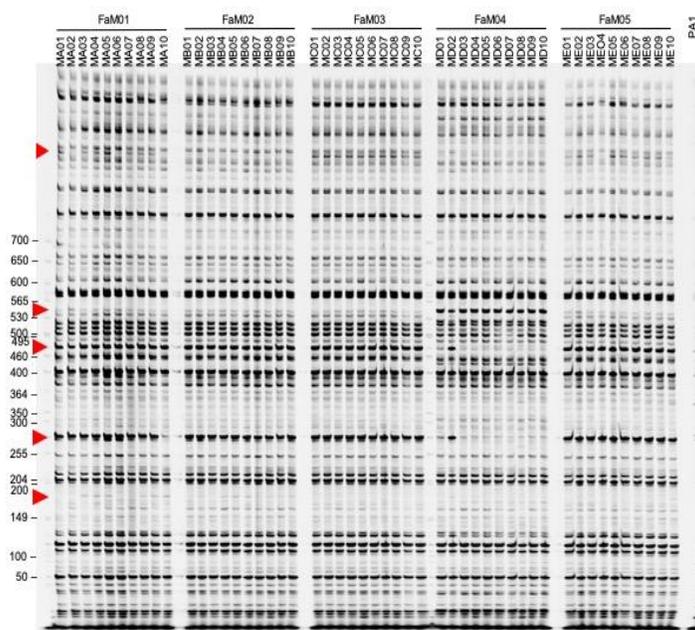


Figura 4.3 Fragmentos de la combinación del marcador Em1<sub>IRD700</sub> Odd21 SRAP. Los picos indican el polimorfismo detectado en cinco familias genéticas. Izquierda, medida estándar (50-700 pb).

### 4.3 RESULTADOS

Las tasas estimadas de entrecruzamiento variaron de  $0.68 \pm 0.07$  a  $0.95 \pm 0.04$  y de  $0.42 \pm 0.06$  a  $0.65 \pm 0.3$  ( $t_m$  y  $t_s$ , respectivamente; Tabla 4.2) resultado de las combinaciones del marcador SRAP (fig. 4.3). La  $t_m$  estimada fue 1.3 veces mayor en el monocultivo y policultivo que en la de los solares. Dependiendo del fenotipo de la flor, las tasas de cruzamiento variaron dentro del sistema agronómico desde  $0.69 \pm 0.07$  a  $1.00 \pm 0.00$  y desde  $0.44 \pm 0.06$  a  $0.96 \pm 0.02$  ( $t_m$  y  $t_s$ , respectivamente; Tabla 4.3). La  $t_m$  estimada fue mayor para el fenotipo de flor rosada que para el fenotipo de la flor blanca en los sistemas mono- y

policultivo, pero menor en el fenotipo de flor rosa que para el fenotipo de flor blanca en el sistema de los solares.

Una fracción del apareamiento (0.25–0.3) se asoció con la endogamia biparental. Los valores de  $t_m - t_s$  fueron significativamente diferentes de cero y similares entre los diferentes sistemas evaluados (Tabla 4.2). Estos valores también fueron similares entre los fenotipos de flores dentro de los sistemas agronómicos, excepto por el fenotipo de flor rosa en el policultivo, que fue aproximadamente siete veces más menor que el fenotipo restante y demás combinaciones de los sistemas agronómicos (Tabla 4.3).

El coeficiente de parental materna ( $F$ ) varió de  $0,22 \pm 0,07$  a  $0,49 \pm 0,05$  entre las estimaciones en los sistemas agronómicos, con estimaciones en el solar aproximadamente dos veces mayor que las estimaciones restantes del policultivo y monocultivo (Tabla 4.2).

Los valores del coeficiente de parental materna ( $F$ ) se dividieron en dos grupos en función al fenotipo de la flor: 1) estimados a partir de fenotipos de flor rosa en monocultivo y para ambos fenotipos de flor en policultivo, que van desde  $0.13 \pm 0.08$  a  $0.18 \pm 0.06$ ; y 2) los estimados a partir de fenotipos de flores blancas en monocultivo y para ambos fenotipos de flores en el sistema solar, que van desde  $0,37 \pm 0,09$  a  $0,48 \pm 0,07$  (Tabla 4.3).

Tabla 4.2 Parámetros estimados del sistema de apareamiento de *Bixa orellana* en tres sistemas agrícolas diferentes con marcador SRAP, los errores estándar se calcularon a partir de 100 bootstrap.

| Parámetro                                  | Familias<br>progenie | Policultivo       | Monocultivo       | Solar             |
|--|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|  |                      | 20                | 20                | 20                |
|  |                      | 200               | 200               | 200               |
| Multi-locus out-crossing rate ( $t_m$ )    |                      | $0.950 \pm 0.038$ | $0.862 \pm 0.031$ | $0.677 \pm 0.065$ |
| Single-locus out-crossing rate ( $t_s$ )   |                      | $0.646 \pm 0.035$ | $0.582 \pm 0.031$ | $0.423 \pm 0.059$ |
| Bi-parental inbreeding ( $t_m - t_s$ )     |                      | $0.304 \pm 0.027$ | $0.280 \pm 0.019$ | $0.255 \pm 0.032$ |
| Maternal inbreeding coefficients ( $F_m$ ) |                      | $0.284 \pm 0.066$ | $0.216 \pm 0.070$ | $0.488 \pm 0.048$ |
| Correlation of paternity ( $r_p$ )         |                      | $0.127 \pm 0.027$ | $0.250 \pm 0.029$ | $0.330 \pm 0.062$ |
| Correlation of selfing ( $r_s$ )           |                      | $0.121 \pm 0.445$ | $0.120 \pm 0.124$ | $0.043 \pm 0.067$ |

Las estimaciones de la correlación de paternidad variaron de  $0.13 \pm 0.03$  a  $0.33 \pm 0.06$ , con la estimación más baja en el policultivo y estimaciones similares entre sistemas monocultivo y solar. El número de padres potenciales involucrados en la polinización ( $1/r_{pm}$ ) fue de aproximadamente 3, 4 y 7 plantas entre los sistemas de solar, monocultivo y policultivo,

respectivamente. Las estimaciones de correlación de paternidad fueron significativamente diferentes de cero y similar para los fenotipos blanco y rosa entre los sistemas monocultivo y solar; sin embargo, las estimaciones para ambos fenotipos de flor rosa y flor blanca fueron menores en el policultivo (Tabla 4.3). En cuanto al fenotipo, el número de padres potenciales involucrados en la polinización ( $1/r_{pm}$ ) fue de aproximadamente 5 en fenotipo rosa y 3 en fenotipo blanco en sistemas de monocultivo y del solar, respectivamente; mientras tanto, aproximadamente 30 en fenotipo rosa y 6 para fenotipo blanco, respectivamente, en el sistema de policultivos como probables donadores de polen.

La correlación del coeficiente de paternidad fue diferente de cero, pero con valores cercanos a cero, lo que sugiere múltiples progenitores (3-7) en los tres sistemas agronómicos y en todas las combinaciones de fenotipos, excepto el fenotipo de flor rosa del policultivo, donde los valores  $r_{pm}$  no fueron significativamente diferentes de cero, indicando promiscuidad.

Tabla 4.3 Parámetros estimados del sistema de apareamiento de *Bixa orellana* para dos fenotipos sometidos a tres sistemas agrícolas diferentes con marcador SRAP.

| Parámetro   | Policultivo   |               | Monocultivo   |               | Solar          |               |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
|             | Rosa          | Blanca        | Rosa          | Blanca        | Rosa           | Blanca        |
| $t_m$       | 1.000 ± 0.000 | 0.942 ± 0.033 | 0.958 ± 0.017 | 0.785 ± 0.063 | 0.689 ± 0.071  | 0.917 ± 0.110 |
| $t_s$       | 0.959 ± 0.015 | 0.648 ± 0.041 | 0.680 ± 0.031 | 0.540 ± 0.055 | 0.438 ± 0.063  | 0.669 ± 0.070 |
| $t_m - t_s$ | 0.041 ± 0.015 | 0.293 ± 0.028 | 0.278 ± 0.025 | 0.245 ± 0.050 | 0.251 ± 0.035  | 0.248 ± 0.073 |
| $F_m$       | 0.160 ± 0.152 | 0.177 ± 0.060 | 0.133 ± 0.075 | 0.370 ± 0.090 | 0.479 ± 0.068  | 0.444 ± 0.120 |
| $r_{pm}$    | 0.033 ± 0.287 | 0.154 ± 0.039 | 0.170 ± 0.029 | 0.296 ± 0.077 | 0.200 ± 0.056  | 0.251 ± 0.066 |
| $r_s$       | 0.095 ± 0.001 | 0.504 ± 0.166 | 0.147 ± 0.089 | 0.815 ± 0.159 | -0.999 ± 0.132 | 0.551 ± 0.329 |

#### 4.4 DISCUSIÓN

Las accesiones mostraron sistema mixto de apareamiento y predominantemente entrecruzado. Los resultados sugieren que las semillas son derivadas por autofecundación y fecundación cruzada, y que la mayor parte de los apareamientos son procedentes de parientes y limitado número de progenitores, excepto el fenotipo rosa en el policultivo que mostró promiscuidad. Similar sistema (p. ej.,  $t_m > 0.8$ ) es presentado por los cultivos perennes, en particular arbustos, lo que refleja larga vida útil y la presencia de mecanismos físicos y fisiológicos que impiden la autofecundación (por ejemplo, diclina, dicogamia, heterostilia y/o auto-incompatibilidad; Miller y Gross, 2011). Además, el achiote es

considerada una especie protandra (Joseph *et al.*, 2012; Rivera Madrid *et al.*, 2006) y, en algunas variantes, es observado una separación espacial (hercógama) entre el estigma y las anteras (Joseph *et al.*, 2012), lo que evita la autofecundación y promueve una alta tasa del entrecruzamiento. Otro aspecto, en el achiote se desconoce un sistema de autoincompatibilidad genética (Joseph *et al.*, 2012), sin embargo, la falta de semillas en algunas polinizaciones controladas sugiere que algunas variantes son autoestériles (Rivera-Madrid *et al.*, 2006), aunque las causas son desconocidas, este rasgo podría explicar las altas tasas de entrecruzamiento. Sin embargo, se observó contribución de la autofecundación para los sistemas agronómicos a pesar de la alta tasa de entrecruzamiento, similar a la obtenida previamente (Valdez-Ojeda *et al.*, 2010) y experimentos de polinización controlados (Joseph *et al.*, 2012; Rivera Madrid *et al.*, 2006).

Las diferencias entre las tasas de entrecruzamiento en los fenotipos no mostraron una tendencia consistente, es decir, las menores tasas se obtuvieron en el fenotipo de flor blanca en comparación a la de flor rosa. Esta tendencia se presentó en el policultivo y en el monocultivo, pero no en los solares. La diferencia en las tasas de entrecruzamiento se podría deber en las tasas de visitas de polinizadores y hercogamia entre los fenotipos. El fenotipo de flor blanca fue menos atractivo para los polinizadores, y menor hercogamia (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Sin embargo, las diferencias en las tasas de cruzamiento en el solar muestran una tendencia opuesta, los fenotipos de flor rosa con menor tasa de entrecruzamiento que en el fenotipo de flor blanca. Esta tendencia opuesta, podrían asociarse con otros factores, como el aislamiento geográfico o diferencia en la exhibición de flores (floración asincrónica), variantes autoestériles (Rivera-Madrid *et al.*, 2006) y mayores diferencias genéticas entre los fenotipos (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008). Sin embargo, la autofecundación es promovido cuando el forrajeo aumenta hacia una polinización geitonogámica (De Jong *et al.*, 1993), pocos parentales maduros en floración o floración sincrónica (Murawski y Hamrick, 1991), o baja densidad de la población (Ferrer *et al.*, 2004).

La variación en las estimaciones del apareamiento podría estar mediada por factores biológicos, como las diferencias en la presentación floral, la densidad de población, la diversidad de los polinizadores; y por factores humanos como la selección con base al fenotipo, la introducción deliberada de nuevos fenotipos, diversificación de cultivos e introducción de polinizadores no nativos, entre otros. Entonces, a medida que aumenta la

densidad de la población, se esperan mayores tasas de cruzamiento (Murawski y Hamrick, 1991). Por lo tanto, en el solar se esperaba una  $t_m$  menor debido a menor densidad y mayor aislamiento entre congéneres, y mayor  $t_m$  en el monocultivo con mayor densidad en la población y mayor cercanía entre congéneres. Sin embargo, valores de  $t_m$  en el monocultivo sugieren mayor incidencia a una polinización geitonogámica debido a exhibiciones florales de mayor tamaño (plantas fertilizadas con esquemas de irrigación frecuentes) y mantenimiento de comunidades de polinizadores; en contraste, a los sistemas tradicionales de policultivos y solar, que se basan principalmente en cultivo de temporal, y ausencia de fertilización agroquímica. En este sentido, los mayores valores de autofecundación observada en el fenotipo flor blanca del monocultivo y fenotipo flor rosa del solar es posible se deba a menores visitas de polinizadores (Aguilar-Espinosa M, CICY; observación personal) o floración sincrónica con especies de frutales como los cítricos que dividen la tasa en las visitas entre dichas especies (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Otra posibilidad es que las plantas progenitoras de los fenotipos flor blanca del monocultivo y fenotipo flor rosa del solar conservan rasgos genéticos y/o morfológicos que promueven la autofecundación (Sousa *et al.*, 2012). Por ejemplo, en la India, las variantes de color más claro (blanco y débil rosa) se observó la auto deposición de polen debido a que las anteras se adhieren sobre el estigma en dichas variantes (Siril y Joseph, 2013). Por lo que en variantes yucatecas son necesarios estudios adicionales sobre los factores que promueven la autofecundación.

Los registros de visitantes incluyen abejas, hormigas y moscas. En Brasil, las abejas que se observaron son *Trigona spinipes*, *Auglochloopsis* spp. y *Eulaema nigrita* (Garibaldi *et al.*, 2013). En la India se registraron visitantes como las abejas melíferas (*Apis indica*) y las abejas nativas (*Xylocopa* spp.), las hormigas (*Paratrechina longicornis*, *Oecophylla smaragdina*) y las moscas sífidicas (*Eristalinus aeneus* y *Syrirta pippins*) (Joseph y Siril, 2013). Aunque falta un estudio formal de los polinizadores en la península de Yucatán, se espera que la abundancia y diversidad de los polinizadores aumente entre los campos de cultivo, incluidos los sistemas tradicionales, semejantes a los campos naturales, en comparación con aquellos que incluyen solo monocultivos (Nicholls y Altieri, 2013; Saunders, 2016). Por lo tanto, las abejas nativas como *Trigona*, *Auglochloopsis* y *Xylocopa* pueden ser comunes en los fragmentos primarios y secundarios presentes sistemas más tradicionales, en comparación con los sistemas modernos de vegetación secundaria. La

intensa urbanización, el comercio portuario y turismo nacional en las cercanías de la ciudad de Mérida, han promovido sistemas más modernos de cultivo; sin embargo, los sistemas tradicionales aún son practicadas por las comunidades mayas de tradiciones preservadas que son mantenidas al sur y oeste de Yucatán (Meyer-Arendt, 1991; Jiménez-Osornio *et al.*, 2005; Cuanalo y Guerra, 2008).

Los coeficientes de endogamia biparental presentaron valores diferentes de cero entre los sistemas agronómicos y para todas las combinaciones de fenotipos. La endogamia biparental fue resultado de la estructuración genética de la especie dentro del sistema agronómico. En este sentido, las semillas previamente seleccionadas promueven la endogamia debido a que la base de selección suele ser a partir de pocos parentales maternos. En poblaciones cultivadas de *Phaseolus coccineus* L. (Escalante *et al.*, 1994), plantaciones de *Jatropha curcas* L. (Bressan *et al.*, 2013) o sorgo (*Sorghum bicolor* L.; Adugna *et al.*, 2013); especies propagadas por semillas presentan valores similares de endogamia. Por lo tanto, la endogamia de las plantas parentales ha favorecido a la consanguinidad biparental, como se observó en los sistemas agronómicos y al fenotipo, excepto por el fenotipo de flor rosa del policultivo, lo que sugiere que las semillas suelen ser producidas de diferentes fuentes de polen.

El número de padres potenciales que engendran la progenie de una determinada planta madre varió de 3 a 7 entre los casos en que el coeficiente de correlación de paternidad fue diferente de cero. La correlación de paternidad es similar a las especies polinizadas por insectos vectores que depositan el polen en una misma planta, la última visitada (dispersión correlacionada del polen), particularmente en plantas con múltiples frutos como en *Acacia melanoxylum* R. Br. (Muona *et al.*, 1991), *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) K.Schum. (Alves *et al.*, 2003) y *Theobroma cacao* L. (Silva *et al.*, 2011). Otro hecho, el forrajeo de insectos de pocos congéneres en floración sincrónica (disponibilidad limitada de pareja) mantienen la correlación de paternidad de la progenie, como *Coffea arabica* L. (Berecha *et al.*, 2014) y el sorgo (Barnaud *et al.*, 2008). Por lo tanto, la dispersión de polen y/o la disponibilidad limitada de la pareja se correlacionaron positivamente con la paternidad entrecruzada en el achiote, aunque permanece desconocida.

La información derivada del presente estudio es importante en lugar de un programa de mejora en el achiote. Así que, las familias en las que se promueve la autofecundación (como

las que se detectan para el fenotipo de flor blanca del monocultivo y el fenotipo de flor rosa del solar, deben presentar caracteres superiores a sus progenitores, lo que refleja la seguridad de la reproducción sexual. El entrecruzamiento de las variantes garantiza la heterocigosidad y la recombinación de características agronómicas deseables hacia la mejora de variedades sintéticas, como una mayor producción de pigmentos y frutos indehiscentes. En este sentido, el entrecruzamiento predominante fue observado en los sistemas agronómicos, independientemente a los fenotipos. Sin embargo, la autofecundación y la endogamia biparental son características de esta especie, aunque esto no es inusual en las especies cultivadas, y la heterocigosis de la especie no está garantizada en este escenario, ya que el aumento de la homocigosis es típico de los fitomejoradores (Charlesworth, 2003). La disponibilidad limitada de la pareja o la dispersión correlacionada del polen también es preocupante en los programas de mejora, debido a una fuente reducida de variación en la progenie.

### **4.5 CONCLUSIÓN**

*Bixa orellena* L., mostró una variación en el sistema de apareamiento entre los tres sistemas agronómicos y por fenotipo, variando desde un sistema mixto de apareamiento a un modelo de cruzamiento predominante. Esta variación debe ser considerada en el esquema de selección para plantas maternas mejoradas o plantas élite. Aunque el cruce puede promover la recombinación genética aleatoria, puede ser útil para el mantenimiento de rasgos deseables. También es necesario conocer la biología reproductiva y la morfología floral sobre los diferentes sistemas de cultivo, para demostrar el grado de participación y contribución de los polinizadores (abejas, hormigas, mariposas, aire, entre otros) en la dispersión polen y semillas; así como investigar la compatibilidad fenotípica y su comportamiento en los diferentes sistemas de cultivo de achiote. Además, se necesitan más estudios sobre la interacción polen-pistilo en los fenotipos del achiote para comprender mejor la diferenciación entre estas plantas.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 5.1 CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación nos permiten concluir que la caracterización obtenida por los marcadores morfológicos y moleculares SSR demostraron una alta diversidad morfológica y genética de la colección de plantas de achiote en Yucatán analizadas en este estudio. Esto demuestra que el uso de marcadores morfológicos y moleculares en achiote en esta investigación confirmaron los estudios previos realizados con marcadores morfológicos y moleculares, SRAPs por Valdez-Ojeda et al (2008), también en achiote.

La evaluación morfológica determinó relaciones entre las características agronómicas de la semilla: como el contenido de bixina, número de semillas por fruto y frutos de mayor tamaño; y variables de interés específico propuestas de la flor y fruto como: los frutos rojo a verde/rojo de forma hemisférica, ápice agudo y espinas intermedias en plantas de fenotipo de flor rosa, y la indehiscencia del fruto en individuos de fenotipo de flor blanca, se determinó dicha relación.

En este sentido, estas características podrían poseer valor discriminatorio para la clasificación de los tipos de achiote, y estar asociado a la obtención de altos contenidos de bixina. Así, a partir de estos resultados, se facilita la identificación de plantas de interés agronómico y de mayor rendimiento de bixina y semillas, cuya relación acata las demandas específicas de los fito-mejoradores y/o agricultores con el fin de seleccionar individuos agronómicamente importantes que conlleve al desarrollo óptimo del potencial de este cultivo.

Así también, las relaciones de los caracteres fenotípicos permitieron discriminar las accesiones de achiote estudiadas aquí. Lo que brinda la posibilidad de seleccionar parentales con caracteres agronómicos de interés comercial para desarrollo de líneas mejoradas realizando un proceso de selección óptimo para el mejoramiento de este cultivo. Accesiones del grupo 1 presentaron los caracteres de importancia agronómica en cuanto al contenido de bixina, mayor número de semilla por fruto y de mayores tamaños, lo que

implica que este grupo pueda ser considerado potencial de progenitores a partir del cual se puedan obtener generaciones segregantes, particularmente con accesiones 2 y 3 debido al carácter indehisciente de sus frutos.

Los SSR empleados permitió caracterizar genéticamente la colección de plantas de achiote en términos de frecuencias alélicas, el polimorfismo y la riqueza alélica, llevó a establecer la diversidad genética y la estructura genética dentro de la colección y entre los sitios de origen a la colecta. Los resultados encontrados indicaron que la colección en estudio presenta una alta diversidad genética.

Las diversas medidas de diversidad genética observadas como la heterocigosidad, estadísticos F e índice de Kosman obtenidos, mostraron que las plantas de la colección conservan suficiente variación que puede utilizarse como base para mejoramiento y conservación del material agronómico de interés.

De forma similar, el alto flujo génico y la moderada diferenciación entre los grupos genéticos observados determinó una base genética estrecha que conforman la colección de plantas de achiote. La varianza (ANOVA) de los estadísticos F, corroboró la mayor variabilidad que se encontró fue entre individuos que conforman la colección de plantas. Estos datos suponen que debido a su distribución antrópica y modelo de entrecruzamiento tienen efecto sobre esta alta diversidad dentro de la colección estudiada.

Además, la alta estructura genética observada mostró tendencia de agrupamiento entre poblaciones a partir del origen de la colecta del achiote. Los datos obtenidos mostró una agrupación entre Mérida y Chicxulub; mientras, las poblaciones de Temozón y Chan Dzinup se mantuvieron aisladas. La estructura encontrada en este trabajo puede ser atribuida a las poblaciones sometidas a procesos de selección artificial que han mantenido su identidad genética, a pesar de cruzamientos intencionados en función a la producción de pigmentos, donde la variación heredada de los caracteres morfológicos no influyeron en la formación de los grupos.

La caracterización del polimorfismo del gen *Bo $\beta$ -LCY1* fue congruente en la determinación de genotipos de interés agronómicos asociados al contenido de bixina; la cual en el presente trabajo, el haplotipo B observado dentro de la colección de plantas fue asociado

a mayor contenido de pigmento bixina, en comparación de los haplotipos restantes con menores contenidos. Así, la asociación del gen *Boβ-LCY1*, evidenció ser una herramienta útil en la predicción de individuos con alto contenido de pigmento bixina.

La caracterización del sistema reproductivo ha presentado polimorfismo entre los sistemas agronómicos de cultivo. Este sistema se presentó desde un modelo de entrecruzamiento predominante a un sistema mixto. Los resultados revelan el impacto de las prácticas de cultivo en el apareamiento, factor a considerar para su cultivo extensivo.

El cambio observado en el apareamiento es utilizado para definir estrategias de cultivo y programas de reproducción en el mejoramiento genético. Estimaciones de la auto-cruza observados muestran individuos emparentados, que mantienen una estructura familiar, que contribuye a la moderada diferenciación y mayor flujo génico entre individuos correlacionados.

Finalmente, los análisis realizados han generado información novedosa respecto a la caracterización del achiote sobre aspectos morfológicos, agronómicos y de rendimiento, que esclarecen de forma más precisa la identificación entre los morfotipos de achiote. Así, se evidenció molecularmente la alta diversidad genética que se expresa en la gran variación entre las formas botánicas de la especie. Esto corrobora la presencia de una estructura genética conservada en esta especie, y que se mantiene de forma dinámica por los patrones de apareamiento mixto observados en la colección de plantas de achiote.

## **5.2 PERSPECTIVAS**

En Yucatán, el achiote (*Bixa orellana* L.) es una planta de interés comercial y uso culinario de sus pigmentos. La cual, ha generado interés de caracterización de la variación genética en la búsqueda de parentales de caracteres agronómicos superiores encaminado a la mejora genética y aumento del cultivo hacia el comercio y desarrollo de tipos botánicos de alto rendimiento. La caracterización se hace indispensable para determinar caracteres de valor agronómico y permitan la identificación de posibles parentales agronómicos importantes y obtener un banco de progenitores. En este caso, es posible utilizar los esquemas de selección que implican parentales maternos asociados a caracteres agronómicos superior y como resultado de la hibridación obtener una amplia oportunidad de recombinación genética a través de cruces dirigidos y obtener líneas segregantes de

caracteres superiores.

El esfuerzo limitado para generar criterios de selección en el achiote con base a sus características morfológicas y/o moleculares que facilite la identificación de caracteres de valor agronómico, asociado a bixina principalmente. Adicionalmente, la composición química de un organismo, exhibe propiedades en función de la abundancia de sus metabolitos, lo cual contribuye potencialmente para una caracterización más completa de las plantas. Su empleo en la identificación y discriminación de genotipos de achiote no queda exenta de análisis. Por lo que su uso para el desarrollo de criterios de selección como marcadores químicos, aunado a genotipos de caracteres agronómicos permitirá de manera más eficiente la selección de genotipos para el aprovechamiento óptimo del achiote en sus diversas aplicaciones en la industria de alimentos, de fármacos, de cosméticos, entre otros.

La reproducción controlada, propagación de genotipos agronómicos y transformación genética de genotipos con base de selección para mejorar el contenido de bixina se puede realizar con las accesiones ya caracterizadas aquí. Estas estrategias adicionales conducirían la generación de cultivares superiores y proporcionarían la dirección del mejoramiento genético en condiciones más controladas. Así también, estudios adicionales que se encaminen al establecimiento de líneas homocigotas para ahondar en el estudio sobre los rasgos agronómicos asociados a loci genéticos a través de líneas segregantes hacia el desarrollo de cultivares más homogéneos con características agronómicas de interés.

La diversidad genética estrecha observada entre individuos correlacionados en el presente trabajo, podrían conducir a modificaciones de la distribución de esta diversidad genética con posibles efectos adversos. Es necesario seguir haciendo más investigación para complementar la información y realizar el análisis sobre el efecto que ha ejercido la selección artificial o antropogénica en la diversidad genética en estas poblaciones cultivadas. Así también es necesario el reconocimiento de poblaciones silvestres para poder compararlas y determinar el valor real de la diversidad genética del achiote.

Así mismo, la colección de plantas de achiote abarcó limitadas poblaciones de cultivo en Yucatán. Si bien, la alta variabilidad genética mostrada por los diferentes análisis

morfológicos y moleculares, sugiere realizar esfuerzos para aumentar en número de la colección de plantas de achiote para incrementar la diversidad de la colección, aunado al incremento del tamaño de la población núcleo para la identificación de aquellos individuos portadores de la mayores cualidades de interés, a fin de generar materiales mejorados que sirvan de puentes genéticos para la manipulación de caracteres en cruza dirigidas. Por tal motivo, se recomienda nuevas introducciones o colecciones de plantas que contribuyan a una mejor comprensión de la diversidad genética y la estructura de esta especie, así como a la comprensión del proceso de domesticación hacia su cultivo óptimo de este recurso.

**BIBLIOGRAFÍA**

Adugna A, PM Sweeney y E Bekele (2013) Estimation of in situ mating systems in wild sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) in Ethiopia using SSR-based progeny array data: implications for the spread of crop genes into the wild. *J. Genet.* 92: 3–10.

Agner AR, AP Bazo, LR Ribeiro y DM Salvadori (2005). DNA damage and aberrant crypt foci as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of annatto (*Bixa orellana* L.) in rat colon carcinogenesis. *Mutat Res* 582: 146–54.

Aher AA y SM Bairagi (2012). Formulation and evaluation of herbal lipstick from colour pigments of *Bixa orellana* (Bixaceae) seeds. *Int J Pharm Biol Sci* 4: 357–9.

Akshatha V, P Giridhar y GA Ravishankar (2011) Morphological diversity in *Bixa orellana* L. and variations in annatto pigment yield. *J Horticult Sci Biotech* 86(4): 319-324.

Altieri MA (1992) Sustainable agricultural development in Latin America: exploring the possibilities. *Agric Ecosyst Environ* 39: 1–21.

Altieri MA (2009) Agroecology, small farms, and food sovereignty. *Mon Rev* 61: 1–7.

Alves RM, AM Sebbenn, AS Artero, C Clement y A Figueira (2003) Mating system in natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Shumm. *Genet Mol Biol* 26: 373–379.

Ambrósio Moreira P, J Lins, G Dequigiovanni, E Ann Veasey, CR Clement (2015). The Domestication of Annatto (*Bixa orellana*) from *Bixa urucurana* in Amazonia. *Econ Bot* 69(2): 127-135.

Anderson A, GA Churchill, JE Autrique, SD Tanksley, y ME Sorrells (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36(1): 181-186.

Arce J (1999). El Achiote *Bixa orellana* L. Cultivo Promisorio para el trópico. 1st edn. Earth,

Turrialba, Costa Rica.

Arce J (1984). Caracterización de 81 plantas de achiote (*Bixa orellana* L.) de la colección del CATIE procedentes de Honduras y Guatemala, y propagación vegetativa por estacas. Tesis Doctoral. Repositorio Biblioteca Orton, CATIE. Turrialba, Costa Rica.

Arias JL, LH Reddy, M Othman, B Gillet, D Desmaele, F Zouhiri, F Dosio, R Gref y P Couvreur (2011). Squalene based nanocomposites: a new platform for the design of multifunctional pharmaceutical theragnostics. *ACS nano* 5(2): 1513-1521.

Avise CJ (1994) Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York.

Baer DF (1977) Systematics of the genus *Bixa* and geography of the cultivated annatto tree. *Diss Abstr Int B* 37(10): 4846.

Barnaud A, G Trigueros, D McKey y HI Joly (2008) High outcrossing rates in fields with mixed sorghum landraces: ¿how are landraces maintained?. *Heredity* 101: 445–452.

Bennett MD y IJ Leitch (1995) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann Bot* 76: 113–176.

Berecha G, R Aerts, K Vandepitte, S Van Glabeke, B Muys, I Roldán-Ruiz y O Honnay (2014) Effects of forest management on mating patterns, pollen flow and intergenerational transfer of genetic diversity in wild Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) from Afromontane rainforests. *Biol J Linn Soc* 112: 76–88.

Bittencourt C, MP Felicissimo, JJ Pireaux, y L Houssiau (2005) Study of annatto from *Bixa orellana* seeds: an application of time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Spectrosc Eur* 17 (2): 16-22.

Block MA, J Joyard y R Douce (1980). Site of synthesis of geranylgeraniol derivatives in intact spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 631(1): 210-219.

Botstein D, RL White, M Skolnick y RW Davis (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32(3): 314-331.

Bouvier F, O Dogbo y B Camara (2003) Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment

bixin (annatto). Sc 300: 2089–2091.

Bouvier F, A Rahier y B Camara (2005) Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids Review. Prog Lipid Res 44: 357–429.

Bressan EA, AM Sebbenn, RR Ferreira, TSG Lee y A Figueira (2013) *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) exhibits a mixed mating system, high correlated mating and apomixis. Tree Genet Genomes 9: 1089–1097.

Carballo-Uicab VM, Y Cárdenas-Conejo, AA Vallejo-Cardona, M Aguilar-Espinosa, J Rodríguez-Campos, H Serrano-Posada, JA Narváez-Zapata, F Vázquez-Flota y R Rivera-Madrid (2019) Isolation and functional characterization of two dioxygenases putatively involved in bixin biosynthesis in annatto (*Bixa orellana* L.). Peer J 7: e7064.

Cevallos M (1978) Achiote. Lima, Ministerio de Agricultura y alimentación: 16 pp.

Charlesworth D (2003) Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. Philos Trans Royal Soc B: Biol Sci 358: 1051–1070.

Chen ZY, R Jiao y KY Ma (2008) Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods Review. J Agric Food Chem 56(19): 8761-73.

Cipriani G, G Lot, WG Huang, MT Matarazzo, E Peterlunger y R Testolin (1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: Isolation, characterization and cross species amplification in *Prunus*. Theor Appl Genet 99: 65-72.

Clegg MT (1980) Measuring plant mating systems. Bioscience 30: 814–818.

Collard BC, MZ Jahufer, JB Brouwer, EC Pang (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement. Euphytica 142: 169 196.

Colunga-García Marín P (1996) Origen, variación y tendencias evolutiva del henequén (*Agave fourcroydes* Lem). Instituto de Ecología UACP y P/CCH, UNAM México DF. Tesis de Doctorado.

Coltman DW, DW Bowen y JM Weith (1996) PCR primers for harbour seal (*Phoca vitulina*

---

*concolour*) microsatellites amplify polymorphic loci other pinniped species. *Mol Ecol* 5:161-163.

Cornide MT, A Arencibia, V Berovides, D Calvo, E Canales, O Coto, C González, M Rodríguez, J Sánchez, A Sigarrosa y X Xiqués (2002) Marcadores moleculares: nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Ed. Félix Varela, La Habana. Cuba.

Correa-Navarro PJ (1995) Informe del proyecto de viabilidad técnico-económica de achote. Convenio 'La Extra'-CRUPY UACH. Mimeografiado. Mérida, Yucatán. 40 p.

Cuanalo de la CHE y RA Uicab C (2005) Investigación participativa en la milpa sin quema. *Terra Latinoamericana* 23(4): 587-597.

Cuanalo de la CHE RR y M Guerra (2008) Homegarden production and productivity in a Mayan community of Yucatan. *Hum Ecol* 36: 423-433.

Dayanandan S, KS Bawa y R Kesseli (1997) Conservation of microsatellites among tropical tree (Leguminosae). *Am J Bot* 84: 1658-1663.

De Marco R, AMS Vieira, MCA Ugri, ARG Monteiro y RDC Bergamasco (2013) Microencapsulation of annatto seed extract: stability and application. *Chem Eng Trans* 32: 1777-1782.

Dequigiovanni G, SL Ramos, MI Zucchi, MM Bajay, JB Pinheiro, EG Fabri, EA Bressan, y EA Veasey (2014) Isolation and characterization of microsatellite loci for *Bixa orellana*, an important source of natural dyes. *Genet Mol Res.* 2014 Oct 31;13(4):9097-102. doi: 10.4238/2014.

Dequigiovanni G, SLF Ramos, A Alves-Pereira, EG Fabri, PRN Carvalho, MGG da Silva, MTVN Abdo, ALM Martins, CR Clement y EA Veasey (2017) Genetic diversity and structure in a major Brazilian annatto (*Bixa orellana*) germplasm bank revealed by microsatellites and phytochemical compounds. *Genet Resour Crop Ev* 64(7): 1775-1788.

Dequigiovanni G, SLF Ramos, A Alves-Pereira, EG Fabri, D Picanco-Rodrigues, CR Clement, P Gepts y EA Veasey (2018) Highly structured genetic diversity of *Bixa orellana* var. *urucurana*, the wild ancestor of annatto, in Brazilian Amazonia. *PloS one* 13(6):

e0198593.

Dequigiovanni G, SL Ramos, MT Gomes Lopes, CR Clement, DP Rodrigues, E Gomes Fabri, MI Zucchi y EA Veasey (2018a) New microsatellite loci for annatto (*Bixa orellana*), a source of natural dyes from Brazilian Amazonia. *Crop Breed Appl Biotechnol* 18: 116-122.

De Jong TJ, NM Waser y PG Klinkhamer (1993) Geitonogamy: the neglected side of selfing. *Trends Ecol Evol* 8: 321–325.

De Oliveira Júnior RG, A Bonnet, E Braconnier, H Groult, G Prunier, L Beaugeard, R Grougnet, JRG da Silva, CA Alves Ferraz y L Picot, (2019) Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. *Food Chem Toxicol* 125: 549-561.

Dharmarajan G, WS Beatty y OE Rhodes Jr (2013) Heterozygote deficiencies caused by a Wahlund effect: dispelling unfounded expectations. *J Wildl Manage* 77(2): 226-234.

Dias NO, TN Rebouças, AR São José y CL Amaral (2017) Morpho-agronomic characterization and estimates of genetic parameters in annatto plant. *Hortic Bras* 35(2): 242-246.

Ding X y YL Hou (2012) Identification of genetic characterization and volatile compounds of *Tricholoma matsutake* from different geographical origins. *Biochem Syst Ecol* 44: 233–239.

Don RH, PT Cox, BJ Wainwright y K Baker (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008.

Donkin RA (1974) *Bixa orellana*: "The Eternal Shrub". *Anthropos* 69: 33-56.

Eckert CG, B Ozimec, CR Herlihy, CA Griffin y MB Routley (2009) Floral morphology mediates temporal variation in the mating system of a self-compatible plant. *Ecol* 90: 1540–1548.

Escalante AM, G Coello, LE Eguiarte y D Pinero (1994) Genetic structure and mating systems in wild and cultivated populations of *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus vulgaris*

(Fabaceae). *Am J Bot* 81: 1096–1103.

Espósito MA, VP Cravero, EA Martín y EL Cointry (2011) Use of morphological, biochemical and SRAP molecular markers to differentiate varieties of *Cynara cardunculus* L. (Asteraceae). *Rev. FCA UNCUYO* 43(2): 35-45.

Eujay I, ME Sorrells, M Baum, P Wolters y W Powell (2002) Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theor Appl Genet* 104:399–407

Fay MF, RS Cowan y IJ Leitch (2005) The Effects of Nuclear DNA Content (C-value) on the Quality and Utility of AFLP Fingerprints. *Ann Bot* 95: 237–246.

Felsenstein J (2005) PHYLIP Version 3.6 (phylogeny inference package). Seattle WA Department of Genome Science, University of Washington.

Ferrer MM, LE Eguiarte y C Montana (2004) Genetic structure and outcrossing rates in *Flourensia cernua* (Asteraceae) growing at different densities in the South-western Chihuahuan Desert. *Ann Bot* 94: 419–426.

Garibaldi LA, I Steffan-Dewenter, R Winfree y MA Aizen, R Bommarco, SA Cunningham y C Kremen (2013) Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Sc* 339: 1608–1611.

Gepts P (2004) Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant Breed Rev* 24 (parte 2): 1-44.

Ghislain M, J Núñez, M del-Rosario, J Pinatero, F Guzman, M Bonierbale y D Spooner (2009) Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Mol Breeding* 23: 377-388.

Godoy G (2000) El achiote: una especie subexplotada. *Ciencia y Desarrollo* 26 (152): 34-39.

Goldstein DB y DD Pollock (1997) Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *J Hered* 88: 335-342.

## BIBLIOGRAFÍA

---

González Chavarro CF, ME León Lozano, AC Morillo Coronado, EI Ochoa e Y Morillo Coronado (2016) Molecular characterization of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq., from different origins (Zaire and Cameroon) using microsatellite markers. *Acta Agronómica* 65(3): 276-283.

Griffiths AJF, JH Miller, DT Suzuki, RC Lewontin y WM Gelbart (1993) Chapter 5 An Introduction to Genetic Analysis. 5th ed. New York: WH Freeman and Company: ISBN 0-7167-2285-2.

Guerrero Pinilla JA, LF Campuzano, S Rojas y J Pachon-García (2011) Morphological and Agronomic Characterization of the *Jatropha curcas* L. Colombian Germplasm collection. *Orinoquia* 15(2): 131-147.

Hammer Ř, DAT Harper y PD Ryan (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis–Palaeontol. *Electron* 4: 9 pp.

Hamrick JL y DA Murawski (1990) The breeding structure of tropical tree populations. *Plant Spec Biol* 5: 157–165.

Hauke J y T Kossowski (2011) Comparison of values of Pearson's and Spearman's correlation coefficients on the same sets of data. *Quaest Geogr* 30(2): 87-93.

Hernández-Xolocotzi E, S Bello y T Levy (1995) La Milpa en Yucatán, un sistema de producción agrícola tradicional. Eds. Montecillos: Colegio de Postgraduados. México. 1: 15–34.

Heywood VH y JM Iriondo (2003) Plant conservation: Old problems, new perspectives. *Biol Conserv* 113:321-335.

Hidalgo R (2003) “Variabilidad Genética y Caracterización de Especies Vegetales”, *En: Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos filogenéticos*, Franco TL y R Hidalgo (ed). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Cali, Colombia.

Hillis DM y JJ Wiens (2000) Molecules versus morphology in systematics. *In: JJ Wiens (ed.). Phylogenetic analysis of morphological data*. Smithsonian Institution Press. Washington.

Hunter WN (2007) The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *J Biol Chem* 282 (30): 21573-21577.

Hurtado I y J Herrera (2013) Estudio de la diversidad morfológica y molecular del germoplasma de *Coffea liberica* bull ex hiern en Colombia. *Cenicafé* 64(2): 31-47.

Inforural (2018) Balancán le da color a Francia. Prensa digital. México. Disponible en línea: <https://www.inforural.com.mx/balancan-le-da-color-a-francia/>

Isabel N, J Beaulieu y J Bousquet (1995) Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (14): 6369-6373.

Jiménez-Osornio J, M Ruenes-Morales y P Montañez-Escalante (1999) Agrodiversidad de los solares de la península de Yucatán. *Revista Red, Gestión de Recursos Naturales*: 30-40.

Jiménez-Osornio JJ, MDR Morales-Gómez y AA Gómez (2005) Mayan home gardens: sites for in situ conservation of agricultural diversity. *In: Seed Systems and Crop Genetic Diversity On-farm. Proceedings of a Workshop. Pucallpa, Peru, 16–20 September, 2003.* pp 9–15 International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI).

Joseph N y EA Siril (2014) Evaluation and selection of elite annatto (*Bixa orellana* L.) and identification of RAPD markers associated with yield traits. *Braz J Bot* 37(1): 1–8.

Joseph N, EA Siril y GM Nair (2012) Reproductive characterization and preliminary studies on controlled breeding of annatto (*Bixa orellana* L.). *Plant Syst Evol* 298(1): 239-250.

Joseph N, EA Siril y GM Nair (2010) Imbibition duration, seed treatment, seed mass and population influence germination of annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. *Seed Technology* (32):37–45.

Júnior ACTS, LMBO Asad, EB De Oliveira, K Kovary, RA Nasser y I Felzenszwalb (2005) Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. *Genet Mol Res* 4(1): 94-99.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Kalia RK, MK Rai, S Kalia y R Singh (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309-334.

Kalivas A, F Xanthopoulos, O Kehagia y AS Tsaftaris (2011) Agronomic characterization, genetic diversity and association analysis of cotton cultivars using simple sequence repeat molecular markers. *Genet Mol Res* 10(1): 208-217.

Kamimura H, N Koga y K Oguri (1992) Enhanced elimination of theophylline, phenobarbital and strychnine from the bodies of rats and mice by squalene treatment. *J Pharmacobiodyn* 15: 215-21.

Kang EJ, RE Campbell, E Bastian y MA Drake (2010). Annatto usage and bleaching in dairy foods. *J Dairy Sci* 93: 3891–3901.

Khatab IA, AR Morsy, WM Fares y T Kumamaru (2016) Genetic Diversity of Soybean Genotypes revealed by Agro–morphological and SSR markers. *J Fac Agri Kyushu Uni* 61(1): 79-87.

Kosman E y KJ Leonard (2005) Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Mol Ecol* 14(2): 415-424.

Kumar Y y L Periyasamy (2016) GC-MS analysis and in-vitro cytotoxic studies of *Bixa orellana* seed extract against cancer cell line. *Int J Pharm Pharm Sci* 8(1): 408-413.

Kumar S, G Stecher y K Tamura (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33(7): 1870-1874.

Laurentin H (2009) Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genet Resour Crop Evol* 56(2): 277-292.

Leal F y CM Michelangeli de Clavijo (2010) Annatto: a natural dye from the tropics. *Chron Hortic* 50: 34–36.

Li G y CF Quiros (2001) Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in

Brassica. Theor Appl Genet 103: 455-461.

Li P, YP Deng, XX Wei y JH Xu (2013) Triterpenoids from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxic activities. Nat Prod Res 27(1): 17-22.

Little EL y RG Dixon (1969) Arboles comunes de la provincia de Esmeraldas, Ecuador, Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, FAO. Roma.

Lombello RA y CAF Pinto-Maglio (2014) Cytogenetics and Reproductive Biology of *Bixa orellana* L. (Bixaceae). Cytologia 79(3): 379–386.

López Anido F, V Cravero, E Martín, I Crippa y E Cointry (2010) Differential expression of the genetic variance in F2 populations of reciprocal crosses of artichoke. Span J Agric Res 8(3): 679-685.

Magurran AE (1988) Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press. New Jersey. 179 págs.

Manifeto MM, AR Schlatter, HE Hopp, EY Suárez y J Dubovsky (1998) Microsatellites in wheat: An useful tool for variety identification and breeding. En: Application of Biotechnologies to Wheat Breeding. Kohli MM y M Francis (eds). INIA La Estanzuela, CIMMYT. Colonia, Uruguay.

Manshardt R (2004) Crop improvement by conventional breeding or genetic engineering: how different are they?. Biotechnology, 5, 1-3.

Martínez-Cortés G, I Nuño-Arana, R Rubi-Castellanos, G Vilchis-Dorantes, A Luna-Vázquez, RM Coral-Vazquez, y Z López (2010) Origin and genetic differentiation of three Native Mexican groups (Purépechas, Triquis and Mayas): contribution of CODIS-STRs to the history of human populations of Mesoamerica. Ann Hum Biol 37(6): 801-819.

Mazzani E, C Marín y V Segovia (2000) Estudio de la variabilidad existente en la colección de onoto (*Bixa orellana* L.) del CENIAP; FONAIAP; Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía LUZ 17: 492-50.

McCouch S (2004) Diversifying selection in plant breeding. PLoS Biology 2: 1507–1512.

## BIBLIOGRAFÍA

---

McGonigle KEM y KJ McCracken (2002) Study on the effects of annatto (*Bixa orellana*) and *Yucca Schidegera* on cholesterol content and yolk colour. *Brit Poultry Sci* 43 (S1): 41-42.

Medina AM, C Michelangeli, C Ramis y A Díaz (2001) Caracterización morfológica de frutos de onoto (*Bixa orellana* L.) y su correspondencia con patrones de proteínas e isoenzimas. *Acta Cient Venez* 52: 14–23.

Mercadante AZ, A Steck y H Pfander (1999) Three minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. *Phytochem* 52:135–9.

Metzgar D, J Bytof y C Will (2000) Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research* 10: 72-80.

Meyer-Arendt KJ (1991) Tourism development on the north Yucatan coast: human response to shoreline erosion and hurricanes. *Geo J* 23, 327–336.

Meyer RC, M Steinfath, J Lisec, M Becher, H Witucka-Wall, O Törjék, O Fiehn, Ä Eckardt, L Willmitzer, J Selbig y T Altmann (2007) The metabolic signature related to high plant growth rate in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 4759–4764.

Michelangeli C, AM Medina, P Artioli y J Mata (2002) Microsporogénesis y Microgametogénesis de Onoto (*Bixa orellana* L.). *Acta Científica Venezolana* 53: 171-175.

Miller AJ y BL Gross (2011) From forest to field: perennial fruit crop domestication. *Am. J. Bot.* 98: 1389–1414.

Mohamad NV, S Ima-Nirwana y KY Chin (2018) Effect of tocotrienol from *Bixa orellana* (annatto) on bone microstructure, calcium content, and biomechanical strength in a model of male osteoporosis induced by buserelin. *Drug Des Dev Ther* 12: 555-564.

Monzote L, M García, R Scull, A Cuellar y WN Setzer (2014) Antileishmanial activity of the essential oil from *Bixa orellana*. *Phytother Res* 28(5): 753–8.

Morgante M y AM Olivieri (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J* 3 (1): 175-182.

Morgante M, M Hanafey y W Powell (2002) Microsatellites are preferentially associated with

nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet* 30: 194-200.

Muona O, GF Moran y JC Bell (1991) Hierarchical patterns of correlated mating in *Acacia melanoxylon*. *Genetics* 127: 619–626.

Murawski DA y JL Hamrick (1991) The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. *Heredity* 67: 167–174.

Narciso-Reyes L (2012) Manual para la producción del achiote (*Bixa orellana* L.). Facultad de Ciencias Agrícolas Universidad Veracruzana, México. 37 pp.

Nisar N, L Li, S Lu, NC Khin y BJ Pogson (2015) Carotenoid metabolism in plants. *Mol Plant* 8: 68–82.

Nagasampagi BA, L Yankov y S Dev (1967) Isolation and characterization of geranylgeraniol. *Tetrahedron Lett* 8(2): 189-192.

Nicholls CI y MA Altieri (2013) Plant biodiversity enhances bees and other insect pollinators in agroecosystems. A review. *Agron Sustain Dev* 33: 257–274.

Núñez V, R Otero, J Barona, R Fonnegra, S Jiménez, OR Guillermo, JC Quintana y A Díaz (2004) Inhibition of the toxic effects of *Lachesis muta*, *Crotalus durissus cumanensis* and *Micrurus mipartitus* snake venoms by plant extracts. *Pharm Biol* 42 (1), 49–54.

Oliveira JE, JG Pádua, PM Zucchi, R Venkovsky, LC Vieira (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol* 29: 294-307.

Onamu R, JP Legaria Solano, J Sahagún Castellanos y J Pérez Nieto (2012) Análisis de marcadores morfológicos y moleculares en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Rev Fitotec Mex* 35(4): 267-277.

Parimalan R, P Giridhar, BG Harischandra y GA Ravishankar (2007) Organogenesis from cotyledon and hypocotyl-derived explants of japhara (*Bixa orellana* L.). *Acta Bot Croat* 66(2): 153–160.

Peakall R y PE Smouse (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Pech-Hoil R, MM Ferrer, M Aguilar-Espinosa, R Valdez-Ojeda, LE Garza-Caligaris y R Rivera-Madrid (2017) Variation in the mating system of *Bixa orellana* L. (achiote) under three different agronomic systems. *Sci Hortic* 223: 31-37.

Pérez Sandi y Cuen M y R Becerra (2003) El achiote. *Biodiversitas* 46: 7-11.

Pino JA y MT Correa (2003) Chemical composition of the essential oil from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. *J Essent Oil Res* 15: 66–7.

Pinzón LLL, CH Avendaño A, JO Mijangos C, G del C Godoy H, DE Cituk C, PJ Correa N y E Campos R (2008) Situación del recurso achiote en México (*Bixa orellana* L.). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. México. 14pp.

Portela de Carvalho JFR, CR De Carvalho y OW Campos (2005) *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 80: 69–75.

Raddatz-Mota D, LJ Pérez-Flores, F Carrari, JA Mendoza-Espinoza, FD de León-Sánchez, LL Pinzón-López, G Godoy-Hernández, F Rivera-Cabrera (2017) Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. *J Food Sci Technol* 54(6): 1729-1741.

Rajwant KK, RK Manoj, K Sanjay, S Rohtas y AK Dhawan (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309–334.

Ramos-Solórzano G (1991) El cultivo de anoto en Venezuela. *Foniap Divulga* 36: 5-17.

Rather LJ y F Mohammad (2016) Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications—A review. *J Adv Res* 7(3): 499-514.

Rentaría-Alcántara M (2007) Breve revisión de los marcadores moleculares. En: LE Eguiarte *et al.*, editores. *Ecología molecular*. SEMARNAT MEX.: 541-566.

Ritland K (1989) Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. *Evolution* 43: 848–859.

Ritland K (2002) Extensions of models for the estimation of mating systems using n

independent loci. *Heredity* 88: 221–228.

Rivera DI y EM Flores (1988) Morfología floral del achiote, *Bixa orellana* L (Bixaceae). *Rev Biol Trop* 36: 499-509.

Rivera R (1967) El achiote, una promesa para El Salvador. *CENTA/MAG.* 80. Santa Tecla, El Salvador.

Rivera-Madrid R, RM Escobedo-GM, E Balam-Galera, M Vera-Ku y H Harries (2006) Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). *Sci Hortic* 109: 165–172.

Roa AC, P Chavarriaga-Aguirre, MC Duque, MM Maya, MW Bonierbale, C Iglesias y J Tohme (2000) Cross species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: Allelic polymorphism and degree of relationship. *Am J Bot* 87: 1647-1655.

Roberts JA, KA Elliott y ZH Gonzalez-Carranza (2002) Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Annu Rev Plant Biol* 53: 131–158.

Rodríguez-Ávila NL, JA Narváez-Zapata, ML Aguilar-Espinosa y R Rivera-Madrid (2011) Regulation of pigment related genes during flower and fruit development of *Bixa orellana*. *Plant Mol Biol Report* 29:43–50.

Rodríguez M y A Arencibia (2002) “Principales tipos de marcadores del polimorfismo de los ácidos nucleicos. Técnicas analíticas”. *En: Marcadores moleculares nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas*, Cornide H y MT Felix Varela, eds. Habana, Cuba.

Rojas JJ, VJ Ochoa, SA Ocampo y JF Muñoz (2006) Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complem Altern M* 6: 1–6.

Ronco AL (2009) Usos potenciales del Escualeno. *Tendencia en Medicina* (2009): 94-100.

Ross-Ibarra J, PL Morrell y BS Gaut (2007) Plant domestication, a unique opportunity to identify the genetic basis of adaptation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 8641–8648.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Russell KR, EY Morrison y D Ragoobirsingh (2005) The effect of annatto on insulin binding properties in the dog. *Phytother Res* 19: 433-436.

Saiki RK, DH Gelfand, S Stoffel, S Scarf, R Higuchi, GT Horn, KB Mullis y HA Erlich (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a termoestable DNA polymerase. *Sc* 239: 487-491.

Saitou N y M Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4): 406-425.

Sajib AM, M Hossain, ATMJ Mosnaz, H Hossain, M Islam, M Ali y SH Prodhan (2012) SSR marker-based molecular characterization and genetic diversity analysis of aromatic landraces of rice (*Oryza sativa* L.). *J BioSci Biotech* 1(2): 107-116.

Saunders ME (2016) Resource connectivity for beneficial insects in landscapes dominated by monoculture tree crop plantations. *Int J Agric Sustain* 14: 82–99.

Sax K (1923) The Association of Size Differences with Seed-Coat Pattern and Pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8(6): 552–560.

Schemske DW y R Lande (1985) The evolution of self-fertilization and inbreeding in plants. II. Empirical observations. *Evolution* 39: 41–52.

Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18(2): 233–234.

Selvi AT, MG Dinesh, RS Satyan, B Chandrasekaran, C Rose (2011) Leaf and Seed extracts of *Bixa orellana* L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. *J Appl Pharm Sci* 1 (09): 116–20.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP (2018) Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Consulta en línea: agosto 2019. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

Sharon M y MC D'Souza (2000) *In vitro* clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). *Curr Sci* 78(12): 1532 -1535.

Shilpi JA, M Taufiq-Ur-Rahman, SJ Uddin, MS Alam, SK Sadhu y V Seidel (2006) Preliminary Pharmacological Screening of *Bixa orellana* L. Leaves. J Ethnopharmacol 108(2): 264-71.

Silva CR, LMG Antunes y MLP Bianchi (2001) Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. Pharm Res 43: 561–6.

Silva CRS, PSB Albuquerque, FR Ervedosa, JWS Mota, A Figueira y AM Sebbenn (2011) Understanding the genetic diversity, spatial genetic structure and mating system at the hierarchical levels of fruits and individuals of a continuous *Theobroma cacao* population from the Brazilian Amazon. Heredity 106: 973–985.

Silva SNS, CLF Amaral y TNH Reboucas (2010) Adoption of conservation practices on farm and selection of varieties by producers of annatto in the city of Vitoria da Conquista-BA. Rev Bras Agroecológica 5:106–13

Simpson J (1997) Amplified fragment length polymorphisms. Bol Soc Bot Méx 60:73-76.

Siril EA y N Joseph (2013) Micropropagation of annatto (*Bixa orellana* L.) from mature tree and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants with RAPD markers. Physiol Mol Biol Plants 19: 147–155.

Sleper DA y JM Poehlman (2006) The genetics basis of plant breeding. *En: Breeding Field Crops*, Sleper, D. A. and Poehlman, J. M. Blackwell, Ames, Iowa: 19-53.

Smith J y H Wallin (2006) En línea: Annatto Extracts. Chemical and Technical Assessment.

Smith TJ (2000) Squalene: potential chemopreventive agent. Expert Opin Investig Drugs 9(8): 1841-1848.

Sousa ACB, MA Carvalho, T Campos, DA Sforça, MI Zucchi, L Jank y AP Souza (2012) Molecular diversity, genetic structure and mating system of *Calopogonium mucunoides* Desv. Genet Resour Crop Evol 59: 1449–1464.

Steinkellner H, C Lexer, E Turetschek y J Gloszl (1997) Conservation of (GA)(n) microsatellite loci between *Quercus* species. Mol Ecol 6:1189-1194.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Stohs SJ (2014) Safety and efficacy of *Bixa orellana* (achiote, annatto) leaf extracts. *Phytother Res* 28(7): 956–60.

Stuchlík M y S Zak (2002) Vegetable lipids as components of functional foods. *Biomedical papers-palacky University in Olomouc* 146(2): 3-10.

Tautz D, M Trick y G Dover (1986) Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 322: 652-653.

Thoquet P, M Ghérardi, EP Journet, A Kereszt, JM Ané, JM Prospero y T Huguet (2002) The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. *BMC Plant Biol* 2:1 DOI: 10.1186/1471-2229-2-1.

Tibodeau JD, CR Isham, KC Bible (2010) Annatto constituent Cis-bixin has selective antimyeloma effects mediated by oxidative stress and associated with inhibition of Thioredoxin and Thioredoxin reductase. *Antioxid Redox Signal* 13: 987–97.

Tirimanna ASL (1981) Study of the carotenoid pigments of *Bixa orellana* L. seeds by thin layer chromatography. *Mikrochim Acta* II: 11–6.

Trujillo-Hdz JA, Y Cárdenas-Conejo, P Escobar-Turriza, M Aguilar-Espinosa, V Carballo-Uicab, LE Garza-Caligaris, L Comai y R Rivera-Madrid (2016) Functional polymorphism in lycopene beta-cyclase gene as a molecular marker to predict bixin production in *Bixa orellana* L. (achiote). *Mol Breed* 36(9): 135.

Ulbricht C, RC Windsor, A Brigham, JK Bryan, J Conquer, D Costa, N Giese, J Guilford, ER Higdon, K Holmes, R Isaac, S Jingst, J Kats, L Peery, E Rusie, A Savinainen, T Schoen, T Stock, S Tanguay-Colucci, W Weissner (2012) An evidence based systematic review of annatto (*Bixa orellana* L.) by the natural standard research collaboration. *J Diet Suppl* 9(1): 57–77.

Valdez-Ojeda RA, JL Hernández-Stefanoni, M Aguilar-Espinosa, R Rivera-Madrid, R Ortiz, and CF Quiros (2008) Assessing Morphological and Genetic Variation in Annatto (*Bixa orellana* L.) by Sequence-related Amplified Polymorphism and Cluster Analysis. *Hortscience* 43: 2013-2017.

Valdez-Ojeda RA, CF Quiros, M Aguilar-Espinosa y R Rivera-Madrid (2010). Outcrossing Rates in Annatto Determined by Sequence-Related Amplified Polymorphism. *Agron J* 102 (5): 1340-1345.

Vallejo FA (1991) Evaluación de germoplasma de achiote *Bixa orellana* L.: estudios básicos sobre asociaciones fenotípicas y biología floral. *Acta Agronómica* 41(1-4): 7-20.

Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotech.* 23:48-55.

Venugopalan A y P Giridhar (2012) Bacterial growth inhibition potential of annatto plant parts. *Asian Pac J Trop Biomed* 2(3): S1879-82.

Venugopalan PA, GA Giridhar, AG Ravishankar (2011). Food, ethanobotanical and diversified applications of *Bixa orellana* L.: a scope for its improvement through biotechnological mediation. *Ind J Fundament Appl Life Sci* 1(4): 9–31.

Vieira MLC, L Santini, AL Diniz y CDF Munhoz (2016) Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet Mol Biol* 39(3): 312-328.

Vilar DA, MSA Vilar, TF Accioly de Lima e Moura, FN Raffin, M Rosa de Oliveira, CLO Franco, PF de Athayde-Filho, MFFM Diniz, JM Barbosa-Filho (2014) Traditional uses chemical constituents and biological activities of *Bixa orellana* L. A review. *Sci World J Article* ID 857292, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/857292>.

Villar del Fresno AM, P Bermejo y ME Carretero (1999) Farmacognosia, conceptos generales. *En: Villar del Fresno AM, editor. Farmacognosia general. Ed. Síntesis España:19-32.*

Vik A, A James y LL Gundersen (2007) Screening of terpenes and derivatives for antimycobacterial activity; identification of geranylgeraniol and geranylgeranyl acetate as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. *Planta medica* 73 (13): 1410-2.

Vogler DW y S Kalisz (2001) Sex among the flowers: the distribution of plant mating systems. *Evolution* 55: 202–204.

## BIBLIOGRAFÍA

---

White G y W Powell (1997) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): An endangered tropical hardwood species. *Mol Ecol* 6:851-860.

Winter P y G Kahl (1995) Molecular marker technologies for plant improvement. *World J Microbiol Biotechnol* 11: 438 448.

Wolff K, B Friso y JMM Van Damme (1988) Outcrossing rates and male sterility in natural populations of *Plantago coronopus*. *Theor Appl Genet* 76: 190–196.

Wyman AR y R White (1980) A Highly Polymorphic Locus in Human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6754-6758.

Wu YG, G Qiao-Sheng, H Ji-Chan, L You-Fen, L Li-Juan y L Guo-Dao (2010) Genetic diversity analysis among and within populations of *Pogostemon cablin* from China with ISSR and SRAP markers. *Biochem Syst Ecol* 38(1): 63–72.

Yong YK, ZA Zakaria, AA Kadir, MN Somchit, GEC Lian y Z Ahmad (2013) Chemical constituents and antihistamine activity of *Bixa orellana* leaf extract. *BMC Complement Altern Med* 13: 32.

Yucatán Informa (2017) Tabasco con potencial para ser proveedor de achiote. Prensa. Disponible en línea: <https://yucataninforma.org/2017/05/17/tabasco-con-potencial-para-ser-proveedor-de-achiote/>

Yusuf M, M Shabbir y F Mohammad (2017) Natural colorants: Historical, processing and sustainable prospects. *Nat Prod Bioprospect* 7(1): 123-145.

Zhang J, Q Ye, X Yao y H Huang (2010) Microsatellite diversity and mating system of *Sinojackia xylocarpa* (Styracaceae), a species extinct in the wild. *Biochem Syst Ecol* 38: 154–159.

Zotyen QA (2002) COMPENDI. Cultivo del achiote *Bixa orellana* L., división de agronegocios. DGEA. Ministerio de Agricultura y Ganadería. El salvador.

Zucchi MI, RV Brondani, JB Pinheiro, C Brondani, R Vencovsky (2002). Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). *Mol*

Ecol Notes 2:512-514.



## ANEXO

Scientia Horticulturae 223 (2017) 31–37



Contents lists available at ScienceDirect

Scientia Horticulturae

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scihorti](http://www.elsevier.com/locate/scihorti)

## Variation in the mating system of *Bixa orellana* L. (achiote) under three different agronomic systems



Rodolfo Pech-Hoíl<sup>a</sup>, Miriam Monserrat Ferrer<sup>b</sup>, Margarita Aguilar-Espinosa<sup>a</sup>, Ruby Valdez-Ojeda<sup>c</sup>, Luz Elena Garza-Caligaris<sup>a</sup>, Renata Rivera-Madrid<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, CP 97200 Mérida, Yucatán, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Manejo y Conservación de Recursos Naturales Tropicales, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, Mexico

<sup>c</sup> Unidad de Energía Renovable, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Mérida, Yucatán, Mexico

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Bixin  
SRAP  
Mixed mating system  
Biparental inbreeding  
Correlated paternity  
Backyard (solar)  
Polyculture (milpa)  
Monoculture

## ABSTRACT

*Bixa orellana* L. (achiote), is a tropical species that produces high amounts of bixin, used as a commercial food pigment. In Yucatan, *B. orellana* (achiote) is cultivated under three different agronomic systems: backyard (solar), polyculture (milpa), and monoculture. Two promising phenotypes affecting bixin production have been identified. The phenotypes differ in flower and fruit colour, fruit dehiscence and bixin contents. Reflecting differences in plant density, species diversity and management factors among agronomic systems and differences in flowering synchrony between phenotypes, mating system parameters might vary, such as outcrossing rates ( $t_m$  and  $t_s$ ), biparental inbreeding ( $t_m \cdot t_s$ ;  $r_{pm}$ – $r_{ps}$ ), the fixation index of maternal plants ( $F$ ) and paternity correlation ( $r_{pm}$ ). To compare such parameters between different *B. orellana* phenotypes among agronomic systems, 10 offspring from 20 genetic families of *B. orellana* per agronomic system were amplified using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular markers. MLTR software was used assuming a mixed mating system. Plants sown in backyard showed a mixed mating system, while in poly- and monoculture, they showed predominantly an outcrossing system; biparental inbreeding was similar in backyard, poly- and monoculture; the maternal inbreeding coefficient was higher in backyards than in poly- and monoculture; and plants in backyards and monoculture are less promiscuous than plants in polyculture. Variations between phenotypes within each agronomic system were also recorded. *B. orellana* displays a mixed mating system affected by the agronomic system. Thus, the selection of offspring should consider variation in the mating system in the design of alternative breeding improvement programs.

## 1. Introduction

Mating system refers to the mating patterns within a population, which determine the genetic structure of the population and drive the evolution of floral and reproductive traits (Barrett and Eckert, 1990; Barrett et al., 1996; Vogler and Kalisz, 2001; Eckert et al., 2009). Domesticated plants display a variety of mating systems, ranging from obligatory outcrossing to self-fertilization or even apomixis (Ross-Ibarra et al., 2007), with predominant outcrossing plants among shrubs and trees (Miller and Gross, 2011). Plant mating patterns vary according to the species reproductive biology (sexual systems, self-incompatibility

genetic systems, and blooming patterns), as well as ecological and environmental factors that affect pollen flow, and therefore outcrossing frequencies, particularly population density (Schemske and Lande, 1985; Wolff et al., 1988) affecting pollen dispersion via pollinators or wind (Clegg, 1980; Hamrick and Murawski, 1990). In agronomic systems, differences in management practices are primarily affected by sowing patterns and the provenance of the sown seeds. Practices such as the intercropping of different variants and intensive exchanging of seeds maintain high outcrossing rates in traditional agricultural systems (Barnaud et al., 2008). Agronomic systems in Latin America vary from traditional systems to commercial plantations (Altieri, 1992,

**Abbreviations:** SRAP, sequence-related amplified polymorphism; MLTR, multilocus mating system program; IRD, infrared fluorescent dyes; TBE, tris/borate/EDTA;  $t_m$ , multilocus outcrossing rate;  $t_s$ , single-locus outcrossing rate;  $r_s$ , selfing correlation;  $r_{pm}$ , multilocus paternity correlation;  $r_{ps}$ , single-locus paternity correlation;  $N_{ep}$ , average effective number of pollen donors

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [monodopos@gmail.com](mailto:monodopos@gmail.com) (R. Pech-Hoíl), [mferrer@correo.uady.mx](mailto:mferrer@correo.uady.mx) (M.M. Ferrer), [mgf@cicy.mx](mailto:mgf@cicy.mx) (M. Aguilar-Espinosa), [dubi@cicy.mx](mailto:dubi@cicy.mx) (R. Valdez-Ojeda), [luzelenagarcal@hotmail.com](mailto:luzelenagarcal@hotmail.com) (L.E. Garza-Caligaris), [renata@cicy.mx](mailto:renata@cicy.mx) (R. Rivera-Madrid).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.05.031>

Received 24 January 2017; Received in revised form 11 May 2017; Accepted 17 May 2017  
0304-4238/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.