



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

**“ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN SOMACLONAL DE
PLANTAS MICROPROPAGADAS DE ACHIOTE (*Bixa
orellana* L.)”**

Tesis que presenta
CLAUDINE DEL JESÚS GALLEGOS BRITO

En opción al título de
MAESTRO 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 Claudine del Jesús Gallegos Brito, titulado “Análisis de la variación somaclonal de plantas micropropagadas de achiote (*Bixa orellana* L.)” fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Renata Rivera Madrid, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Cepeda
Director Académico

Mérida, Yucatán, México, 27 de Noviembre de 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 Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: CLAUDINE DEL JESÚS GALLEGOS BRITO

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 CONACYT: 248736 "Establecimiento de plantaciones elite de achiote para producción de semillas con altos contenidos de bixina" y su responsable técnico Dr. Gregorio Godoy Hernández; la tesis se realizó bajo la asesoría de la Dra. Renata Rivera Madrid.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (No. CVU/Becario) 867575 / 636750 para realizar mis estudios en Maestría en Ciencias Biológicas opción Bioquímica y Biología Molecular de Plantas y por formar parte del proyecto CONACYT: 248736 “Establecimiento de plantaciones elite de achiote para producción de semillas con altos contenidos de bixina”

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios en sus instalaciones, ampliando mi formación académica a través de las enseñanzas de todo su personal académico.

A mis asesora Dra. Renata Rivera Madrid, por toda su asesoría, apoyo, confianza y respaldo, por los conocimientos compartidos y por haberme hecho parte de su grupo de Investigación, agradezco todos sus esfuerzos y dedicación.

A mi asesor Dr. Gregorio Godoy Hernández por haberme permitido formar parte de su proyecto de investigación, por sus recomendaciones, respaldo y disponibilidad en todo lo que se requiriera para la elaboración del trabajo.

A mi comité asesor Dra. Miriam Ferrer-Ortega por su asesoría incondicional para el análisis de datos y todas las observaciones al trabajo; y Dra. June Kilpatrick Simpson Williamson por sus consejos y mejoras al trabajo durante mis exámenes tutorales.

A la M.C. Margarita de Lourdes Aguilar Espinosa por su apoyo técnico, respaldo y asesoría en todo momento, gracias Maestra por sus consejos y amistad.

Al Dr. Rodolfo Pech-Hoil por compartir su experiencia en el manejo de marcadores SRAP, organización de datos y manejo de equipos durante todo mi trabajo de investigación.

A la M.C. Elidé Avilés Berzunza por su disponibilidad y atención.

A mis compañeros del Laboratorio 27 de la UBBMP: Dra. Rosita Us Caamas, M.C. Jonathan Dzib Cauich, Dr. Víctor Carballo Uicab, M.C. Pedro Escobar Turriza, M.C. Nayeli Romero López, Dra. Irán Andira Guzmán, Ing. Angélica Chi Mena, Lic. Rocío Tamayo García, M.C. Viridiana Alvarado, Br. Gabriela Vázquez, Br. Fernanda Velueta, Lic. Lupita Hernández, Lic. Diana Sierra y Dr. David Chan; gracias por su compañerismo, consejos y amistad.

A todos mis compañeros de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

A todo el personal técnico y administrativo del Centro de Investigación Científico de Yucatán.

A mis padres Claudio Gallegos Rodríguez y Aurora Brito Moguel, por contar siempre con su apoyo y confianza para todos los proyectos que emprendo en mi vida, y permanecer siempre a mi lado, ustedes son mis pilares, las palabras y acciones no son suficientes para devolverles algo de lo mucho que nos han dado a Ely y a mí.

A mi hermana Elimar Gallegos Brito por siempre estar y ser mi incondicional, eres lo más importante en mi vida.

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres Claudio y Aurora, y mi hermana Elimar.

Gracias por todo, los amo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	4
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	6
1.1 <i>Bixa orellana</i>	6
1.1.1 Origen y distribución geográfica.....	6
1.1.2 Clasificación taxonómica.....	7
1.1.3 Descripción botánica.....	7
1.1.4 Hábitat	10
1.1.5 Reproducción.....	10
1.2 Importancia y usos	10
1.3 Bixina	11
1.4 Cultivo y producción.	12
1.5 Problemática	12
1.6 Micropropagación.....	14
1.7 Variación somaclonal	15
1.7.1 Métodos de detección de variación somaclonal	16
1.8 Marcadores moleculares	20
1.8.1 Polimorfismo Amplificado de Secuencia Relacionada (SRAP)	22
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26
CAPÍTULO II. POLIMORFISMO AMPLIFICADO DE SECUENCIA RELACIONADA.....	27
II. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1 Campo experimental y sitio de colecta	27
2.2 Material vegetal.....	28
2.3 Extracción de DNA genómico.....	32
2.4 Selección de cebadores SRAP.....	33
2.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa de los marcadores SRAP	34
2.4.2 Genotipaje de marcadores SRAP seleccionados en LI-COR 4300	34
2.5 Análisis de datos	35

2.5.1 Construcción de las matrices básicas de datos.....	35
2.5.2 Estimación de la diversidad genética	36
2.5.3 Cálculo de valores de similitud y construcción de dendograma.....	37
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
3.1 Material vegetal seleccionado	38
3.2 Extracción, cuantificación y validación de DNA genómico.	38
3.3 Validación y estandarización de marcadores para genotipaje en LI-COR® 4300 ...	40
IV. CONCLUSIONES.....	52
V. PERSPECTIVAS.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>Bixa orellana</i> L. ubicada en el poblado de Chand Dzitnup, Yucatán....	9
Figura 2. Variedad morfológica en frutos de <i>Bixa orellana</i>	9
Figura 3. Ejemplo de dehiscencia e indehiscencia del fruto de <i>Bixa orellana</i> L.....	9
Figura 4. Estructura química del apocarotenoide bixina.....	11
Figura 5. Plántulas germinadas de <i>Bixa orellana</i>	¡Error! Marcador no definido.
Figura 6. Organogénesis directa e indirecta a partir de segmentos de hipocótilos de la variedad criolla de achiote (Godoy-Hernández, G., 2012).....	15
Figura 7 Ubicación del Instituto Tecnológico de Conkal	28
Figura 8 Morfotipos establecidos de acuerdo con sus características fenotípicas.....	29
Figura 9 Planta variegada (VAR) establecida en campo experimental.....	30
Figura 10 Protocolo de regeneración vía organogénesis indirecta de los morfotipos PR, PV, YUC, NE y VAR	32
Figura 11 DNA genómico obtenido de muestras de hojas jóvenes de los cuatro morfotipos	39
Figura 12 Comparación de las PCR con cebador SRAP Dc1700 con Me7	40
Figura 13 Amplificación del marcador SRAP combinación Dc1800-Odd15.....	42
Figura 14 Perfil de amplificación del morfotipo YUC con el marcador Em1(700)- Odd21 .	43
Figura 15. Dendograma circular de similitud genética.....	47
Figura 18. Análisis de Coordenadas principales (PCoA) con marcadores SRAP	50

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Clasificación taxonómica del achiote (SNICS, 2015).....	7
Cuadro 2 Morfotipos de estudio y sus características de flor y fruto.....	28
Cuadro 3 Secuencias de cebadores seleccionados para el análisis mediante SRAP	33
Cuadro 4 Descripción de los morfotipos estudiados, sus abreviaturas, características morfológicas y número de muestras	38

ABREVIATURAS

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

ORF: Marco de Lectura Abierto/ Open Reading Frame.

SRAP: Polimorfismo Amplificado de Secuencias Relacionadas.

SSR: Secuencias de Repeticiones Simples.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

TAE: Tris-Acetato EDTA.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

nm: nanómetros.

µl: microlitros.

mM: milimolar.

µM: micromolar.

nm: nanómetros.

RESUMEN

Bixa orellana o “achiote” como es conocido en México es la fuente de bixina, un pigmento apocarotenoide natural derivado del pericarpio de la semilla del achiote, es considerado como un colorante natural no tóxico para alimentos y aditivos. Es usado en las industrias alimentarias, cosméticas y textil. El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la variación somaclonal en cuatro morfotipos de plantas micropropagadas de achiote usando la técnica de marcadores moleculares SRAP. Se estandarizaron y obtuvieron perfiles alélicos de trece marcadores SRAP para cuatro grupos de morfotipos denominados NE (40), YUC (40), PR (40), PV (40) y VAR (1), para una población total de 161 individuos. Se detectaron 674 alelos en un rango desde 50 a 700pb. El número de alelos por locus varió desde 21 (Dc1₈₀₀ – Odd2) y 75 (Me2₇₀₀ – Sa9), con un promedio de 52 alelos por locus. El cebador Dc1₈₀₀ – Odd15 resultó el de mayor capacidad para discriminar loci, le siguió el cebador Me2₇₀₀ – Sa16 y el cebador Me2₇₀₀ – Odd26 demostró una ligera menor capacidad de discriminación. El Contenido de Información Polimórfica varió de 0.382 a 0.326 con un promedio de 0.355. Los análisis de conglomerados y de Coordenadas principales demostraron el agrupamiento de individuos por morfotipo y una variación mínima entre ellos. El protocolo desarrollado de micropropagación *in vitro* para *Bixa orellana* L. conservó la estabilidad genética de las plantas regeneradas, por lo que es recomendable para llevar a cabo propagación clonal a gran escala de la especie.

ABSTRACT

Bixa orellana or "achiote" as it is known in Mexico is the source of bixin, a natural apocarotenoid pigment derived from the pericarp of the achiote seed, it is considered as a non-toxic natural food coloring and additive. It is used in the food, cosmetic and textile industries. The present work aimed to study the somaclonal variation in four morphotypes of micropropagated achiote plants using the SRAP molecular marker technique. Allelic profiles of thirteen SRAP markers were standardized and obtained for four groups of morphotypes called NE (40), YUC (40), PR (40), PV (40) and VAR (1), for a total population of 161 individuals. 674 alleles were detected in a range from 50 to 700 bp. The number of alleles per locus ranged from 21 (Dc1₈₀₀ - Odd2) to 75 (Me2₇₀₀ - Sa9), with an average of 52 alleles per locus. The primer Dc1₈₀₀-Odd15 was the one with the highest ability to discriminate loci, followed by the primer Me2₇₀₀-Sa16 and the primer Me2₇₀₀-Odd26 showed a slightly lower ability to discriminate. The Polymorphic Information Content ranged from 0.382 to 0.326 with an average of 0.355. The cluster and principal coordinate analyze demonstrated the grouping of individuals by morphotype and a minimal variation between them. The *in vitro* micropropagation protocol developed for *Bixa orellana* L. preserved the genetic stability of the regenerated plants, so it is recommended to carry out large-scale clonal propagation of the species.

INTRODUCCIÓN

Desde épocas muy remotas, la humanidad ha usado pigmentos de origen vegetal para teñir sus vestidos, adornar su hogar, darle color a sus comidas y bebidas, y para embellecer su cuerpo. Es de destacar que, en los últimos tiempos, el añadido de colorantes juega un rol grande en las industrias modernas de alimentos y cosméticos (Rem y Espig, 1991).

Bixa orellana L. es un cultivo que se realiza en tierras bajas del trópico de América Latina donde es extensamente cultivado por sus semillas, las cuales producen bixina, un pigmento que va desde un color amarillo brillante a un rojo anaranjado.

La bixina es un pigmento apocarotenoide natural derivado del pericarpio de la semilla del achiote (Math *et.al.* 2016); también, es considerado un colorante natural aceptado como aditivo no tóxico para alimentos. El número E160b corresponde a annato, bixina y norbixina. Es aceptado a nivel Internacional, por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Comunidad Económica Europea (CEE) y por la Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (FDA&C) (JECFA, 2003).

En México el área cultivada de esta especie es reducida debido al desconocimiento sobre el rendimiento (contenido de bixina y de carotenoides totales) de las diferentes variantes (Godoy, 2000). Por ello se ha convertido en el objeto de estudio de diversos grupos de investigación, que en conjunto buscan elucidar los aspectos ecológicos, condiciones de cultivo, las bases genético-moleculares de la biosíntesis de sus carotenoides (Leal y Michelangeli, 2010; Jako *et.al.* 2002; Bouvier *et al.*, 2003), así como estudiar la variabilidad morfológica y genética presente entre las variantes de *Bixa orellana* L. (Valdez-Ojeda, 2006).

Las mayores dificultades del cultivo de achiote son la variación contrastante en la producción y calidad de sus pigmentos, asociada con variación entre el color de la flor y fruto, así como su dehiscencia (fruto abierto) e indehiscencia (fruto cerrado) al madurar, (Fortuny-Fernández, 2007; Valdez-Ojeda *et al.* 2008). Los frutos dehiscentes dejan expuestos a los pigmentos de las semillas y se ven afectados por diversos factores bióticos y abióticos, los cuales pueden causar la degradación de estos y pérdida de semillas (Romero-López, 2015).

En un esfuerzo por dar solución a las múltiples problemáticas que presenta el cultivo de achiote en el año 2008 se crea “La Red de Achiote”, integrada por 12 investigadores pertenecientes a diferentes instituciones, entre ellas el Instituto Tecnológico de Conkal (IT de Conkal), la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH), el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), la Universidad Autónoma de México (UAM) y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), quienes trabajan en conjunto con más de 15 productores principalmente de la Península de Yucatán (SNICS, 2015).

Analizar y clasificar a los cultivares de acuerdo con el contenido de bixina y las características morfológicas, facilitaría la rápida y adecuada selección de los genotipos parentales (Valdez-Ojeda, 2006), para su micropropagación y para su futuro mejoramiento genético de tal forma que se optimicen los cultivos de achiote y puedan obtenerse plantas más homogéneas y una producción mayor de semilla y consecuentemente de pigmento bixina.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 *Bixa orellana*

1.1.1 Origen y distribución geográfica

El achiote (*Bixa orellana* L.) tiene su origen en la región de Acre, la cual se encuentra ubicada al suroeste de la Amazonia. El achiote, o urucú, como se le conoce en Brasil, se encuentra entre una de las primeras plantas domesticadas por los indios de esa región, que probablemente usaron la planta para llevar a cabo sus diversos ritos ceremoniales (Pérez y Becerra. 2003).

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

El Achiote es cultivado a lo largo de diversas áreas tropicales en el mundo, las más comunes son: México, las Islas Caribeñas, sur de Paraguay, África, Asia y El Pacífico (Baer, 1976). Antes de la época de la Conquista de América el achiote se distribuía desde México hasta Brasil. Una vez llegados los conquistadores la planta fue introducida a diversos países de los continentes asiático y africano, quienes ahora cultivan y explotan comercialmente este cultivo, siendo África el mayor productor de achiote en el mundo (Ávalos-Fernández, 2013).

En México las principales plantaciones se encuentran en los Estados de Quintana Roo, Tabasco y Yucatán, aunque se ha reportado presencia de plantaciones en los estados de Puebla, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Campeche y Chiapas (SNICS, 2015).

En Yucatán, se ha indicado principalmente al norte de la península yucateca; 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.

1.1.2 Clasificación taxonómica.

De acuerdo con el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas, la clasificación taxonómica de *Bixa orellana* se muestra en el siguiente cuadro:

<i>Reino</i>	<i>Plantae</i>
<i>División</i>	Magnoliophyta
<i>Clase</i>	Magnoliopsida
<i>Orden</i>	Malvales
<i>Familia</i>	Bixaceae
<i>Género</i>	<i>Bixa</i>
<i>Especie</i>	<i>Bixa orellana</i>

Cuadro 1 Clasificación taxonómica del achiote (SNICS, 2015).

El nombre científico del achiote se deriva de *bija* (palabra caribeña) orbiché y de orellana por el primer explorador del río Amazonas Don Francisco de Orellana; mientras que su nombre común proviene del náhuatl *achiotl* (Godoy, 2000).

1.1.3 Descripción botánica

Bixa orellana es una planta arbustiva de la familia *Bixaceae*, cultivada, perenne, con una altura promedio de tres a diez metros (Pérez y Becerra, 2003) (Figura 1). Su raíz es pivotante, con una gran cantidad de raíces secundarias y terciarias, al llegar a la etapa adulta posee un sistema radical bien desarrollado (Arce, 1984). El tallo alcanza un diámetro que va de 10 a 30 cm, su corteza es de color café claro, algo fisurada y la cual se desprende fácilmente en largas tiras, internamente posee un color amarillo o amarillo-naranja, con savia anaranjada, pegajosa, ligeramente amarga (Narciso Reyes, 2012). Sus hojas son alternas con peciolo largo, anchamente ovadas, de 8 a 20 cm de largo, acuminadas, truncadas o redondeadas en la base, enteras y menudamente lepidotadas por debajo (Standley, 1923). Las flores son actinomorfas, hermafroditas, polistémonas con unicarpelo

y óvulo unilocular (Decraene, 1989), su estigma permanece por encima de las anteras, tienen un diámetro promedio de 3-6 cm, con pedicelos de 7-16 mm de largo, y un anillo de glándulas debajo del cáliz, florece escalonadamente, comenzando por los capullos terminales (Rivera y Flores, 1988; Leal y Michelangeli, 2010). El pistilo tiene el ovario unicelular con numerosos óvulos en dos placentas parietales, los estambres crecen adoptando una dirección circular (León, 2000).

El fruto es una cápsula roja, de 2 a 6 cm de largo, compuesta de valvas o segmentos, con pelos gruesos espinosos, dehiscente (fruto abierto), y al madurar se separan en dos valvas de simetría bilateral, aunque pueden encontrarse variantes indehiscentes (frutos cerrados); que al madurar pasa a pardo rojizo oscuro. La fructificación en general ocurre entre los meses de diciembre a junio, pero este puede ser variable dependiendo del manejo que reciba la plantación. La coloración de la cápsula depende de la variante, las hay verdes, rojas ocreas y amarillas (Figura 2).

La dehiscencia e indehiscencia únicamente se percibe cuando los frutos están completamente secos y puede ser completa o incompleta (Figura 3). El fruto en su parte exterior se distingue por unas protuberancias de forma triangular y en su interior se haya una placenta donde se aloja la semilla (Zotyen-Quan, 2002). La producción de semillas inicia a partir de los dos años, una vez que cumple tres años la planta, su producción se vuelve constante. En promedio, una plantación resulta redituable por un periodo de 12 años, aunque varía de acuerdo con las condiciones del suelo, el clima y el manejo (Pérez y Becerra, 2003).



Figura 1. Planta de *Bixa orellana* L. ubicada en el poblado de Chand Dzitnup, Yucatán.



Figura 2. Variedad morfológica en frutos de *Bixa orellana*. **A.** Planta Cicy 1, flor lila. **B.** Planta F187, flor blanca. **C.** Planta F133, flor rosa. (Foto: Margarita de Lourdes Aguilar Espinosa).



Figura 3. Ejemplo de dehiscencia e indehiscencia del fruto de *Bixa orellana* L. (Foto: Claudine del Jesús Gallegos Brito).

1.1.4 Hábitat

El achiote prospera en zonas tropicales y subtropicales, se adapta a distintos tipos de clima y suelo. Crece en altitudes desde 100 hasta 1000 msnm, aunque prospera mejor en zonas relativamente bajas (100 a 500 m) y planas. Soporta temperaturas desde 24 hasta 35°C, sin heladas, y precipitaciones anuales de 1000 a 1200 mm de moderadas a altas. Se puede encontrar desde el sur de México y las islas del Caribe hasta Paraguay y Bolivia (Pérez y Becerra,; Leal y Michelangeli, 2010).

1.1.5 Reproducción

De acuerdo con el índice de heterocigosidad encontrada, *B. orellana* es de polinización abierta, y, además, entomófila, es decir, incluyen la participación de polinizadores como son los insectos (abejas, avispas, hormigas, moscas y mariposas), que favorecen la variabilidad genética, es especial las abejas *Apidae-Mellipona*, las cuales son predominantes en la península de Yucatán (Portela de Carvahlo *et al.*, 2005).

Rivera-Madrid *et al.*, 2006 reportó estudios sobre la polinización artificial donde se obtuvieron cruza de parentales seleccionados a través de la manipulación de la interacción de polen-pistilo, menciona que los granos de polen son liberados de la antera, antes de la receptividad del estigma, lo cual puede influir en el entrecruzamiento. Se comprobó que *B. orellana* sí presenta autopolinización artificial y no es exclusiva de la polinización abierta obligatoria, lo cual demuestra que *B. orellana*, presenta ambos tipos de polinización, aunque es preferente por la polinización cruzada (Valdez-Ojeda *et al.*, 2010) lo cual radica en una gran variabilidad en la descendencia la cual se manifiesta en las formas, tamaño y coloración en las cápsulas.

1.2 Importancia y usos

La importancia internacional del achiote radica en su colorante, la bixina, la cual se encuentra en el arilo que rodea la semilla. En el arilo se almacena más del 80% de bixina, pigmento de estructura carotenoide al cual tiene diversos usos (Valdéz-Hernández, 1991).

La importancia del achiote se debe a su uso como agente pigmentante principalmente en las industrias alimentarias, farmacéuticas y cosméticas. Así también, tiene sus aplicaciones en cerámica, pintura, barnices, lacas, en la tinción de telas de seda y algodón, y en la alimentación de aves (Godoy, 2000).

Aunque el JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives) no permite su uso como condimento (Scotter *et.al.*, 2002), es ampliamente usado como tal para la preparación de platillos y bebidas tradicionales en México, Centro y Sudamérica. Las semillas de achiote son además utilizadas en raciones para gallinas ponedoras, para mejorar la pigmentación de la yema (Leal y Michelangeli, 2010).

1.3 Bixina

La bixina es el principal constituyente de la semilla del achiote, un colorante que se encuentra en la cubierta exterior de la semilla del fruto, representa el 80% de los pigmentos totales de la semilla (Devia y Saldarriaga, 2003). La bixina es un compuesto de 25 átomos de carbono con 9 dobles enlaces, cuyo nombre químico es el éster monometílico del ácido 6,6'-diapo- ψ , ψ -carotenodioico (Aparnathi *et al.*, 1990).

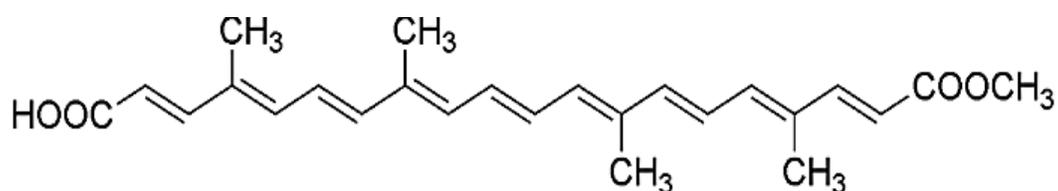


Figura 4. Estructura química del apocarotenoide bixina.

La bixina es de color rojo oscuro, químicamente es un ácido carotenóico (Jaramillo, y Muñoz, 1992). Es insoluble en agua y altamente soluble en cloroformo, aceites vegetales, acetato de etilo y propilenglicol (Romero-López, 2015), además de su facilidad para absorberse a los pH alcalinos de la mayoría de los alimentos y su capacidad de convertirse a una sal más estable. Tiende a degradarse en presencia de luz y temperaturas altas; es resistente a ácidos, alcoholes y a la acción microbiana (Leal y Michelangeli, 2010).

La bixina presenta actividad antioxidante, así como la capacidad de proteger al DNA de sustancias que le provocan daños, además de que a este compuesto no se le han atribuido efectos de tipo genotóxicos o carcinógenos (Trujillo-Hernández, 2013; Agner *et al.*, 2004). Actualmente, la bixina está siendo empleada como un producto para consumo humano seguro en América Latina, ya que es reconocida por su nula toxicidad y denominándola como uno de los colorantes permitidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), siendo aceptado como aditivo de color por la Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de los E.E.U.U. (FDA&C). Mundialmente, es el segundo colorante natural de mayor importancia económica, empleado en sustitución de tartrazina, un colorante sintético que se ha prohibido en muchos países (JECFA, 2003).

1.4 Cultivo y producción.

De acuerdo con Moreira *et al.*, 2015, la producción de semilla de achiote es de aproximadamente 17,500 toneladas/año a nivel mundial. A pesar de que se produce en varios países tropicales Brasil y Perú son 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, los valores de producción del achiote se basan muchas veces en interpretaciones, por lo que la cifra real permanece sobreestimada.

1.5 Problemática

Godoy-Hernández en el 2000 hace un análisis de las causas que estarían ocasionando que el achiote se considere un cultivo sub-explotado a diferencia del henequén, frijol, calabaza, chile, jitomate, papaya, en otros. El Sureste Mexicano es el hábitat natural del achiote y aun

así la producción no es suficiente para cubrir la demanda del país, llevando a la decisión de importar la semilla de otros países. Entre las problemáticas que el cultivo presenta están:

- a) Las semillas provienen en su mayoría de huertos familiares, lo que resulta en una alta variación en los contenidos de bixina.
- b) Falta de estudio en el tipo de variedades existentes que se caractericen por producir el mayor contenido de bixina.
- c) Aun estando en su hábitat la planta es atacada por hongos, lo que hace preguntar que otras plagas o enfermedades se presentarían al hacer extensionismo agrícola.
- d) En Yucatán las empresas productoras de condimentos (mayores consumidores de la semilla) compran las semillas por su peso y no en base al contenido de bixina que puedan tener. Lo que hace que se pierda el interés de cultivar variedades específicas y que los productores no aseguren su cultivo por la cantidad de bixina que puedan producir lo que les resultaría en una mayor ganancia.
- e) Apoyo gubernamental deficiente para continuar con el estudio del achiote.
- f) Se tiene la necesidad de crear alternativas para la comercialización de las semillas, que permitan la competencia en precios que resulten favorables para los productores y que éstos mantengan una producción continua del cultivo.

Giridhar y colaboradores en el 2012, publicó que para que la semilla de achiote pueda ser exportada se requiere de un contenido de bixina mínimo de 2.7%, y en México el promedio registrado varía de 1.5-2.5%, otra razón más para estudiar variedades altamente productoras de bixina y que estén adaptadas a la región.

Uno de los estudios que ayudaría en gran medida a la solución de algunas problemáticas es estudiar la relación en el contenido de bixina cuando las plantas están bajo un manejo agronómico y que sean registradas como variedades comerciales para su explotación (Raddaz-Mota *et al.*, 2017).

La floración asincrónica en la misma panícula y entre plantas diferentes (Joseph *et al.*, 2012) ha impulsado a 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).

1.6 Micropropagación

La micropropagación hace referencia al conjunto de técnicas, incluidos métodos de cultivo de tejidos, que son usados para multiplicar plantas en grandes cantidades de forma asexual, lo que lo vuelve un proceso rápido y eficiente. Así, como también; la micropropagación permite la propagación de plantas nuevas que estén libres de enfermedades o que su propagación de manera natural no sea lo suficientemente eficiente.

La producción de cultivos *in vitro* se ha convertido en una herramienta alternativa que ha ayudado a disminuir el tiempo de espera para que el cultivo de interés elegido muestre sus diferencias morfológicas, para lo cual pueden pasar de tres a cinco años en poder apreciarse.

La micropropagación se da a partir de un explante (fragmento) de una planta madre previamente seleccionada por sus características de interés, donde el principal objetivo es obtener una descendencia uniforme, que resulte en plantas genéticamente homogéneas, y a las que se le denominan clonas (Castillo, 2010).

La Red Achiote como parte del manejo de germoplasma *ex situ* desarrolló un protocolo de regeneración donde se utilizaron explantes provenientes de semillas de *Bixa orellana* L. germinadas *in vitro*.

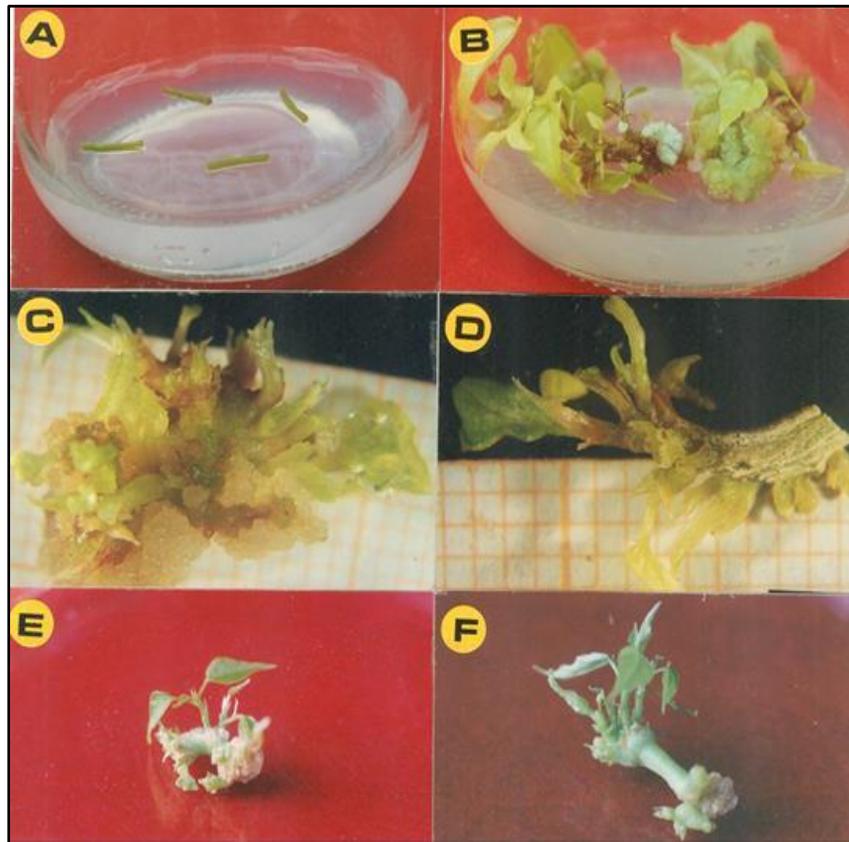


Figura 6. Organogénesis directa e indirecta a partir de segmentos de hipocótilos de la variedad criolla de achiote (Godoy-Hernández, 2012)

1.7 Variación somaclonal

El primer reporte y observaciones que se tiene de variación somaclonal fue documentado por Braun, en 1959, desde ese momento se ha contemplado como uno de los mayores problemas en el cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales resulta un entorno estresante, donde están implicadas divisiones mitóticas repetidas y un proceso asexual, que deberían producir plantas genéticamente uniformes (Larkin y Scowcroft, 1981).

Us-Camas *et.al.*, 2014 menciona como factores estresantes los altos niveles de humedad relativa, baja tasa de ventilación, altas concentraciones de reguladores de crecimiento y poca disponibilidad de luz; estos factores desencadenan una rápida regulación molecular para responder eficazmente durante la división y crecimiento celular de las plantas.

La variación somaclonal debido a la variación descontrolada y espontánea en el cultivo de tejidos resulta un proceso inesperado y mayormente un fenómeno indeseable (Karp, 1995). Aunque cuando se habla de mejoramiento de cultivos la variación somaclonal tiene un papel determinante para la generación de nuevas variantes y que en su estudio se pueda observar variedades con resistencia a alguna enfermedad o un aumento en producción de pigmentos (Karp, 1995; Unai *et.al.*, 2004).

Bairu *et.al.*, 2011 mencionan que en el caso de la variación somaclonal no siempre es posible demostrar la heredabilidad debido a complejas incompatibilidades sexuales, ausencia de semillas, poliploidía o ciclos generacionales largos.

La comprensión de este mecanismo es necesario para contrarrestarlo en casos donde se requiere fidelidad genética, como en la micropropagación, la conservación de germoplasma y la transformación de plantas.

1.7.1 Métodos de detección de variación somaclonal

La variación somaclonal durante la micropropagación sigue siendo considerado un problema al momento de realizar propagación a gran escala. Su detección temprana y la eliminación de variantes no deseadas ayuda a reducir pérdidas o a detectar variantes con rasgos agronómicos deseables (Bairu *et.al.*, 2011). Las variantes somaclonales pueden ser detectadas aplicando técnicas de detección morfológica, fisiológica/bioquímica y molecular.

I. Detección morfológica

Las variantes se pueden detectar en base a diferencia de altura de la planta, morfología de hojas y variaciones en la pigmentación (Israeli *et.al.*, 1991). El basarse en rasgos morfológicos implica que éstos están fuertemente influenciados por el ambiente, lo cual no contribuye a analizar la composición genética de la planta (Mandal *et.al.*, 2001).

Otro punto importante es que los marcadores morfológicos son limitados, se regulan por el desarrollo de la planta y factores ambientales influyen en ellos directamente. Por ejemplo, cambios en el genoma, derivados de la manipulación *in vitro*, pueden no expresarse como un fenotipo alterado y viceversa. Además, la detección de variantes usando características

morfológicas es a menudo factible en su mayor parte para plantas completamente establecidas (Israeli *et.al.*, 1995).

II. Detección fisiológica / bioquímica

Israeli y colaboradores (1995) afirman que el uso de respuestas fisiológicas y/o pruebas bioquímicas son más rápidas para detectar variantes y se pueden realizar en etapas tempranas de desarrollo de la planta para reducir costos en producción.

La respuesta de las plantas a factores fisiológicos como las hormonas y la luz se puede utilizar como base para diferenciar entre somaclones normales y variantes (Peyvandi *et al.*, 2009). Por ejemplo, el ácido giberélico regula el crecimiento e influye en varios procesos de desarrollo, como el alargamiento del tallo y la inducción de enzimas. Las alteraciones en el metabolismo y el nivel del ácido giberélico se han considerado como uno de los indicadores de la variación somaclonal en plantas superiores (Phinney, 1985; Sandoval *et al.*, 1995).

La síntesis de pigmentos como clorofila, carotenoides, antocianinas puede usarse como base para detectar variantes somaclonales (Shah *et al.*, 2003). Por ejemplo, Mujib *et.al.*, 2007, observó que las variantes de la piña mostraban una clorofila significativamente menor que los regenerantes normales. De manera similar, el contenido total de carotenoides varió mucho entre somaclones normales y variantes (Wang *et al.*, 2007).

La mayoría de las pruebas bioquímicas son complejas y requieren una gran experiencia. Además, la mayoría de las pruebas bioquímicas se realizan a pequeña escala en el laboratorio utilizando técnicas *in vitro*.

III. Detección molecular

A nivel molecular, las variaciones en las plantas derivadas del cultivo de tejidos surgen de cambios en el número o estructura de los cromosomas, o de cambios más sutiles en el DNA (Gostimsky *et al.*, 2005). Se sabe que la variación morfológica visible ocurre con una frecuencia mucho menor que a nivel del DNA (Evans *et al.*, 1984). Como resultado, es

necesario examinar la posible variación a nivel molecular, esto puede llevarse a cabo en una etapa de crecimiento temprana, mientras aún se encuentra en cultivo de tejidos.

Actualmente, se encuentran disponibles varias técnicas moleculares para detectar la variación de secuencia entre genomas estrechamente relacionados, incluidas las diferencias entre las plantas madre y los somaclones. Estas técnicas implican el uso de marcadores moleculares que son útiles para comparar el DNA de diferentes muestras para la diferenciación en plantas debido a la variación de secuencia mediante la identificación de polimorfismos aleatorios (Cloutier y Landry 1994). Como resultado de la alta especificidad del DNA, los marcadores moleculares son capaces de identificar un fragmento particular de la secuencia de DNA que está asociado a una parte del genoma y las comparaciones generalmente se hacen sobre la base de la presencia o ausencia de una banda de DNA. Además, el uso de isoenzimas que son relativamente más rápidas y económicas, secuenciación directa de DNA, polimorfismos de un solo nucleótido y microsatélites están ahora disponibles para sistemas de marcadores más informativos. Los marcadores moleculares y las isoenzimas comparten ventajas comunes sobre los marcadores morfológicos como el co-dominio, la ausencia de efectos pleiotrópicos y la herencia mendeliana (Landry *et al.*, 1987; Havey y Muehlbauer, 1989).

IV. Métodos citológicos

La variación en la ploidía o el número y la estructura cromosómica es una evidencia directa y contundente de una alta probabilidad de cambio en la composición genética de un organismo (Kunitake *et al.*, 1995; Al-Zahim *et al.*, 1999).

Los cromosomas, así como otros componentes nucleares, como las variaciones de contenido de RNA y DNA, son técnicas importantes de detección de variaciones somaclonales que se han utilizado ampliamente (Bogdanova, 2003; Nakano *et al.*, 2006; Fiuk *et al.*, 2010). El análisis cariológico y la observación de cambios cromosómicos mediante microscopía óptica, inmersión en aceite u otras técnicas de microscopía compleja se han empleado con éxito para detectar la variación somaclonal en regenerantes *in vitro* (Al-Zahim *et al.*, 1999; Raimondi *et al.*, 2001; Mujib *et al.*, 2007), sin embargo, lleva mucho tiempo y, a menudo, es tedioso. Como resultado, la citometría de flujo ahora se usa ampliamente para contar y examinar cromosomas (Doležel *et al.*, 2004). Esto implica la

preparación de suspensiones acuosas de núcleos intactos cuyo DNA se tiñe con un fluorocromo de DNA. Los núcleos se clasifican según su intensidad de fluorescencia relativa o contenido de DNA. Debido a que la preparación y el análisis de la muestra es conveniente y rápido, esta técnica se ha empleado para evaluar la detección de variantes somaclonales en fresa (Nehra *et al.*, 1992), banano (Gimenez *et al.*, 2001) y papa (Sharma *et al.*, 2007). Aún no se comprende bien el papel de los compuestos citosólicos que interfieren con la tinción cuantitativa del DNA y se no se tiene un conjunto de DNA de referencia para los análisis y que sean de consulta libre.

V. Proteínas e isoenzimas

Las isoenzimas son variantes diferentes de las mismas enzimas que difieren en la secuencia de aminoácidos, pero catalizan las mismas reacciones metabólicas (Hunter y Merkert, 1957). La variación morfológica es el resultado de la variación bioquímica que se expresa como variación entre proteínas. Como resultado, la propiedad de discriminación de proteínas e isoenzimas es función del número de loci polimórficos que pueden identificarse y caracterizarse genéticamente en un organismo (Jarret y Gawel, 1995). Las proteínas e isoenzimas como la peroxidasa, la malato deshidrogenasa y el superóxido dismutasa se han utilizado ampliamente para estudiar la variación en la caña de azúcar (Srivastava *et al.*, 2005) y frijoles (González *et al.*, 2010). Las variaciones en los somaclones se pueden detectar analizando los clones en busca de polimorfismo de proteínas y enzimas. Los extractos de tejido recién preparados, principalmente de la parte de la hoja, se cargan en un almidón no desnaturalizante o gel de poliacrilamida. Las proteínas de estos extractos se separan por su carga neta y tamaño durante la electroforesis y la incubación con isoenzimas específicas. Posteriormente, la posición de una enzima particular en el gel se detecta después de la incubación con un tinte (Jarret y Litz, 1986). Dependiendo del número de loci, su estado de homo o heterocigosidad y las isoenzimas específicas utilizadas, se visualizan una o varias bandas y el polimorfismo de las bandas revela variación (Weising *et al.*, 2005). Aunque los análisis de patrones de isoenzimas de enzimas específicas proporcionan un método conveniente para la detección de cambios genéticos, la técnica está sujeta a variaciones ontogénicas, así como a otros factores ambientales. Además, el número de isoenzimas es limitado y solo se pueden muestrear las regiones de DNA que codifican proteínas solubles (Venkatachalam *et al.*, 2007). Actualmente muchos autores ya no

confían en esta técnica para detectar variantes y en su lugar se emplean ahora otras técnicas más sensibles.

La elección del método de detección depende de la tarea que se esté realizando. Generalmente, aunque las técnicas moleculares permiten la detección de variantes en estadios juveniles usando ácidos nucleicos en contraposición a métodos morfológicos y fisiológicos donde se mide la respuesta de la planta adulta.

1.8 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son secuencias de DNA identificables, se encuentran en ubicaciones específicas del genoma y son transmitidos mediante leyes de la herencia de una generación a otra.

Los marcadores moleculares revelan sitios de variación en la secuencia de DNA; sin embargo, hay marcadores moleculares asociados genéticamente a una característica específica y que son de particular interés en programas de mejoramiento, debido a que permiten el rápido monitoreo de grandes números de plantas a una temprana edad del desarrollo, lo que facilita la identificación de individuos que contengan el carácter de interés. Además, son de gran ayuda en la selección de los padres donantes para nuevos programas de mejoramiento y en la introgresión de caracteres, es por ello que el uso de técnicas moleculares permite la estimación de la diversidad genética dentro de especies y entre ellas para realizar estudios poblacionales, clasificación de germoplasma, mejoramiento e identificación de genes de caracteres cualitativos y cuantitativos mediante la detección del polimorfismo directamente del DNA (Cornide-Hernández *et.al.*, 2002).

Entre los diversos marcadores disponibles para el análisis genético en plantas, los marcadores moleculares son más eficientes, precisos y confiables para discriminar especies y variedades estrechamente relacionadas y, por lo tanto, tienen un gran potencial en programas de mejoramiento asistidos por marcadores. El desarrollo y uso de marcadores moleculares para la detección y explotación del polimorfismo del DNA es uno de los desarrollos más importantes en el campo de la genética molecular. Estos no deben considerarse genes normales, ya que generalmente no tienen ningún efecto biológico, sino que pueden considerarse como puntos de referencia permanentes en el genoma.

Entre las principales propiedades esperadas de un marcador molecular se encuentra, la capacidad para detectar bandas polimórficas, las cuales representan un medio para evaluar la diversidad genética entre las muestras seleccionadas a evaluar; el carácter dominante, lo que significa la posibilidad de detectar genotipos heterocigóticos en organismos diploides; la reproducibilidad, facilidad y rapidez en su ejecución; la capacidad de distribución uniforme en todo el genoma, a excepción de los que involucran un locus específico en el genoma en cuestión (Ford-Lloyd y Painting, 1996).

El uso de las técnicas moleculares nos permite también la estimación de la diversidad genética dentro de las especies y entre ellas para estudios poblacionales, clasificación de germoplasma, mejoramiento e identificación de genes de caracteres cualitativos y cuantitativos mediante la detección del polimorfismo directamente del DNA (Cornide-Hernández *et.al.*, 2002). Una ventaja de los marcadores moleculares es que sólo requieren unos pocos nanogramos de DNA para su análisis, lo cual los hace idóneos para su uso en estudios de ligamiento, así como en programas de mejoramiento vegetal (Farooq y Azam, 2002).

Los marcadores moleculares pueden ser clasificados en dos grupos con base al método de análisis que utiliza: basadas en hibridación de sondas de DNA marcada químicamente y basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (Pech-Hoil, 2017).

PCR es una técnica que permite simular el proceso de replicación de secuencias específicas de DNA *in vivo*, a través de una técnica *in vitro* basada en una serie de ciclos repetitivos (Valdez-Ojeda, 2006). Fue inventada en 1993 por Kary Mullis, gracias a esta invención cualquier región genómica podía ser amplificada y analizada en varios individuos, sin realizar procesos de clonación o de grandes cantidades de DNA de alta calidad (Pech-Hoil, 2014).

Los marcadores del DNA se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del DNA entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante.

1.8.1 Polimorfismo Amplificado de Secuencia Relacionada (SRAP)

El Polimorfismo Amplificado de Secuencia Relacionada es un sistema de marcadores moleculares, fundamentado en la detección de marcos de lectura abiertos (ORF), los cuales fueron desarrollados a partir de los datos de la secuencia del genoma de *Arabidopsis*. Los SRAP proporcionan una combinación única de cebadores directos e inversos que se pueden seleccionar arbitrariamente dando una gran cantidad de combinaciones de cebadores. Dado que son un sistema basado en ORF, la combinación de cebadores se dirige a genes funcionales y es por ello por lo que tienen potencial para su aplicación en la mejora de cultivos (Bharti Aneja *et.al.* 2012).

Este sistema de marcador fue aplicado y demostrado por primera vez por Li y Quirós en 2001 en *Brassica oleracea*, y desde entonces se han publicado varios informes en diferentes especies de plantas que van desde cultivos de campo hasta especies arbóreas, ya sea para evaluar la diversidad genética, mapeo y marcado de genes, identificación híbrida o determinación sexual.

De acuerdo con Li y Quiros, 2001, los marcadores SRAP detectan fragmentos de DNA con alta resolución, polimorfismo y reproducibilidad, así como un elevado número de marcadores dominantes (80%), el proceso es de fácil selección, con una alta simplicidad y fidelidad del sistema, lo cual favorece la amplificación, así como también el aislamiento de secuencias codificantes.

El proceso inicia a partir de la amplificación por PCR, empleando dos cebadores específicos. Los cebadores son de 17 a 18 nucleótidos de largo, los cuales constan de los siguientes elementos: una secuencia núcleo de 13 a 14 bases, donde las primeras 10 u 11 bases que inician en la terminación 5' son secuencias de constitución no específica, seguido de la secuencia CCGG en el cebador en-sentido y AATT en el cebador anti-sentido. Las secuencias CCGG y AATT de los cebadores han sido halladas con frecuencia en regiones de exones, intrones y promotores. Por lo tanto, se puede concluir que los fragmentos de DNA amplificados durante la PCR son en su mayoría, secuencias codificantes (Valdez-Ojeda, 2009).

Por otra parte, el empleo de marcadores a nivel DNA ya se ha reportado en achote. Valdez-Ojeda *et.al.*, (2008), reportan una alta variabilidad en la especie y agrupación en relación con su ubicación geográfica de dos regiones agrícolas del sureste de México, demostrando

el alto porcentaje de polimorfismo utilizando marcadores SRAP, sugiriendo una herramienta eficaz en la determinación de la variación y determinación del polimorfismo en la especie.

Los marcadores SRAP han sido utilizado en diversos estudios y especies, incluida *Bixa orellana* L. Ferriol *et.al.*, 2003 observó correlaciones entre la variación genética y morfológica en *Cucurbita pepo* en comparación con otros marcadores. Los SRAPs han permitido diferenciar cultivares estrechamente relaciones en *Buchloe dactyloides* (Budak *et.al.*, 2004). El uso de SRAP ha permitido diferencias entre cultivares de localidades geográficas distintas y su variación genética en *Pogostemon cablin* (Wu *et.al.*, 2010). También se ha analizado la diferencia inter e intra varietal de una especie cultivada (Espósito *et.al.*, 2011).

En *Bixa orellana* ya se encuentran establecidas las condiciones del sistema del marcador SRAP. En 2008 Valdez-Ojeda y colaboradores reportaron una alta variabilidad en *Bixa* y agrupación en relación a su ubicación geográfica de dos regiones agrícolas del sur-este de México, observaron un alto porcentaje de polimorfismo. demostraron que los marcadores SRAP detectaron polimorfismo entre variantes. También han sido evaluados los parámetros del sistema de entrecruzamiento (Valdez-Ojeda *et.al.*, 2010). Pech-Hoil *et.al.*, 2017 utilizó marcadores SRAP y demostró una variación en el sistema de apareamiento entre fenotipos entre tres sistemas agronómicos, que varían de una mezcla de un sistema de apareamiento mixto al cruzamiento predominante.

Los marcados SRAP sugieren una herramienta eficaz en la determinación de la variación y polimorfismo en la especie.

JUSTIFICACIÓN

Bixa orellana L. se caracteriza por ser la principal fuente natural de bixina, colorante de color rojizo que se obtiene de sus semillas, y la cual posee un potencial uso comercial para las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética. Sin embargo, el rendimiento de la bixina varía considerablemente entre las plantas de *Bixa orellana*, ya que presentan una gran heterogeneidad fenotípica, pobre germinación, baja viabilidad de sus semillas y limitación para su propagación vegetativa vía estacas o acodos, dificultando el establecimiento de plantaciones comerciales homogéneas, lo que provoca una afectación directa en la producción de bixina. Actualmente no existen variedades agronómicas registradas, sólo se han caracterizado por la variabilidad en sus formas (flor y fruto) y contenidos de bixina (Godoy-Hernández, G; 2000). Para tratar de resolver el problema de la heterogeneidad de las plantaciones y obtener plantas genéticamente homogéneas, se partió, de cuatro morfotipos de achiote con altos contenidos de bixina para obtener clones. Con estos materiales se estableció un protocolo de micropropagación *in vitro* a partir de explantes de hipocotilo de una semilla germinada *in vitro* de cada morfotipo. Sin embargo, es fundamental el análisis molecular para conocer si se presentan cambios en la estructura genética de los individuos micropropagados; para lograrlo el uso de marcadores moleculares es una herramienta muy útil. Trabajos previos en *B. orellana* usando los marcadores SRAP (Polimorfismo Amplificado de Secuencia Relacionada) establecerían las bases. De esta forma se puede probar si existen o no cambios genéticos en los morfotipos micropropagados, para posteriormente se podrían utilizar como parentales para generar morfotipos agronómicos con mayores contenidos de bixina.

HIPÓTESIS

Si las plantas de *Bixa orellana* L. micropropagadas son clonas, que los análisis genéticos mediante marcadores moleculares demostrarán que no existe variación en el genoma de los cuatro morfotipos analizados.

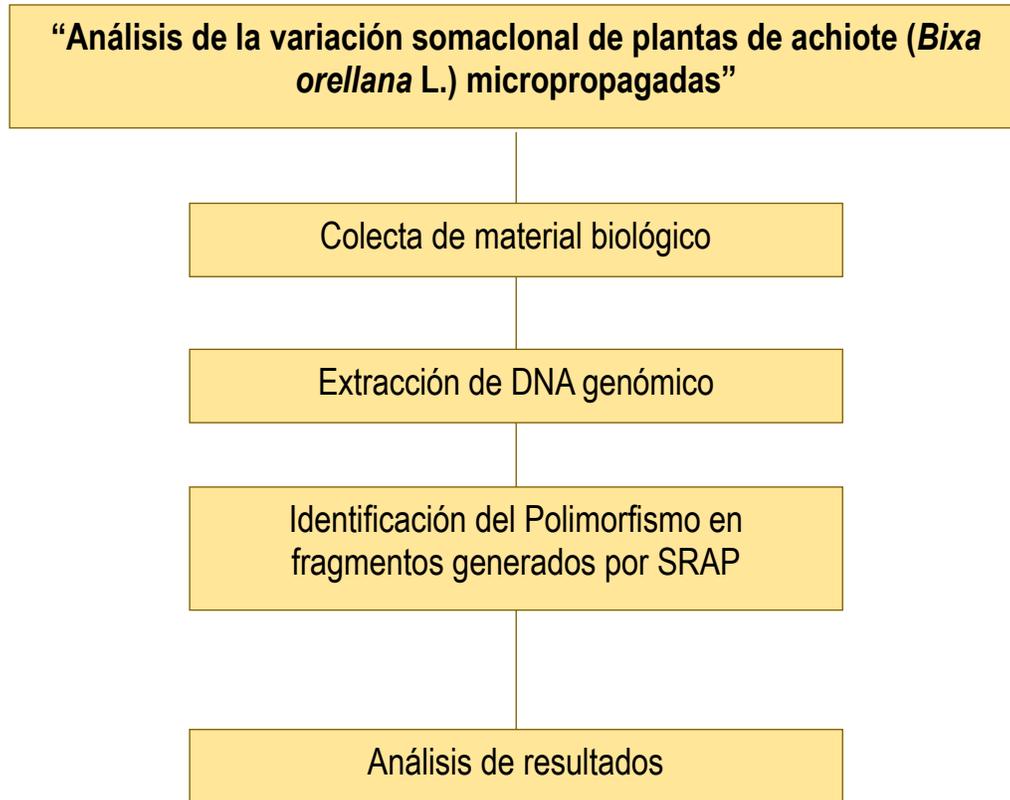
OBJETIVO GENERAL

Analizar la variación molecular en plantas regeneradas mediante micropropagación *in vitro* de *Bixa orellana* empleando marcadores moleculares SRAP.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Selección de marcadores SRAP que identifiquen un alto nivel de polimorfismo.
- b) Caracterizar a través del marcador molecular SRAP la variación genética de las clonas de cuatro líneas de plantas micropropagadas.
- c) Analizar la variación de las clonas de las cuatro variantes seleccionadas.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II. POLIMORFISMO AMPLIFICADO DE SECUENCIA RELACIONADA

I. INTRODUCCIÓN

El Polimorfismo Amplificado de Secuencia Relacionada (SRAP, por sus siglas en inglés) es una herramienta para evaluar la diversidad y la estructura genética de las poblaciones, ha demostrado ser muy útil por varias de sus características como: se basa en la amplificación de dos cebadores que amplifican en su mayoría marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) de los genes (Li y Quiros 2001). Por su diseño de cebador único, los marcadores SRAP son más reproducibles, estables y simples en su funcionamiento si se compara con otras técnicas de marcadores (Li y Quiros 2001).

De acuerdo con Budak *et.al.* 2004, los marcadores SRAP son más eficientes para evaluar la variación genética de una especie a comparación de técnicas como Repeticiones de Secuencia Simple (SSR), Repeticiones de Secuencia Inter-Simple (ISSR) y los marcadores de DNA Polimórfico Amplificado Aleatorio (RAPD). Se ha demostrado que los marcadores SRAP son más eficaces para identificar variaciones en plantas cultivadas *in vitro* (El-Shahed *et.al.*, 2017).

El presente estudio se llevó a cabo para evaluar la fidelidad genética de plantas micropropagadas *in vitro* a partir de explante de hipocotilo utilizando marcadores SRAP de cuatro morfotipos identificados como PR, PV, NE y YUC.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Campo experimental y sitio de colecta

Las muestras de hoja de plantas micropropagadas se colectaron en el vivero experimental del Instituto Tecnológico de Conkal, ubicado en la Avenida Tecnológico s/n, C.P. 97345, municipio de Conkal, situado aproximadamente a 16.3 km de la Ciudad de Mérida, capital del Estado de Yucatán, México.



Figura 7 Ubicación del Instituto Tecnológico de Conkal (Google-Earth, 2019)

2.2 Material vegetal.

Como parte del material vegetal para los estudios moleculares se utilizaron hojas jóvenes de cuatro grupos de plantas con características contrastantes, las cuales se denominaron como: **NE, PV, PR, y YUC**. A continuación, se describen las características morfológicas de los morfotipos antes mencionados en el Cuadro 1.

Cuadro 2 Morfotipos de estudio y sus características de flor y fruto.

	Morfotipo	Abreviatura	Color de flor	Color de fruto
1	Peruana Roja	PR	Morada	Verde con espinos rojos
2	Peruana Verde	PV	Blanca	Verde
3	NE	NE	Blanca	Verde
4	Yucatán	YUC	Morada	Verde con espinos rojos

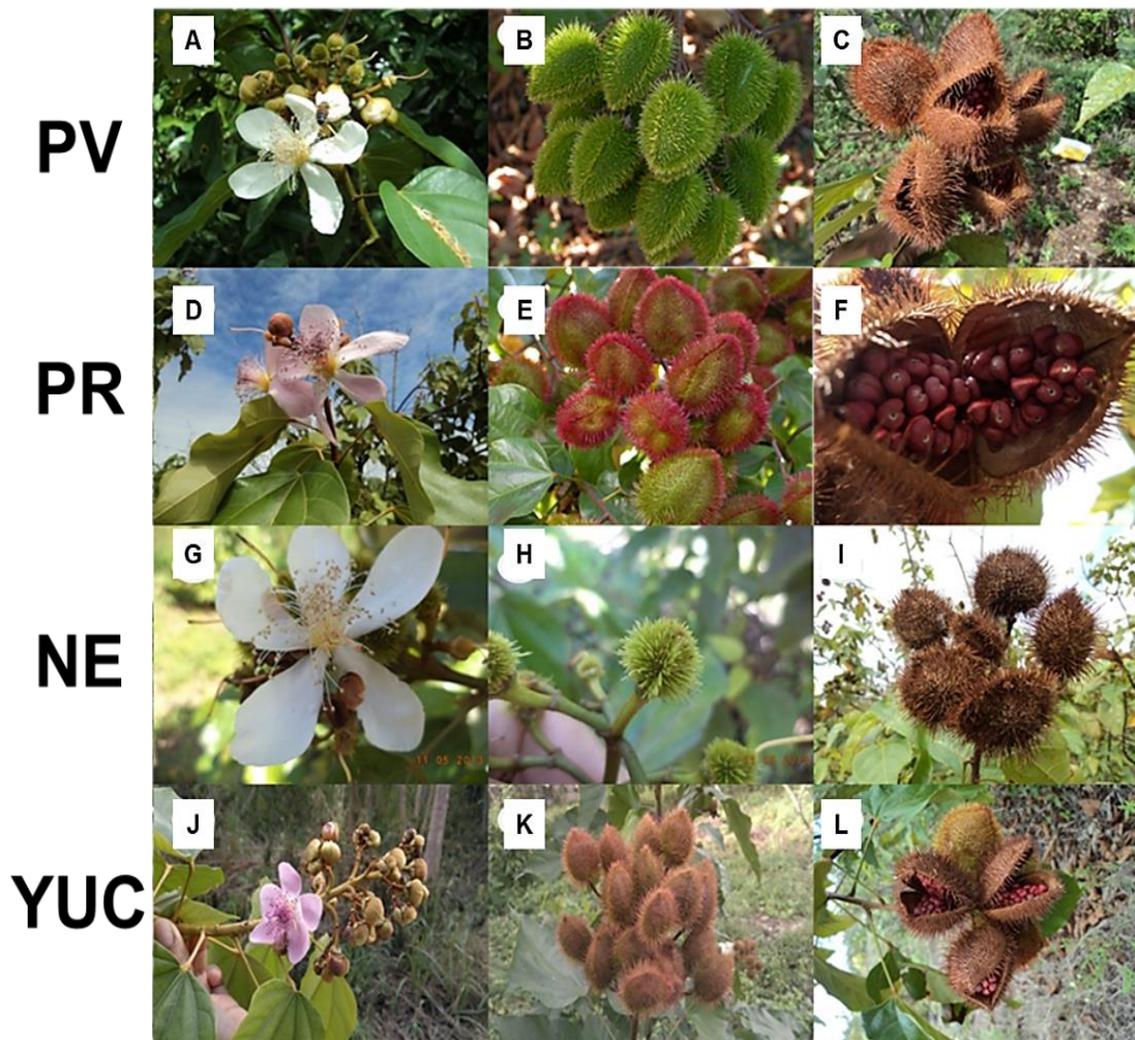


Figura 8 Morfotipos establecidos de acuerdo con sus características fenotípicas, A-C morfotipo PV; D-F morfotipo PR; G-I morfotipo NE y J-L morfotipo YUC (Godoy-Hernández).

Para este trabajo, se estableció una población total de 160 plantas; la cual está conformada por 40 plantas seleccionadas al azar por cada morfotipo. Además de una planta que resultó con características morfológicas variegadas y la cuál se identificó como **VAR** (Figura 9).



Figura 9 Planta variegada (VAR) establecida en campo experimental.

De todas las plantas elegidas se colectaron de cinco a diez brotes de tejido foliar joven que mostraran buen estado fitosanitario y no presentaran daños mecánicos visibles. El tejido foliar joven se obtuvo realizando una incisión en la base de las hojas con tijeras previamente desinfectadas con etanol al 70%, inmediatamente después del corte, el tejido fue envuelto en papel aluminio previamente etiquetado para su identificación y se congeló con nitrógeno líquido para su traslado; el tejido congelado se almacenó a -80°C en Ultra-congelador para su posterior extracción de DNA.

El tejido foliar joven es procedente de plantas regeneradas a partir de una sola semilla por cultivo *in vitro*. El protocolo de regeneración se estableció en el Laboratorio 26 bajo la dirección del Investigador Dr. Gregorio Godoy-Hernández en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

En la primera fase se llevó a cabo la asepsia y germinación de las semillas. Se pesaron de dos a tres gramos de semillas, las cuales se lavaron con etanol al 70% durante cinco minutos; seguidamente acabado el tiempo se desecha el etanol y las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril. Para desinfectar las semillas se usó una solución de hipoclorito de sodio al 75% que se mantuvo durante siete minutos en constante agitación,

este proceso se repitió tres veces o hasta que el agua se observe limpia. Se continuó con tres lavados más de hipoclorito de sodio al 50% en agitación constante; seguido de un enjuague completo con agua destilada estéril (hasta eliminar el color, olor y pigmento procedentes de las semillas). Las semillas asépticas se colocaron en frascos con agua por un periodo de tres días con luz continua a 25°C y una intensidad luminosa de 65 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^2$. Después de permanecer embebidas durante 72 horas, las semillas se transfirieron a frascos con medio PC-L2 (Philips y Collins, 1979) a la mitad de su fuerza iónica, libre de reguladores de crecimiento y con pH 5.5, la temperatura en la sala de cultivo se mantuvo a 25 ± 2 °C con una intensidad de luz de 40-60 $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y fuentes de luz fluorescentes para su germinación. Las semillas comenzaron a germinar en un periodo de siete a quince días.

En la segunda fase la fuente de explantes elegida fueron los hipocótilos. Los segmentos de hipocótilo se segmentaron a 1cm de longitud, consecutivamente se realizaron cortes longitudinales con ayuda de un bisturí y se cultivaron en medio PC-L2 suplementado con 4.43 μM (1 mg L^{-1}) de 6-Bencilaminopurina (BAP). En un periodo de 30 días de estar en el medio se comenzaron a observar los primeros brotes regenerados a partir de los callos inducidos de los explantes de hipocótilo, las condiciones del cuarto de cultivo se mantuvieron a luz continua, a una temperatura de 25°C y una intensidad luminosa de 65.588 $\mu\text{mol m}^{-2}$. La resiembra de callos y brotes se realizó cada 30 días (cuando los brotes tienen 2cm de longitud) a frascos para su elongación a 3cm. Seguidamente los brotes se colocaron en medio suplementado con 7.38 μM de AIB (81.5 mg L^{-1}) para la generación de raíces durante 35 días en el cuarto de cultivo de luz continua con 25°C y una intensidad luminosa de 65.588 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^2$.

Para la tercera fase dedicada a la aclimatación de las plantas, se preparó una mezcla (1:1:1/2) de tierra roja: turba rubia SUNSHINE®: agrolita. Al momento de transferir del medio de cultivo al sustrato se retiró el agar de las raíces con ayuda de agua potable y se les aplicó fungicida. Se colocaron las plántulas en las bolsas de siembra y una bolsa de polietileno se usó para mantener la humedad, este proceso duró 15 días, pasando este tiempo se realizaron orificios medianos a las bolsas de polietileno, a los ocho días se cortaron los extremos de las bolsas para continuar con la adaptación, esta fase se realizó en el cuarto de fisiología donde se tenía una temperatura de 25°C y una intensidad luminosa de 45.285 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^2$. Las plantas se transfirieron al invernadero a los 15 días con riego

programado cada tres días, una vez que alcanzaron una altura de aproximadamente 35 cm, fueron establecidas en el campo experimental antes mencionado.

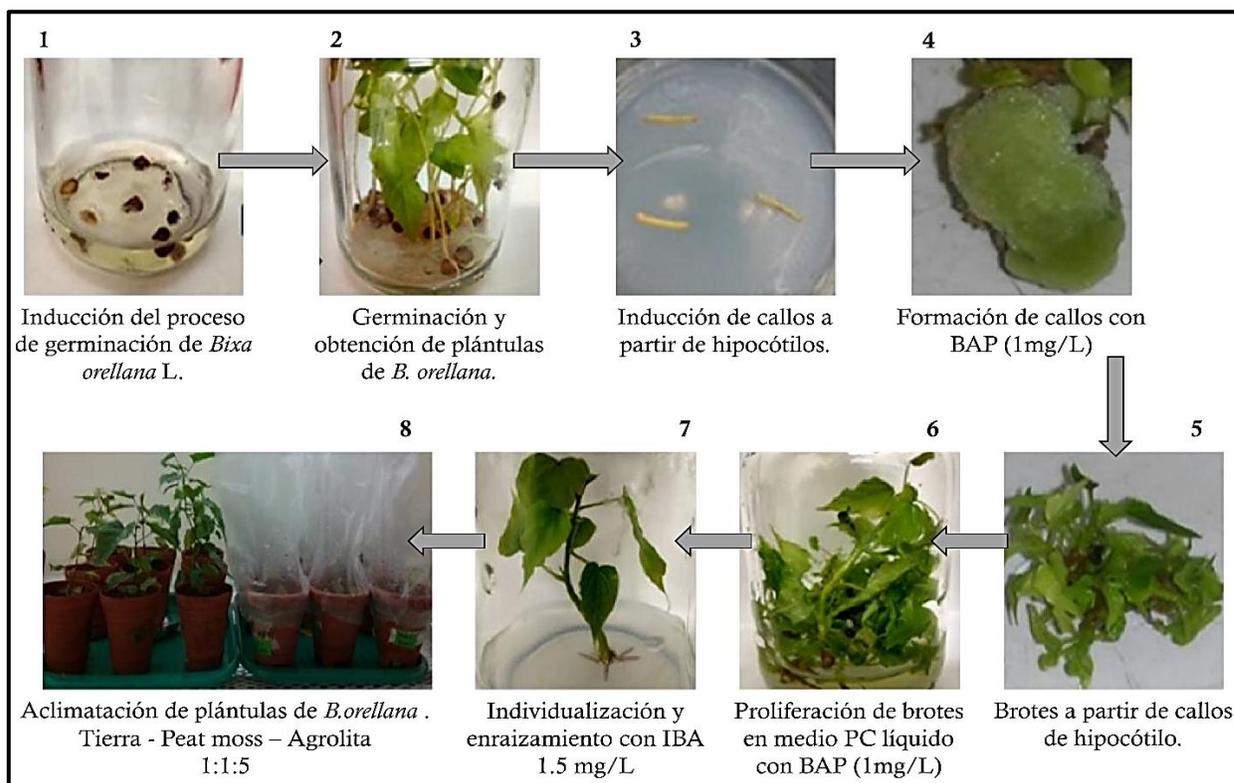


Figura 10 Protocolo de regeneración vía organogénesis indirecta de los morfotipos PR, PV, YUC, NE y VAR, a partir de una sola semilla e induciendo callo a partir de explante de hipocótilo (Godoy-Hernández).

2.3 Extracción de DNA genómico

La extracción se realizó mediante el DNeasy® Plant Mini Kit (250) QIAGEN siguiendo el protocolo de extracción establecido por el fabricante con algunas modificaciones, como se describe detalladamente en el Anexo 1; atendiendo en todo momento de usar material de porcelana, vidrio y plástico libre de DNasa/RNasa. La presencia del DNA genómico se verificó electroforéticamente mediante geles de agarosa al 1%, utilizando un sistema de electroforesis horizontal BIO-RAD ME10-7-10 a 90 volts por 40 minutos, usando como buffer TAE 1x.

Las imágenes de los geles fueron capturadas en un fotodocumentador de Bio-Imaging Systems MiniBis Pro mediante el software Gel Capture. La concentración e integridad del DNA genómico se determinó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 de la marca Thermo Fisher Scientific. Para la lectura en el equipo se utilizó como blanco de referencia el tampón AE del paquete de extracción de DNA utilizado. La pureza del DNA se estableció mediante la relación de las lecturas de absorbancia a 260nm y 280nm respectivamente.

2.4 Selección de cebadores SRAP

Se analizaron 13 pares de cebadores SRAP (Cuadro 2) de los ya reportados para *B. orellana* por Valdez-Ojeda y colaboradores (2010). El análisis SRAP se realizó con cebadores en-sentido etiquetados con IRDye800 o IRDye700 (LI-COR, Lincoln, NE, EE.UU.) para evaluar la estabilidad genética de las plantas regeneradas *in vitro*.

Cuadro 3 Secuencias de los cebadores seleccionados para el análisis mediante SRAP usados en el estudio de *B.orellana* por Valdez-Ojeda *et.al.*, 2010 y Pech-Hoil *et.al.*, 2017.

Combinación de cebadores		Secuencias	IRDye
1	Me2-Odd15	TGAGTCCAAACCGGAGC-GCGAGGATGCTACTGGTT	700
2	Dc1-Odd2	TAAACAATGGCTACTCAAG-TTAGTCTTCACTTCCAAACC	800
3	Me2-Odd26	TGAGTCCAAACC-GGAGC-CTATCTCTCGGGACCAAAC	700
4	Dc1-Odd23	TAAACAATGGCTACTAAG-CTCTCGTCCTTCATCTC	800
5	Dc1-Odd19	TAAACAATGGCTACTCAAG-AGCTTTACGGACATCACTC	800
6	Me2-Sa9	TGAGTCCAAACCGGAGC-GTTGAGAGTGTTGATTGGT	700
7	Dc1-Odd15	TAAACAATGGCTACTCAAG-GCGAGGATGCTACTGGTT	800
8	Em1-Odd21	GACTGCGTACGAATTCAAT-CAGAGTAATTGCCATGAAATG	700
9	Odd3-Odd21	CCAAAACCTAAAACCAGGA-CAGAGTAATTGCCATGAAATG	800
10	Em1-Odd2	GACTGCGTACGAATTCAAT-TTAGTCTTCACTTCCAAACC	700
11	Me2-Sa16	TGAGTCCAAACCGGAGC-AATGTTGTATGACCAAGGTAA	700
12	Me2-Ga45	TGAGTCCAAACCGGAGC-AGTGGTATTTTTGCAGTTCTA	700
13	Dc1-Me7	TAAACAATGGCTACTCAAG-CTCCTCGTCCTTCATCTC	800

2.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa de los marcadores SRAP

Para el establecimiento de las condiciones de amplificación de regiones SRAP de los cuatro morfotipos (NE, PR, YUC y PV) la planta variegada (VAR), se seleccionó como guía el protocolo establecido por Pech-Hoil *et.al.*, 2017. Para la mezcla de la solución reactiva se preparó un volumen final de 15 µl, constituido de la siguiente manera: 1.5 µl de 10X Buffer, 1.2 µl de MgCl₂ (25 mM), 0.3 µl de dNTPs (6.25 mM), 1.0 µl de cada cebador (1 mM), 1.0 µl de 1 u/µl Taq Polimerasa, 1 µl de DNA genómico y 8.0 µl de agua bi-distilada estéril filtrada. Las soluciones reactivas de PCR se sometieron a las siguientes condiciones: un ciclo de 94°C durante dos minutos; 5 ciclos de 94°C durante 30 segundos; 35°C durante 30 segundos, y 72°C durante un minuto; 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, y 72°C durante un minuto; con una extensión final de 72°C durante dos minutos. Para el desarrollo de la PCR se usó un termociclador Bio-RAD T100™ Thermal Cycler.

Para visualizar las bandas esperadas, se llevó a cabo la separación de fragmentos en una electroforesis horizontal de gel de agarosa al 1.8% teñido con 0.3 µl de gel red, y como buffer TAE 1x; donde se inyectó una mezcla de 3 µl de producto de PCR con 1 µl de buffer de carga 6x; por último, como marcador de peso molecular se adicionaron 3 µl de marcador Kb plus al final e inicio del gel. La electroforesis se corrió a 90 voltios durante 35 minutos. Los productos de PCR obtenidos se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

2.4.2 Genotipaje de marcadores SRAP seleccionados en LI-COR 4300

Se seleccionaron los mejores productos amplificados en los que se observaran bandas claras y sin barridos para separarlos por medio de un análisis de electroforesis vertical en el genotipador LI-COR model 4300 DNA Analyzer. Se tomaron 1.7 µl de los productos de la amplificación y se diluyeron en 0.5 µl de la solución Blue Stop Solution (LI-COR, formamida 98%, EDTA 10Mm pH 8.0, con azul de bromofenol 0.1%). Las diluciones se desnaturalizaron durante cinco minutos a 94°C y una vez terminado el tiempo se colocaron rápidamente en hielo por un periodo de cinco minutos.

Para preparar los geles de poliacrilamida al 6.5% se utilizaron 15 ml de Gel Matrix KB Plus al 6.5% (827305607, LI-COR®), el Gel Matrix se mantuvo en agitación durante dos horas y

una vez concluido el tiempo se le agregaron 113 μ l de Persulfato de amonio (APS) al 10% y 12 μ l de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina) sin detener la agitación. La solución se vació inmediatamente entre dos placas de vidrio previamente lavadas con una mezcla de Extran® MA02 y SigmaClean® y enjuagadas con agua destilada. Seguidamente después de secos se limpiaron con 2-Propanol (Isopropanol) hasta observar que no hubieran manchas y quedaran completamente transparentes. Se procedió armar los cristales con sus bastidores y se colocó el peine; se vertió la solución preparada con anterioridad y se dejó polimerizar durante dos horas. Acabado el tiempo de polimerización se ensamblaron todas las partes en el equipo LI-COR® 4300.

Se procedió a realizar una pre-corrída en el genotipador; de acuerdo con Romero-López, 2015; las mejores condiciones durante cuatro horas; éstas condiciones se usaron para la pre corrida con duración de 30 minutos donde se usó TBE 1X (Tris 1M, ácido bórico 1M y EDTA 20 mM, pH 7.0) como buffer.

Una vez aceptado el gel, se procedió a cargar 0.6 μ l de muestra en cada pocillo del peine, colocando al principio y al final de las muestras 0.3 μ l del marcador de peso molecular IRDye® Sizing Standard con fluorocromos infrarrojos IRDye™700 o IRDye™ 800 de 50 a 700 pb, éstos se incluyeron en cada corrida.

Los geles se evaluaron y las bandas obtenidas se codificaron en datos numéricos. Se creó una matriz binaria de presencia y ausencia de bandas convertidos como 1 (presencia) y 0 (ausencia) respectivamente, y sólo se tomaron en cuenta las bandas claramente visibles y definidas. Los tamaños de los fragmentos se calcularon mediante una aproximación a partir de los datos del marcador de peso molecular. La distancia entre bandas se obtuvo mediante medición directa de la imagen. Toda la información se registró en tablas de Microsoft Excel para los análisis correspondientes.

2.5 Análisis de datos

2.5.1 Construcción de las matrices básicas de datos

Para evaluar la variación genética se usaron 13 combinaciones de marcadores SRAP. Para analizar el polimorfismo generado por los marcadores SRAP; se registró el número de alelos detectados en el gel con su respectivo tamaño (pb); se clasificó cada banda visualmente

como “1” para presencia y “0” para ausencia en cada carril y se construyó la matriz binaria en Microsoft Excel con la información generada por todos los cebadores.

2.5.2 Estimación de la diversidad genética

El Contenido de Información Polimórfica (PIC) indica la efectividad de un cebador para detectar polimorfismo basado en que éste es aportado por más de un individuo, con esto se pueden determinar los cebadores que generaron más información polimórfica en los morfotipos evaluados. El rango de los valores de PIC van de 0 (monomórfico) hasta 1 (altamente polimórfico) (Keim *et.al*, 1992).

Se calculó el Contenido de Información Polimórfica mediante la siguiente fórmula dada por Bhat, (2002).

$$\text{PIC} = 2P_i (1-P_i)$$

donde:

P_i: frecuencia de aparición de bandas polimórficas en diferentes cebadores.

Se estimó también el porcentaje de polimorfismo, basado en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Polimorfismo} = \frac{\text{bandas presentes} \times 100}{\text{bandas totales}}$$

El índice de diversidad de Shannon-Wiener (H') mide la heterogeneidad de la comunidad, considera que los individuos se muestrean al azar a partir de una población indefinidamente grande, esto es, una población efectivamente infinita (Pielou, 1975).

El índice de diversidad de Shannon se calcula a partir de la ecuación:

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \ln(P_i)$$

donde:

p: indica la proporción de individuos hallados en la especie.

S: número de especies.

A mayor valor del índice, mayor es la diversidad (García-Nieto, 2014)

2.5.3 Cálculo de valores de similitud y construcción de dendograma

Para estimar las distancias genéticas entre individuos, se utilizó el paquete informático de análisis estadísticos PAleontological STatistics 2019 (PAST3 versión 3.25, Hammer *et.al.*, 2001), donde los coeficientes de similitud se basaron en la presencia o ausencia de alelos.

Se construyó la matriz de distancia genética, calculada mediante el índice de similitud de Jaccard (Jaccard, 1908).

El coeficiente de Jaccard se calculó bajo la expresión:

$$J = A / (A + B + C)$$

donde:

A: representa el número de especies comunes con similitud B, y C representa el número de especies con similitudes comunes entre A y B.

Los valores obtenidos del coeficiente de Jaccard se emplearon para generar un Dendograma de Vecinos Cercanos.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Material vegetal seleccionado

La población de plantas micropropagadas analizadas quedó compuesta por 40 muestras por morfotipo, dando un total de 160 plantas. También se agregó al estudio una planta variegada/moteada que fue marcada desde su etapa de adaptación donde se distinguió por sus características, se decidió hacer un seguimiento y una vez establecida en campo, la planta conservó sus rasgos por lo que se incluyó en el estudio; dando como resultado 161 plantas estudiadas (Cuadro 4) por los marcadores SRAP.

Cuadro 4 Descripción de los morfotipos estudiados, sus abreviaturas, características morfológicas y número de muestras.

	Morfotipo	Abreviatura	Color de flor	Color de fruto	No. Muestras
1	Peruana Roja	PR	Morada	Verde con espinos rojos	40
2	Peruana Verde	PV	Blanca	Verde	40
3	NE	NE	Blanca	Verde	40
4	Yucatán	YUC	Morada	Verde con espinos rojos	40
5	Variegada	VAR	---	---	1

3.2 Extracción, cuantificación y validación de DNA genómico.

Se realizó la extracción de DNA genómico de un total de 161 individuos. La integridad y pureza de los ácidos nucleicos se verificó mediante una electroforesis, donde se pudo observar e identificar una banda única correspondiente a DNA, sin degradación en las muestras y con ausencia de contaminación por RNA (Figura 11).

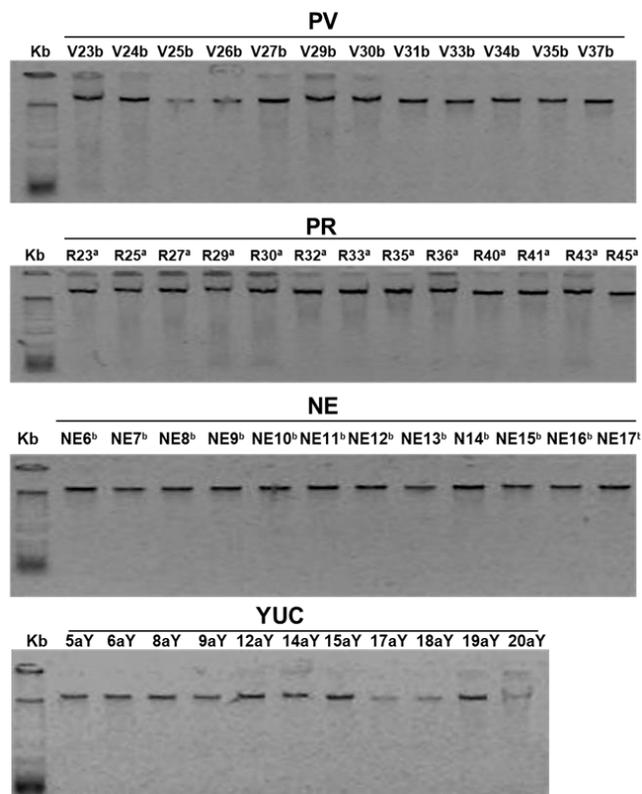


Figura 11 DNA genómico obtenido de muestras de hojas jóvenes de los cuatro morfotipos PV, PR, NE y YUC. Gel de agarosa al 1% en TAE 1x, teñido con 0.3 µl de gel red, se adicionaron 3 µl de DNA genómico con 1 µl de buffer de carga 6x. Donde Kb: marcador de peso molecular 1Kb plus. Las bandas corresponden a individuos de la población. El gel de agarosa se corrió a 90 voltios durante 20 minutos.

El protocolo de extracción seleccionado permitió obtener un rango de rendimiento de 4 a 15 ng/µl de concentración. Los valores de la relación 260/280 oscilaron de 1.48 a 2.29. Las modificaciones que probaron obtener mejores resultados se documentaron cuando las muestras permanecieron por 20 minutos a una temperatura de 65°C en el periodo de incubación y con un tratamiento enzimático de 4 µl de RNasa para eliminar la mayor contaminación por RNA, resultando exitoso el tratamiento. Para la elución se decidió obtener un volumen concentrado de 40µl lo que ayudó a que la integridad de las muestras de DNA genómico fuera óptima para llevar a cabo los estudios seleccionados.

3.3 Validación y estandarización de marcadores para genotipaje en LI-COR® 4300

En base al trabajo de investigación realizado por Pech-Hoil *et.al.*, 2017 se aplicaron las condiciones de amplificación, la solución reactiva propuesta se describió en la sección de materiales y métodos, en los ensayos no se observó una óptima visualización de los amplicones esperados. Por lo que se procedió a realizar modificaciones en la solución reactiva que permitieran una mejor amplificación y visualización de los amplicones esperados. Pech-Hoil, 2017, propone dentro de la solución reactiva el uso de Taq DNA Polimerasa, sin embargo, el DNA genómico que se usó en ese trabajo oscilaba entre 5.2 a 57.1ng/μl, mientras que las muestras obtenidas en el presente trabajo tienen un rango de concentración de 4 a 15 ng/μl; un factor determinante para el correcto funcionamiento de una Taq DNA Polimerasa es que necesita de una mayor concentración de DNA genómico, por lo tanto, se decidió probar con la Platinum Taq DNA Polymerase 5 U/μl Invitrogen No. Catálogo 10966-020 Thermo Scientific, la cual bloquea a temperatura ambiente la actividad de la polimerasa, proporciona un “hot start” automático en la etapa de desnaturalización a 94°C lo que proporciona mayor sensibilidad, especificidad y rendimiento, también disminuye el riesgo de contaminación, mejora los resultados de la PCR y realiza su función con pequeñas cantidades de DNA disponibles en la solución.

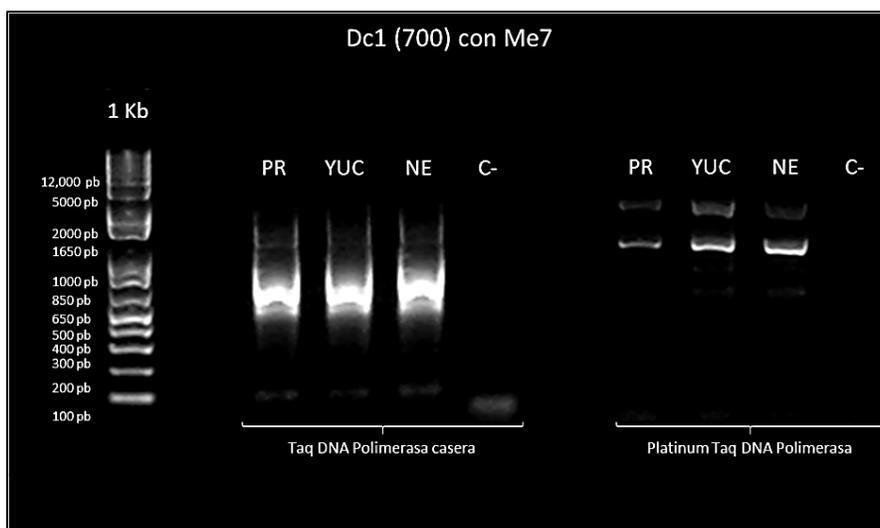


Figura 12 Comparación de las PCR con cebador SRAP Dc1700 con Me7. La Taq DNA Polimerasa corresponde a la solución reactiva propuesta por Pech-Hoil, 2017 y a continuación están los productos de PCR obtenidos con una solución reactiva modificada con Platinum Taq DNA Polimerasa.

En la Figura 12 observamos que el patrón de bandeo usando Platinum Taq DNA Polimerasa se encuentra bien definido en tres morfotipos (PR, YUC, NE) y un control negativo el cuál no contenía DNA, como resultado las modificaciones realizadas en la solución reactiva son reproducibles para los individuos de los cuatro morfotipos a estudiar. Otro factor fue la homogenización de todas las muestras de DNA a una concentración de 8 ng/μl. La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo utilizando los parámetros proporcionados por el kit Platinum Taq DNA Polymerase 5 U/μl Invitrogen No. Catálogo 10966-020 Thermo Scientific, con un volumen total de la solución reactiva de 15μl; los reactivos utilizados fueron: 9.72 μl de agua bidestilada estéril filtrada (H₂O_{dd}), 1.5 μl de amortiguador de PCR 10x, 0.6 μl, 0.10 μl de MgCl₂ a una concentración de 25 mM, 0.10 μl de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP's) a una concentración de 6.25 mM, 1 μl de cada cebador a una concentración de (1 mM), 0.08 μl de Platinum Taq DNA polymerase y 1 μl de DNA genómico.

Usando como templado el DNA genómico se amplificaron en el termociclador Bio-RAD T100™ Thermal Cycler las soluciones reactivas de PCR se realizaron a un volumen final de 15 μl, para lo cual se emplearon placas para PCR 0.2 ml de 96 pozos de la marca NEST Biotechnology

Se utilizó el programa identificado como "SRAPSGGH": 1 ciclo de 94°C por dos minutos (desnaturalización), 5 ciclos de 94°C durante 30 segundos; 35°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto; 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos (hibridación de cebadores), y 72°C durante 1 minuto (elongación); con una extensión final de 72°C durante dos minutos.

Para visualizar las bandas esperadas, se llevó a cabo la separación de fragmentos en una electroforesis de gel de agarosa al 1.8% teñido con 0.3 μl de gel red en TAE 1x, donde se inyectó una mezcla de 3 μl de producto de PCR con 1 μl de buffer de carga 6x; por último, como marcador de peso molecular se adicionaron 3 μl de marcador Kb plus al final del gel. La electroforesis se corrió a 90 voltios durante 35 minutos, en la Figura 13, se puede observar como ejemplo la combinación de cebadores Dc1₈₀₀ con Odd15.

Los productos de PCR obtenidos fueron almacenados a -20°C para su posterior análisis.

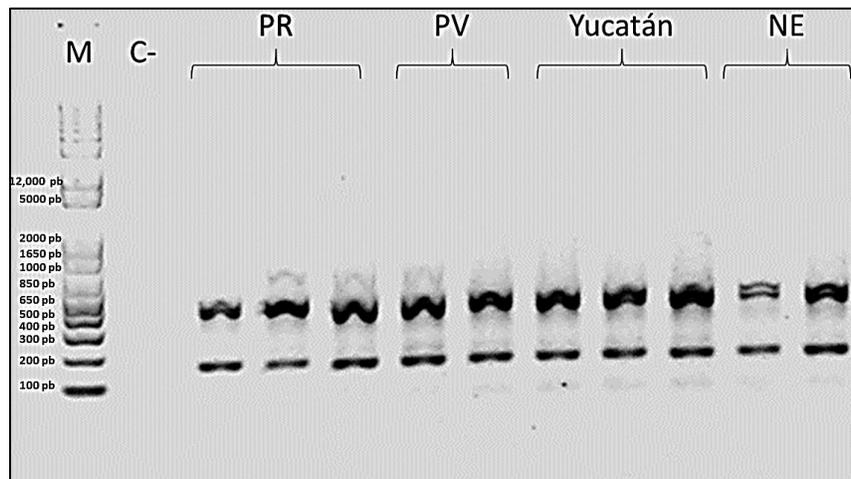


Figura 13 Amplificación del marcador SRAP combinación Dc1800-Odd15, concentración 1mM del cebador. Gel de agarosa al 1.8% teñido con 0.3 μ l de gel red en TAE 1x, 3 μ l de producto de PCR con 1 μ l de buffer de carga 6x; se adicionaron 3 μ l de marcador Kb plus al final del gel. Se corrió a 90 voltios por 35 minutos.

Los 13 marcadores seleccionados fueron validados se sometieron a reacciones de PCR con las modificaciones hechas a la solución reactiva, para ser analizados en el equipo LI-COR® 4300 (Figura 14) donde se hicieron combinaciones en duplex de los marcadores donde la combinación estuvo compuesta por dos cebadores; un cebador marcado con IRDye700 y otro marcado con IRDye800. Todas las amplificaciones realizadas tuvieron éxito al ser analizadas a través del equipo LI-COR® 4300, se inyectaron 0.6 μ l de reacción de PCR en cada pocillo con una concentración de 60 ng/ μ l por muestra.

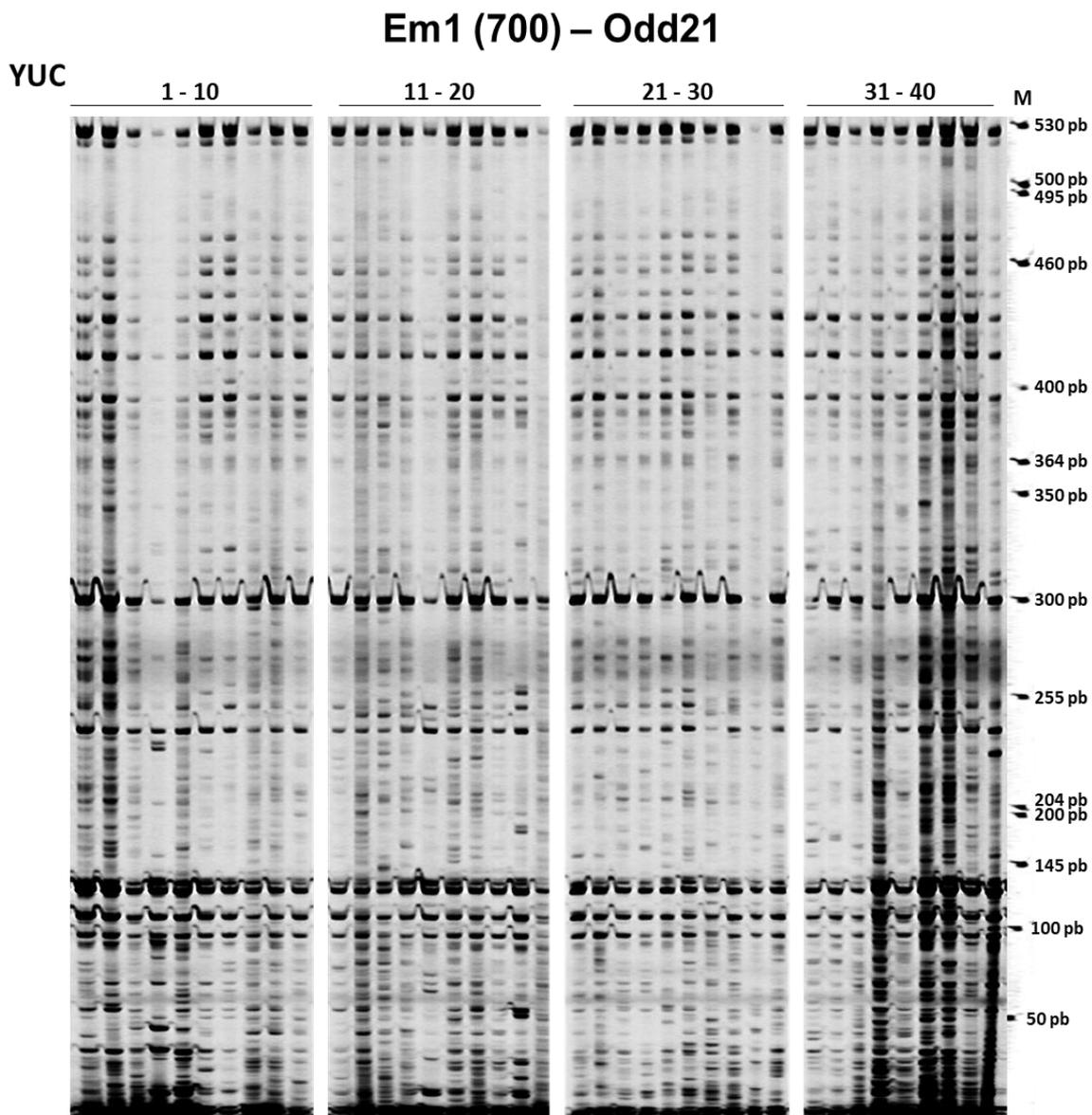


Figura 14 Perfil de amplificación del morfotipo YUC con el marcador Em1(700)- Odd21. Gel de poliacrilamida al 6.5%, electroforesis realizada en el genotipador LI-COR® 4300 a 35W, 35mA y 1500V. En la parte superior se indican las muestras en grupos de 10; de lado izquierdo se indica el tamaño de los alelos con ayuda del marcador de peso molecular IRDye labeled DNA.

A partir de los datos de presencia/ausencia obtenidos para cada SRAP, se construyó la matriz básica de datos, donde se calcularon los valores de similitud genética, utilizando el

coeficiente de asociación de Jaccard. Se obtuvo un valor medio de similitud de 0.291, con valores mínimos y máximos de 0.017 y 1.

Los trece marcadores SRAP identificaron un total de 674 alelos, con un promedio de 52 alelos por locus, en un rango entre 21 (Dc1₈₀₀ - Odd2) y 75 (Me2₇₀₀ - Sa9) en una población de 161 individuos de estudio. El tamaño de banda varía de 50 a 700 pb. Los resultados son similares a otros estudios realizados con SRAP's, como el estudio de Yousefi *et.al.*, (2018) en el que fueron identificados 294 alelos con nueve iniciadores SRAP en 57 genotipos de la especie diploide *Trifolium pratense* L. Considerando que los estudios mencionados presentan una muestra poblacional y número de SRAP mayor y menor, respectivamente.

Cuadro 5. Características de los productos amplificados SRAP utilizados para el análisis de la variación somaclonal del achiote.

Marcadores	Número de loci	Tamaño de bandas (pb)	No. Total de bandas	% Polimorfismo	Diversidad genética (PIC)
Dc1 (800) - Odd19	37	71 - 600	1553	26.07	0.347
Me2 (700) - Odd26	49	72 - 700	1955	24.78	0.326
Me2 (700) - Ga45	43	63 - 580	1897	27.4	0.343
Me2 (700) - Odd15	35	69 - 539	1369	24.29	0.345
Dc1 (800) - Odd15	46	50 - 638	2124	28.67	0.382
Dc1 (800) - Odd23	47	81 - 600	2000	26.43	0.341
Odd23 (800) - Odd21	71	50 - 414	3047	27.03	0.357
Em1 (700) - Odd21	63	50 - 700	3083	29.46	0.375
Dc1 (800) - Odd2	21	50 - 510	1043	30.85	0.358
Me2 (700) - Sa16	69	73 - 675	3041	27.37	0.379
Me2 (700) - Sa9	75	74 - 691	3089	25.58	0.348
Dc1 (800) - Me7	47	62 - 590	1965	25.96	0.364
Em1 (700) - Odd2	71	71 - 700	3009	26.32	0.354
	Total= 674				Promedio= 0.355

Los valores obtenidos del contenido de información polimórfica (PIC) tuvieron un máximo de 0.382 y un mínimo de 0.326, con un valor medio de 0.355 (Cuadro 5). Los valores de discriminación obtenidos de Contenido de Información Polimórfica fueron mínimos,

indicando así que la variación somaclonal es muy baja. Resultados similares fueron observados por Bhatt *et.al.*, 2017 con un PIC promedio de 0.33, con un rango de 0.14 y 0.51, donde se probaron diez combinaciones de iniciadores SRAP en 16 genotipos de *Cuminum cyminum* L. Un estudio que también puede ser comparable con los resultados obtenidos es el de Maghsoudi *et.al.*, 2018 donde se analizaron 12 combinaciones SRAP en 55 accesiones de *Foeniculum vulgare* Mill. obteniendo un PIC promedio de 0.36, siendo 0.47 el PIC más alto y el menor fue de 0.27.

El cebador Dc1-Odd15 presenta el mayor Contenido de Información Polimórfico (PIC) con un valor de 0.382, lo que indica que es el marcador con mayor capacidad de discriminar los loci (Cuadro 5), le sigue el cebador Me2-Sa16 con un PIC de 0.379. El cebador Me2-Odd26 con un valor de PIC de 0.326 resultó el de menor valor con una capacidad de discriminar ligeramente menor a los demás. Los valores del Contenido de Información Polimórfica son un indicador indirecto de que tan diverso es un grupo o un conjunto de datos y esos bajos valores de discriminación obtenidos en el presente estudio indican que la variación somaclonal es mínima.

Trabajos como los de Guenni *et.al.*, 2016 donde se analizaron siete marcadores SRAP en 43 accesiones de *Pistacia vera* L, dieron como contenido de información polimórfica un promedio de 0.850, una cantidad arriba del doble comparada con los resultados obtenidos, marcando en este estudio una diferencia genética en las accesiones generadas. XIN *et.al.*, 2019 analizaron la diversidad genética en fresas donde obtuvieron un contenido de información polimórfica de 0.911.

Los niveles de polimorfismo generados son significativamente menores a los reportados en otros estudios en los que se han implementado el uso de marcadores SRAP para el estudio de la diversidad genética en distintas especies, comprobando su aplicación universal y alto contenido de información. En la presente investigación se obtuvo un porcentaje promedio de polimorfismo generado por las trece combinaciones de cebadores de 27%. De los trece marcadores seleccionados la combinación Me2₇₀₀ – Odd15 mostró el menor porcentaje de polimorfismo con un 24.29%, mientras que el marcador Dc1₈₀₀ – Odd2 fue ligeramente mayor a las demás combinaciones con 30.85%. El porcentaje de polimorfismo generado por estos dos marcadores no ha sido documentado en estudios anteriores relacionado al análisis de variación somaclonal.

En 2016 López-Gómez y colaboradores, estudiaron la variación somaclonal de plantas de Banano cv. Manzano regeneradas *in vitro* mediante embriogénesis somática indirecta (ESI-1 explante flor masculina joven y ESI.2 explante de yemas florales) y organogénesis directa (OD) a partir de explantes de yemas florales obtenidos de una sola planta madre. En cuanto al uso de marcadores SRAP obtuvieron un 19.5%, 12.5% y 24.2% de polimorfismo entre plantas regeneradas de ESI-1, ESI-2 y OD respectivamente. Comparando los resultados correspondientes a organogénesis directa del estudio de López-Gómez (24.2%) y los de la presente investigación (27%) a partir de organogénesis indirecta se obtuvieron resultados similares confirmando niveles de variación bajos entre los morfotipos regenerados.

Los marcadores moleculares SRAP no sólo son viables para la detección de porcentajes bajos de polimorfismo; por ejemplo, Bhatt *et.al.*, 2017 evaluó la diversidad genética de 16 genotipos de *Cuminum cyminum* L. del cual obtuvieron un porcentaje promedio de 91% de polimorfismo generado por 10 combinaciones de cebadores SRAP generando un nivel moderado de diversidad genética entres los genotipos.

En 2018 Thorat y colaboradores analizaron la fidelidad genética en plantas micropropagadas de *Saccharum officinarum* L. mediante marcadores RAPD e ISSR, compararon la eficiencia entre regeneración a partir de organogénesis directa e indirecta, haciendo uso de explantes de yemas axilares, meristemos apicales y hojas para el caso de organogénesis indirecta y cultivo de callos para organogénesis indirecta. Las plantas micropropagadas a partir de organogénesis directa fueron genéticamente similares y fieles al tipo respecto a la planta madre y no se produjo diferenciación durante la micropropagación. Determinaron que las plantas regeneradas a partir de organogénesis indirecta conducen a diferentes niveles de variación somaclonal o epigenética, el polimorfismo generado fue de 4.54% un nivel bajo de variación.

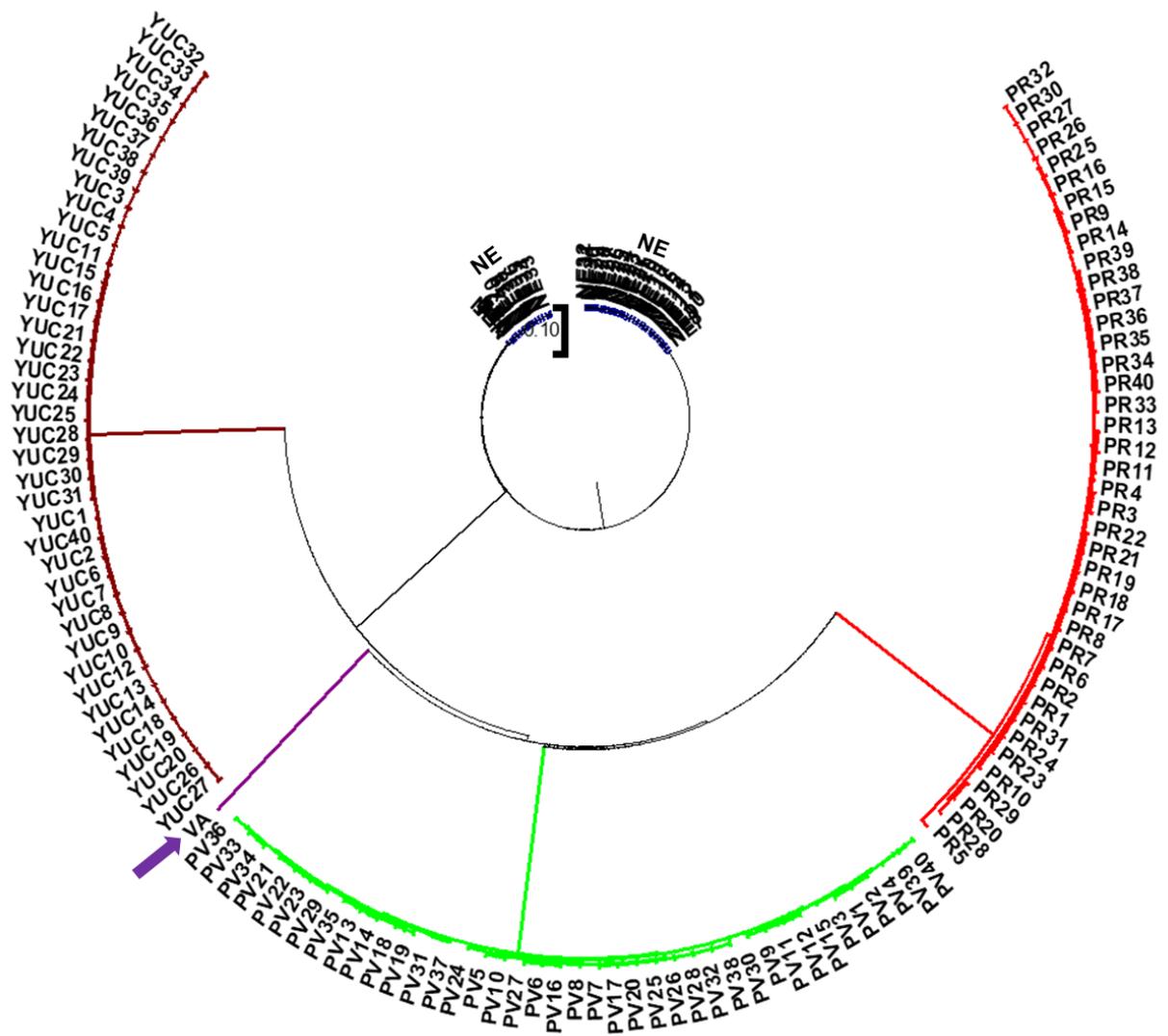


Figura 15. Dendrograma circular de similitud genética basados en datos analizados de 161 plantas (Morfofitos: NE(40), YUC(40), PR(40), PV(40) y VAR (1)) con trece marcadores SRAP. Basado en el coeficiente de Jaccard, Neighbour Joining, bootstrap de 100 repeticiones.

En la figura (15) se ilustra el Dendograma de la relación genética entre las 161 plantas micropropagadas, basado en el coeficiente de Jaccard y aplicando bootstrap de 100 repeticiones, los morfotipos como se observa en la imagen se diferenciaron en cuatro grandes grupos, presentando una distancia menor a 0.01 los morfotipos YUC, PR, PV y VAR. Mientras que el morfotipo NE es distinto a todos. Aun así, en todos los morfotipos se resalta una baja variabilidad entre individuos, por lo tanto, ningún grupo muestra variación.

El morfotipo identificado como VAR resultó una planta con características variegadas durante el proceso de micropropagación, mantuvo sus características durante el proceso de aclimatación y establecimiento en campo, en algunas ocasiones estos rasgos se pierden conforme las plantas avanzan a una edad adulta (Koh-Cheong *et.al.*, 2001). De acuerdo con el Dendograma basado en el coeficiente de Jaccard (Figura 15) se observó el morfotipo VAR tiene similitud genética con el morfotipo PV, por lo tanto, se espera que VAR posea rasgos morfológicos asociados a PV (flor blanca, fruto verde dehiscente).

Ramírez-Mosqueda *et.al.*, 2015 reporta la presencia de individuos con características variegadas en plántulas regeneradas de *Vanilla planifolia* Jacks a partir de una ruta de organogénesis indirecta, la presencia de individuos variegados aumenta cuando se seleccionan rutas morfogénicas indirectas, ya que el cultivo de callos requiere de una adaptación celular a las condiciones de cultivo *in vitro* causando cambios genéticos (Kaepler *et.al.*, 2000).

En otros estudios como el de Shen *et.al.*, 2007 se analizó la variación somaclonal en plantas de *Dieffenbachia* regeneradas a través de organogénesis indirecta utilizando explantes de hoja, como resultado del proceso de morfogénesis se obtuvieron plantas con características variegadas y con diferentes rasgos morfológicos durante su crecimiento.

En el caso del morfotipo PR las mutaciones son bajas y no se alcanzan a distinguir como para separarlas en grupos (Figura 16).

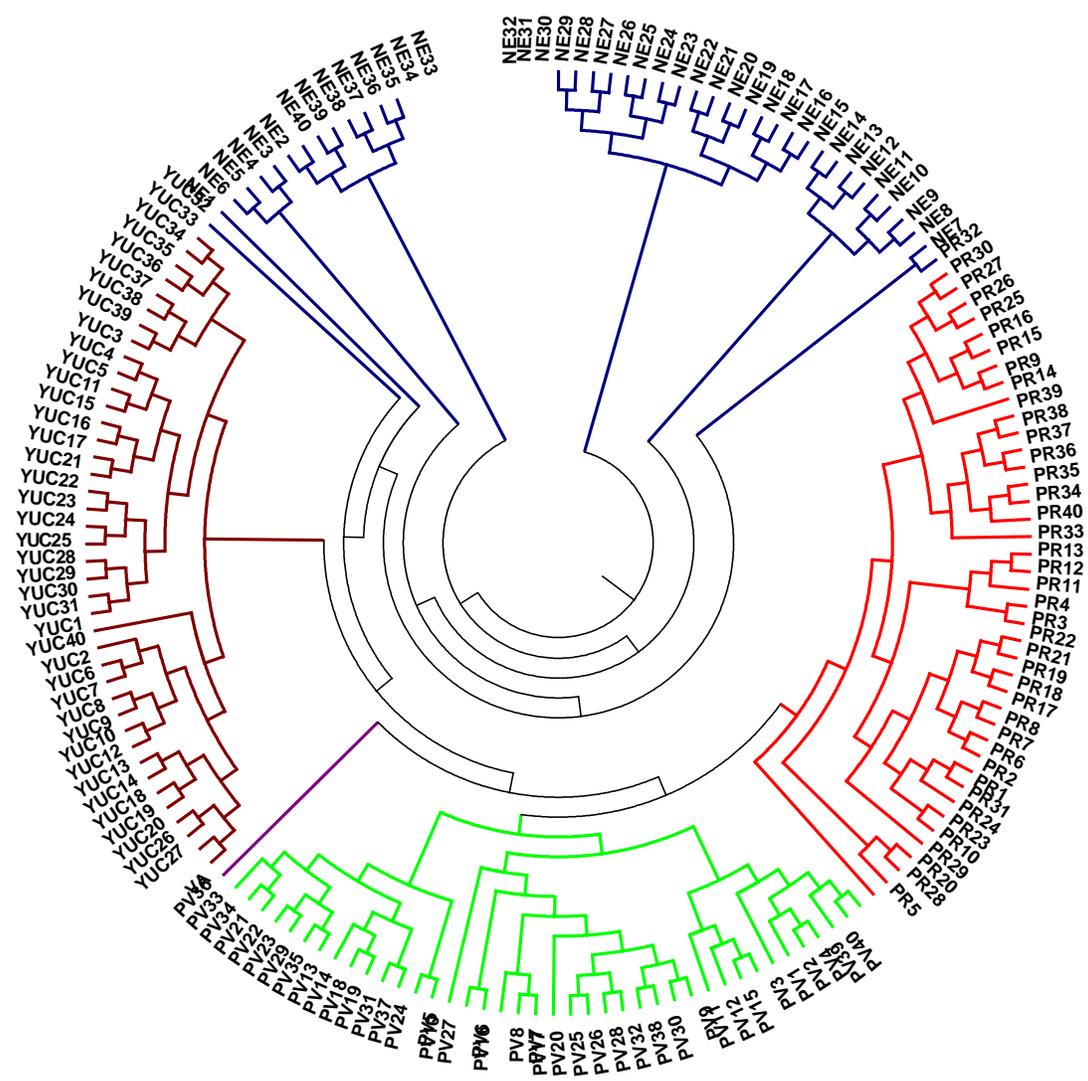


Figura 16. Dendrograma circular de similitud genética con topología de 161 plantas (Morfotipos: NE(40), YUC(40), PR(40), PV(40) y VAR (1)) con trece marcadores SRAP. Basado en el coeficiente de Jaccard, Neighbour Joining, bootstrap de 100 repeticiones.

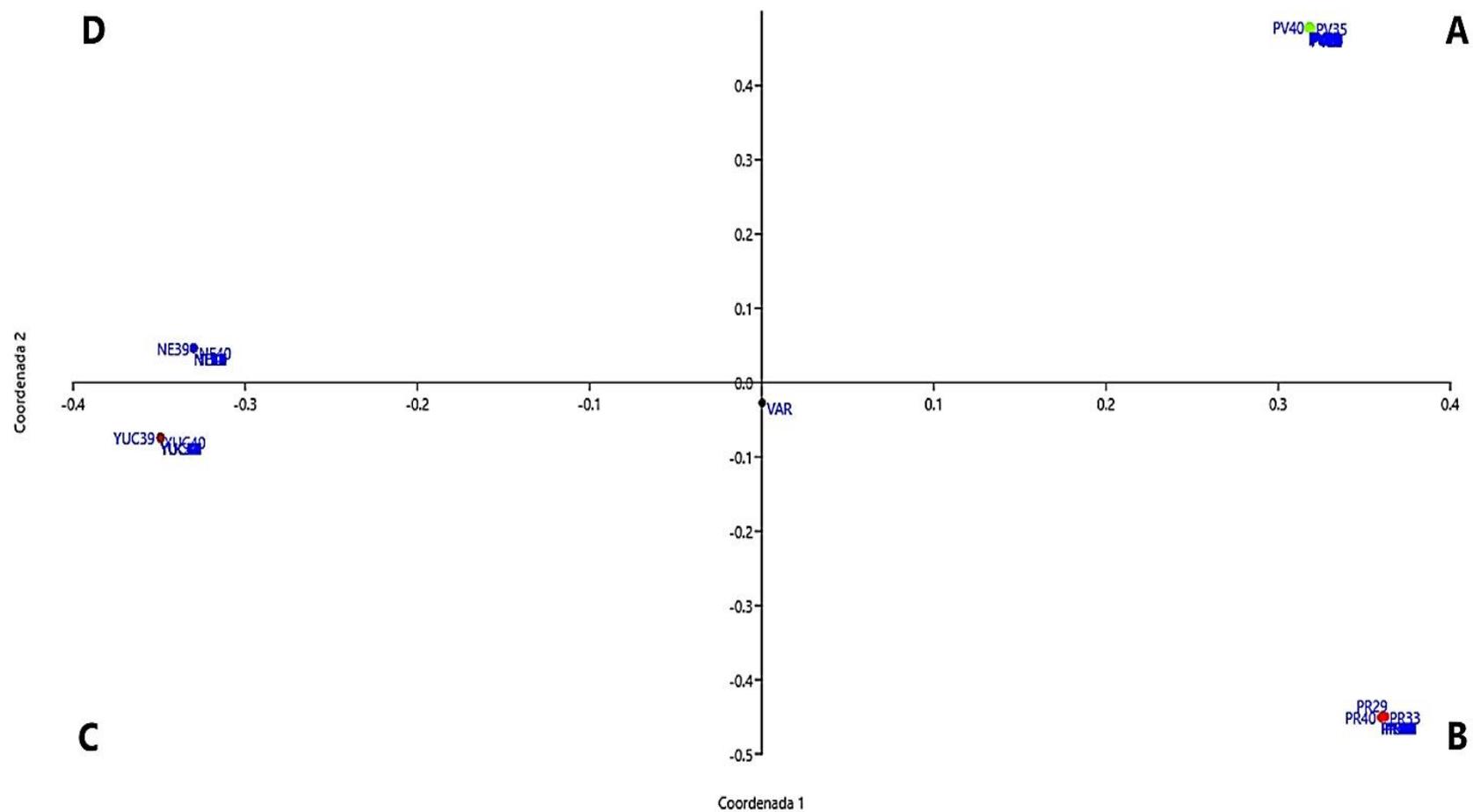


Figura 18. Análisis de Coordenadas principales (PCoA) con marcadores SRAP seleccionados, con un índice de similitud de Jaccard de 161 plantas micropropagadas ((Morfotipos: NE(40), YUC(40), PR(40), PV(40) y VAR(1)). Usando el programa Past3 para analizar la matriz binaria.

El análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en el índice de similitud de Jaccard permitió diferenciar cuatro grupos genéticamente definidos por morfotipo, no se observaron plantas distribuidas al azar en los cuadrantes, lo que demuestra la estabilidad genética a pesar de haber sido regeneradas vía organogénesis indirecta. En cuadrante **A** se distribuyen todas las clonas pertenecientes al morfotipo PV (Figura 18). En el cuadrante **B** se muestran las clonas del morfotipo PR; en el cuadrante **C** se agrupan de manera homogénea las clonas del morfotipo YUC y en el cuadrante **D** se definen las clonas del morfotipo NE. La planta variegada denominada VAR se agregó con todos los morfotipos a este análisis, los resultados la posicionaron segregada en el centro de los cuadrantes. En resumen, todos los grupos en los que están las clonas son muy homogéneos, la dispersión de los datos es muy pequeña y coincide con la información proporcionada por el Dendograma Circular de Jaccard (Figura 16).

Maghsoudi-Kelardashti *et.al.*, 2018 obtuvieron resultados similares al realizar sus análisis de conglomerados, donde se puede observar la formación de cinco grupos, todos asociados en este caso a su locación geográfica. Los cinco grupos definidos en el Dendograma basado en la similitud de Jaccard coincidieron con el análisis de coordenadas principales, se observó la poca variación dentro de cada cluster y la poca formación de subgrupos (Figura 16).

IV. CONCLUSIONES

- Se logró la estandarización de la amplificación, condiciones de genotipaje y validación de trece marcadores SRAP con una menor concentración de DNA genómico para 161 plantas micropropagadas de *Bixa orellana*, se obtuvieron bandas claras, leíbles y reproducibles en todos los casos.
- El uso de marcadores SRAP es una opción viable para la detección de variación somaclonal en plantas micropropagadas de *Bixa orellana* L.
- El protocolo de extracción de DNA genómico de *Bixa orellana* DNeasy® Plant Mini Kit (250) QIAGEN con modificaciones en el protocolo, evidenció rendimientos aceptables en las muestras con una concentración de 4-15 ng/μl; cantidad suficiente para su amplificación con marcadores SRAP.
- La amplificación de los marcadores SRAP con concentraciones de 8ng/μl de DNA genómico es necesario el uso de una Taq comercial que en sus características esté el trabajar con cantidades mínimas de DNA genómico, debido a que en el presente estudio se hicieron pruebas con Taq Polimerasa y no fueron exitosas.
- La variación somaclonal aumenta cuando se incrementan los reguladores de crecimiento, se ha visto en casos como el banano un efecto muy grande en su variación, lo cual indica que el protocolo desarrollado para *Bixa orellana* es exitoso porque conserva la integridad genética de la especie.
- La variación somaclonal es mínima, no se distingue, no hay diferenciación.
- El sistema de regeneración *in vitro* desarrollado puede ser utilizado para la propagación clonal masiva y explotación comercial del achote.
- Los reguladores de crecimiento utilizados no están generando variaciones que comprometan la integridad de los morfotipos.

-
- Las condiciones de crecimiento in vitro pueden generar grandes cantidades de plantas al final del proceso, sin que se produzcan variaciones genéticas en el material debido a los subcultivos.

V. PERSPECTIVAS

- Con los resultados obtenidos durante este trabajo se podrán relacionar los datos moleculares con datos de caracterización morfo-agronómica que permitan establecer plantaciones a gran escala de plantas élite que aseguren una producción homogénea de bixina para su comercialización.
- Dar seguimiento a la planta VAR para observar si sus características se mantienen, así como también caracterizarla morfológicamente y medir su porcentaje de producción de bixina.
- Los marcadores SRAP pueden ser usados para eliminar variantes somaclonales no deseables en laboratorio durante el proceso de regeneración con la opción de ahorrar tiempo y esfuerzos antes de establecer en campo las plantas micropropagadas.
- La caracterización genética y morfológica permite la formación de un banco de progenitores que permita seleccionar en base a los rasgos deseados una producción homogénea.

Por último, se propone conjuntar si las plantas micropropagadas establecidas en campo, al aplicarles un manejo agronómico provocan un aumento o disminución en la producción de bixina.

BIBLIOGRAFÍA

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 de Magister Scientiae. Sc. Turrialba, Costa Rica, UCR-CATIE. 170 p.

Agner, A. R., Barbisan, L. F., Scolastici, C., & Salvadori, D. M. F. (2004). Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. *Food and Chemical Toxicology*, 42(10), 1687-1693.

Al-Zahim MA, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ (1999) Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Rep* 18:473–477.

Aparnathi K, Lata R, Sharma R. 1990. Annatto (*Bixa orellana* L.): its cultivation preparation and usage. *Intern J Tropic Agric*. 8: 80-88.

Ávalos Fernández Jesús M. 2013. Caracterización morfológica de dos variedades de Achiote (*Bixa orellana*) en el municipio de Comalcalco, Tabasco. Tesina de Maestría Tecnológica. 73p.

Baer, D. F. 1976. Systematics of the genus *Bixa* and geography of the cultivated annatto tree. Unpublished Ph.D. Dissertation, Department of Botany, University of California, Los Angeles.

Bairu, M. W., Aremu, A. O., & Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 147-173.

Bharti Aneja, Neelam R. Yadav, Veena Chawla y Ram C. Yadav. 2012. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement. *Mol Breeding* 30:1635–1648 DOI 10.1007/s11032-012-9747-2.

Bhat, K. V. (2002). Molecular data analysis. Proceedings of the short-term training course on molecular marker application in plant breeding.

Bhatt, J., Kumar, S., Patel, S., & Solanki, R. (2017). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers based genetic diversity analysis of cumin genotypes. *Annals of Agrarian Science*, 15(4), 434-438.

Braun AC (1959) A demonstration of the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single-cell origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 45:932–938.

Bogdanova ED (2003) Epigenetic variation induced in *Triticum aestivum* L. by nicotinic acid. *Russ J Genet* 39:1029–1034.

Bouvier F., O. Dogbo, y B. Camara. 2003. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science* 300: 2089.

Budak, H., Shearman, R. C., Parmaksiz, I., Gaussoin, R. E., Riordan, T. P., & Dweikat, I. (2004). Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(2), 328-334.

Castillo, Alicia. 2010. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas.

Cornide-Hernández, M.T., Arencibia A., Berovides V., Calvo D., Canales E., Coto Orlando., González C., Rodríguez M., Sánchez J., Sigarroa A., Xiques X. 2002. Marcadores Moleculares, nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. ISBN: 959-258-351-X.

Cloutier S, Landry B (1994) Molecular markers applied to plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 30:32–39.

Decraene-Ronse, Louise P. 1989. Floral development of *Cochlospermum tinctorium* and *Bixa orellana* with special emphasis on the androecium. *American Journal of Botany*. Vol. 76. No. 9. 1344-1359p. <http://www.jstor.org/stable/244459>.

Devia, P.J.E. y C.L. Saldarriaga. 2003. Planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote (*Bixa orellana* L). *Revista Universidad EAFITt*. 39 (131), 8-22.

Doležel J, Valárik M, Vrána J, Lysák MA, Hribová E, Bartôš J, Gasmanová N, Doleželová M, Safár J, Simková H (2004). Molecular cytogenetics and cytometry of bananas (*Musa* spp.). In: Jain SM, Swennen R (eds) *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*. Science Publishers, Inc., Enfield, pp 229–244.

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

El-Shahed, A. A., Abdellatif, K. F., Ibrahim, I. A., Mohamed, A. M., Abdelsalam, I. Z., & Elsehrawy, O. A. (2017). Efficiency of the new SRAP and TRAP markers to detect the banana somaclonal variants. *Life Science Journal*, 14(3).

Espósito, M. A., Cravero, V. P., Martín, E., & Cointy, E. L. (2011). Uso de marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares SRAP para diferenciar variedades de *Cynara cardunculus* L. (Asteraceae). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 43(2), 35-45.

Evans DA, Sharp WR, Medina-Filho HP (1984) Somaclonal and gametoclonal variation. *Am J Bot* 71:759–774.

Farooq S. y F. Azam. 2002. Molecular markers in plant breeding-I: Concepts and characterization. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5 (10), 1135-1140.

Ferriol, M., Pico, B., & Nuez, F. (2003). Genetic diversity of a germplasm collection of Cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(2), 271-282.

Fiuk A, Bednarek P, Rybczynski J (2010) Flow cytometry, HPLC-RP, and metAFLP analyses to assess genetic variability in somatic embryo-derived plantlets of *Gentiana pannonica* Scop. *Plant Mol Biol Rep* 28:413–420

Ford-Lloyd, B., Painting, K. 1996. Measuring genetic variation using molecular markers. *International Plant Genetic Resources Institute*. 5-39p.

Fortuny Fernández, N.M. 2007. Polinización artificial en achiote (*Bixa orellana* L.). Tesis de licenciatura en Biología. Instituto Tecnológico Agropecuario Número dos. ITA-Conkal, Yucatán.

García Nieto, M. H. (2014). Aportaciones sobre las distribuciones del bastón roto y de pielou. (Doctoral dissertation, Universidad de Salamanca).

Giménez C, de García E, de Enrech NX, Blanca I (2001) Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant CIEN BTA-03. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37:217–222.

Giridhar, P., Mahendranath, G., Venugopalan, A., & Ravishankar, G. A. (2012). Enhanced yield of food colourant annatto from seeds of *Bixa orellana* L.: the efficacy of polyamines

floral spray. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 82(4), 553-556.

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

Godoy-Hernández G. 2012. Protocolo de regeneración de *Bixa orellana* L. (Achiote) a partir de hipocótilos de plantas germinadas in vitro. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. 15p.

González A, De la Fuente M, De Ron A, Santalla M (2010) Protein markers and seed size variation in common bean segregating populations. *Mol Breed* 25:723–740.

Gostimsky SA, Kokaeva ZG, Konovalov FA (2005) Studying plant genome variation using molecular markers. *Russ J Genet* 41: 378-388.

Guenni, K., Aouadi, M., Chatti, K., & Salhi-Hannachi, A. (2016). Analysis of genetic diversity of Tunisian pistachio (*Pistacia vera* L.) using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. *Genet Mol Res*, 15, 166-175.

Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.

Havey MJ, Muehlbauer FJ (1989) Linkages between restriction fragment length, isozyme, and morphological markers in lentil. *Theor Appl Genet* 77:395–401.

Hunter RL, Merkert CL (1957) Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125:1294–1295.

Israeli Y, Reuveni O, Lahav E (1991) Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by in vitro techniques. *Sci Hortic* 48:71–88.

Israeli Y, Lahav E, Reuveni O (1995) In vitro culture of bananas. In: Gowen S (ed) *Bananas and plantains*. Chapman and Hall, London, pp 147–178.

Jaccard, P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci.Nat.* 44, 23–270.

Jaramillo, M. C.A. y Muñoz M. O.A. 1992. Extracción de colorante de Achiote. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Medellín. Universidad Nacional, Facultad Nacional de Minas. Departamento de Procesos Químicos.

Jarret RL, Gawel N (1995) Molecular markers, genetic diversity, and systematics in *Musa*. In: Gowen S (ed) Bananas and plantains. Chapman and Hall, London, pp 66–83.

Jarret RL, Litz RE (1986) Isozymes as genetic markers in bananas and plantains. *Euphytica* 35:539–549.

Jako, C., Coutu, C., Roewer, I., Reed, D.W., Pelcher, L.E. y P.S. Covello. 2002. Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* L. (*Bixaceae*) through expressed sequence tag analysis. *Plant Science*. 163 (1) 141-145.

JECFA (2003). Evaluation of certain food additives and contaminants. Sixty-first meeting report of the joint FAP/WHO expert committee on food additives. Technical Report Series. 683.

Joseph, N., Siril, E. A., & Nair, G. M. (2012). Reproductive characterization and preliminary studies on controlled breeding of Annatto (*Bixa orellana* L.). *Plant systematics and evolution*, 298(1), 239-250.

Karp A (1995) Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85:295–302.

Kaeppeler SM, Kaeppeler HF, Rhee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol Biol* 43:179-188.

Keim P, Beavis W, Schupp J, Freestone R. (1992). Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germ plasm. *Theor Appl Genet* 85:205-212.

Koh, Y. C., & Davies Jr, F. T. (2001). Mutagenesis and in vitro culture of *Tillandsia fasciculata* Swartz var. *fasciculata* (Bromeliaceae). *Scientia Horticulturae*, 87(3), 225-240.

Kunitake H, Koreeda K, Mii M (1995) Morphological and cytological characteristics of protoplast-derived plants of statice (*Limonium perezii* Hubbard). *Sci Hortic* 60:305–312.

Landry BS, Kesseli R, Leung H, Michelmore RW (1987) Comparison of restriction endonucleases and sources of probes for their efficiency in detecting restriction fragment length polymorphisms in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Theor Appl Genet* 74:646–653.

Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation a new source of variability from cell cultures for crop improvement. *Theor Appl Genet* 60:197–214

Leal Freddy y Michelangeli de Clavijo Claret. 2010. Acerca de la Historia, Taxonomía, Botánica y Usos de *Bixa orellana* L. *Revista Unellez Ciencia y Tecnología (Rev.Unell.Cienc.Tec)*. 28: 78-76.

León J. 2000. Lecitadales, Botánica de los cultivos tropicales. IICA. 3a edición. 127-171.

Li, G., y Quiros, C.F. 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*. 103: 455-461.

López-Gómez, P., Escobedo-GraciaMedrano, R. M., Youssef, M., Enríquez-Valencia, A. J., Ku-Cahuich, R., & Iracheta-Donjuan, L. variación somaclonal evaluado mediante marcadores moleculares en la regeneración *in vitro* de banano cv. manzano. *Revista del Centro de Graduados e Investigación*, 54.

Maghsoudi Kelardashti, H., Rahimmalek, M., & Talebi, M. (2018). Genetic diversity in Iranian Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) populations based on sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers.

Mandal A, Maiti A, Chowdhury B, Elanchezhian R (2001) Isoenzyme markers in varietal identification of banana. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37:599–604.

Math R.G., Ramesh G., Nagender A. y Satyanarayana A. 2016. Design and development of annatto (*Bixa orellana* L.) seed separator machine. *Association of Food Scientists & Technologists Design*. 53(1). 703-711 p.

Mazzani, E., Marín R, C., & Segovia, V. (2000). Variability within the Venezuelan annatto (*Bixa orellana* L.) genebank. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia*, 17(6), 492-504.

Medina, A. M., Michelangeli, C., Ramis, C., & Díaz, A. (2001). Caracterización morfológica de frutos de onoto (*Bixa orellana* L.) y su correspondencia con patrones de proteínas e isoenzimas. *Acta Científica Venezolana*, 52(1), 14-23.

Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7, versión 7.0.26; Kumar S, Stecher G, and Tamura K (2016)).

Moreira, P. A., Lins, J., Dequigiovanni, G., Veasey, E. A., & Clement, C. R. (2015). The domestication of annatto (*Bixa orellana*) from *Bixa urucurana* in Amazonia. *Economic Botany*, 69(2), 127-135.

Mujib A, Banerjee S, Dev Ghosh P. (2007). Callus induction, somatic embryogenesis and chromosomal instability in tissue culture-raised hippeastrum (*Hippeastrum hybridum* cv. United Nations). *Propagat Ornament Plant* 7:169-174.

Nakano M, Nomizu T, Mizunashi K, Suzuki M, Mori S, Kuwayama S, Hayashi M, Umehara H, Oka E, Kobayashi H, Asano M, Sugawara S, Takagi H, Saito H, Nakata M, Godo T, Hara Y, Amano J (2006) Somaclonal variation in *Tricyrtis hirta* plants regenerated from 1-year-old embryogenic callus cultures. *Sci Hortic* 110:366–371.

Narciso Reyes, Leonardo J. 2012. “Manual para la producción del achiote (*Bixa orellana*).”, Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Agrícolas. 38p.

Nehra NS, Kartha KK, Stushnott C, Giles KL (1992) The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 29:257–268

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2010. Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. Grupo de Recursos Zoogenéticos y la Dirección de Producción y Sanidad Animal. Viale delle Terme di Caracalla. Roma, Italia. Portal: www.fao.org/DAD-IS.

Pech Hoil, R. 2014. Análisis genético molecular del sistema de apareamiento de plantas de achiote (*Bixa orellana* L.) cultivadas en diferentes condiciones agrícolas en el Estado de Yucatán, México. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

Pech-Hoil, R., Ferrer, M. M., Aguilar-Espinosa, M., Valdez-Ojeda, R., Garza-Caligaris, L. E., & Rivera-Madrid, R. (2017). Variation in the mating system of *Bixa orellana* L.(achiote) under three different agronomic systems. *Scientia Horticulturae*, 223, 31-37.

Pérez, M. y Becerra R. 2003. Manejo Campesino de Recursos Naturales. El Achiote. BioDiversitas. Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 7 (46): 7-11.

Peyvandi M, Noormohammadi Z, Banihashemi O, Farahani F, Majd A, Hosseini-Mazinani M, Sheidai M (2009) Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Olea europaea* L. (cv. Dezful). Asian J Plant Sci 8:146–152.

Phinney BO. (1985). Gibberellin A1 dwarfism and shoot elongation in higher plants. Biol Plant 27:172-179.

Pielou, E.C. 1975. Ecological diversity. John Wiley & Sons, New York.

Portela de Carvalho, J.F.R., I.P. Robinson y A.A. Couto. 2005. Isozymic variability in a Brazilian collection of annatto (*Bixa orellana* L.). Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasilia. 40 (7) 653-660.

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.

Ramírez-Mosqueda, M. A., & Iglesias-Andreu, L. G. (2015). Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 123(3), 657-664.

Raimondi JP, Masuelli RW, Camadro EL (2001) Assessment of somaclonal variation in asparagus by RAPD fingerprinting and cytogenetic analyses. Sci Hortic 90:19–29.

Rem, S. y Espig, G. 1991. The Cultivated Plants of the Tropics and Subtropics. CTA. Verlag Josef Margraf. Wageningen. 552 p.

Rivera-Madrid, R., Escobedo-Gm, R.M., Balam-Galera, E., E., Vera-Ku., y H. Harries. 2006. Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). Scientia Horticulturae. 109 (2), 165-172.

Rivera, Dora I., y Flores, Eugenia M. 1988. Morfología floral del achiote, *Bixa orellana* L. (Bixaceae). Rev. Biol. Trop. 36 (2B): 499-509.

Romero-López, Nayeli. 2015. Construcción del mapa genético de *Bixa orellana* L. mediante marcadores SRAP. Tesis en opción al título de Maestro en Ciencias. Ciencias Biológicas: opción Bioquímica y Biología Molecular. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México. 99p.

Sandoval J, Kerbellec F, Côte F, Doumas P. (1995). Distribution of endogenous gibberellins in dwarf and giant off-types banana (*Musa* AAA, cv. Gran Nain) plants from in vitro propagation. *Plant Growth Regul* 17:219-224.

Sharma S, Bryan G, Winfield M, Millam S (2007) Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta* 226:1449–1458.

Shen, X., Chen, J., & Kane, M. E. (2007). Indirect shoot organogenesis from leaves of *Dieffenbachia* cv. Camouflage. *Plant cell, tissue and organ culture*, 89(2-3), 83.

Srivastava S, Gupta PS, Srivastava BL (2005) Genetic relationship and clustering of some sugarcane genotypes based on esterase, peroxidase and amylase isozyme polymorphism. *Cytologia* 70:355–363.

Standley, P.C. 1923. Trees and shrubs of México (*Oxalidaceae-turneraceae*). Vol. 23, part 3. Smithsonian Institution. United States National Museum. 834-836p.

Scotter, M.J., Castle, L., Honeybone, C.A., and Nelson, C. 2002. Method development and analysis of retail foods for annatto food colouring material. *Food Addit.Contam* 19, 205–222. Doi:10.1080/026520301100 85386.

Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2015. Generalidades del cultivo, Red Achiote. Liga: http://snics.sagarpa.gob.mx/rfaa/Paginas/Impulso/Achiote/Generalidades_Cultivo.aspx.

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

Thorat, A. S., Sonone, N. A., Choudhari, V. V., Devarumath, R. M., & Babu, K. H. (2018). Plant regeneration from direct and indirect organogenesis and assessment of genetic fidelity

in *Saccharum officinarum* using DNA-based markers. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 11, 60-69.

Trujillo Hernández, J. A. (2013). Caracterización de la variación alélica en genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides de *Bixa orellana* L. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. (CICY) Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP), Mérida, Yuc., Mx., 2013.

Unai E, Iselen T, de Garcia E (2004) Comparison of characteristics of bananas (*Musa* sp.) from the somaclone CIEN BTA-03 and its parental clone Williams. *Fruits* 59:257–263.

Us-Camas, R., Rivera-Solís, G., Duarte-Aké, F., & De-la-Pena, C. (2014). In vitro culture: an epigenetic challenge for plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(2), 187-201.

Valdéz Hernández, Enrique Ramón. 1991. Estudios sobre la propagación sexual y asexual del achiote (*Bixa orellana* L). Tesis. Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras.

Valdez-Ojeda, Ruby Alejandra. 2006. Variación morfológica y genética de *Bixa orellana* L. en la región hortícola de Yucatán, México. Tesis. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.

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

Valdez-Ojeda, Ruby Alejandra. 2009. Bases genético-moleculares para el mejoramiento genético del cultivo de achiote (*Bixa orellana*) en Yucatán, México. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). 137p.

Valdez-Ojeda, R., C.F. Quiros, M. Aguilar-Espinosa y R. Rivera-Madrid. 2010. Outcrossing rates in annatto determined by Sequence-Related Amplified Polymorphism. *Agronomy Journal*. 102 (5): 1340-1345.

Venkatachalam L, Sreedhar RV, Bhagyalakshmi N (2007b) Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of bananas using RAPD and ISSR markers. *Electron J Biotechnol* 10:1–8.

Wang Y, Wang F, Zhai H, Liu Q. (2007). Production of a useful mutant by chronic irradiation in sweet potato. *Sci Hortic* 111:173-178.

Weising K, Nybom H, Wolff K, Kahl G (2005) DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. CRC Press, New York.

Wu, Y. G., Guo, Q. S., He, J. C., Lin, Y. F., Luo, L. J., & Liu, G. D. (2010). Genetic diversity analysis among and within populations of *Pogostemon cablin* from China with ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(1), 63-72.

Xin, Y., Fang, X., Wang, S., Tong, J., Lai, W., Wang, J., & Yu, H. (2019). Comparison of simple sequence repeat (SSR) and sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers for genetic diversity analysis in strawberry. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 45(3), 278-287.

Yousefi, S., Saeidi, H., & Assadi, M. (2018). Genetic Diversity Analysis of Red Clover (*Trifolium pratense* L.) in Iran Using Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) Markers. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 20(2), 373-386.

Zotyen-Quan, Cecilia. 2002. Compendio cultivo de achiote: *Bixa orellana* L. Ministerio de Agricultura y Ganadería (El Salvador). Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Nueva San Salvador, DGEA, 87p.