

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.

UNIDAD DE BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Estudios moleculares de genes involucrados con la
biosíntesis de isoprenoides en *Bixa orellana* L.**

TESIS QUE PRESENTA

JOSÉ ALBERTO NARVÁEZ ZAPATA

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS Y
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

BIBLIOTECA 

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO 2001

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Biología Experimental del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección de la Dra. Renata Rivera Madrid, a quien agradezco la amistad y confianza que me brindó durante la realización de este trabajo.

Este trabajo recibió apoyo económico del CONACyT (proyectos, 2201P-N9507 y 31602B) y del IFS (F/2932-1). El autor también agradece al CONACyT el apoyo económico otorgado a través de la beca-credito 96635.

A los miembros de mis comités de evaluación a lo largo de este trabajo: Dra. Patricia León Mejía, Dra. S. M. Teresa Hernández Sotomayor, Dr. Edmundo Lozoya Gloria, Dr. Felipe Vázquez Flota, Dra. Nancy Santana Buzzy y Dr. Gregorio Godoy Hernández.

Al Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, quien me apoyó de manera importante para que continuara mis estudios.

A todos los integrantes del equipo de *Bixa orellana*, ya que con su ayuda y colaboración enriquecieron este trabajo.

En especial a mi familia por que gracias a su estímulo y apoyo pude finalizar con éxito esta empresa.

A todos los amigos y compañeros por la amistad y el tiempo compartido.

INDICE

Abreviaturas	
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo 1. Antecedentes	7
1. Modelo de estudio, <i>Bixa orellana</i> L.	7
Características de <i>B. orellana</i> L.	7
Clasificación	7
Descripción de la planta	7
Variedades cultivadas	7
2. Isoprenoides	8
Características generales de los isoprenoides	8
Rutas biosintéticas para la formación del IPP en plantas	8
Compartimentación del IPP en las plantas superiores	10
Cooperación entre las dos rutas productoras de IPP en las plantas superiores	11
3. Biosíntesis de carotenoides	12
Carotenoides	12
Desaturaciones y ciclizaciones de los carotenoides	12
Apocarotenoides	13
Carotenoides en <i>B. orellana</i> L.	14
4. Enzimas de estudio	15
Generalidades de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa	16
HMGR en plantas	16
Estructura de la HMGR de plantas	17
Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa	19
Fitoeno sintasa	19
Hipótesis	22
Objetivos	22
Capítulo 2. Métodos	31
1. Obtención del material vegetal	31
Planta adulta	31
Obtención de las plántulas	31
Obtención de los callos	31
2. Aislamiento del ADN genómico	32
3. Aislamiento de ARN total	32
4. Obtención de las sondas homólogas de los genes del <i>hmg</i> , <i>psy</i> y <i>DXS</i>	33
Selección y diseño de las secuencias de oligonucleótidos	33
Amplificación por PCR de los genes de interés	34
Clonación de los productos de PCR	34
Análisis de los insertos de interés	36
5. Estudios de expresión	37
Análisis de los mensajeros que codifican para la HMGR por dot blot	37
Análisis de los mensajeros <i>hmg</i> y <i>psy</i> por northern blot	37
Ensayo de protección de ARN contra ribonucleasas para el gen <i>hmg</i>	38
6. Análisis de pigmentos	39
Purificación y cuantificación de carotenos y bixina	39
Análisis de HPLC de los pigmentos en los cultivos <i>in vitro</i>	39
7. Análisis de la actividad enzimática	39
8. Determinación del número de copias del gen <i>hmg</i>	40
Capítulo 3. Resultados	43
1. Establecimiento del material vegetal	43
2. Extracción de ARN total	43
3. Clonación de las secuencias parciales de los <i>hmg</i> , <i>psy</i> y <i>DXS</i>	46
Aislamiento y clonación de la secuencia parcial del <i>hmg</i>	46
Aislamiento de la secuencia parcial del gen <i>psy</i>	49
Clonación de productos de PCR amplificados con oligonucleótidos específicos para el gen	

	<i>DXS</i>	52
4.	Evaluación de la expresión de mensajeros en diferentes tejidos de <i>B. orellana</i>	53
	Análisis de expresión de los mensajeros que codifican para la HMGR usando la técnica de dot blot	53
	Análisis de expresión de los mensajeros del <i>hmg</i> por northern blot	54
	Análisis de expresión de los mensajeros del <i>hmg</i> por RPA	55
	Análisis de expresión de los mensajeros del <i>psy</i> por northern blot	55
5.	Evaluación de la acumulación de pigmentos en <i>B. orellana</i> L.	57
	Análisis de la cantidad de carotenoides en los tejidos seleccionados de <i>B. orellana</i> L..	57
	Cuantificación de carotenos totales y bixina en todos los tejidos analizados de <i>B. orellana</i> L.	58
	Desarrollo del método de HPLC para separar los carotenos totales en los cultivos de callos de <i>B. orellana</i> L.	59
6.	Análisis de la actividad enzimática de la HMGR	60
7.	Análisis de southern blot del gen <i>hmg</i>	61
Capítulo 4.	Discusión y conclusiones generales	63
	Discusión	63
1.	<i>Bixa orellana</i> como un modelo para el estudio de la ruta biosintética de los carotenoides	63
2.	Extracción del ARN total	63
3.	Clonación de las secuencias parciales de los genes de interés	64
	Secuencia parcial del <i>hmg</i>	64
	Secuencia parcial del <i>psy</i>	65
	Caso del pseudogen para el <i>psy</i>	65
	Secuencias clonadas con los oligonucleótidos específicos para el <i>DXS</i>	66
4.	Análisis de expresión	66
	Expresión del <i>hmg</i> durante el desarrollo de la flor, el fruto y formación de semillas en <i>B. orellana</i>	66
	Posible regulación transcripcional del <i>hmg</i> en <i>B. orellana</i> L.	67
	La HMGR de <i>Bixa orellana</i> es codificada por una familia génica	67
	Expresión del <i>psy</i> durante el desarrollo del fruto y formación de semillas en <i>B. orellana</i> L.	68
5.	Acumulación de carotenoides en <i>B. orellana</i> L.	69
	Análisis de carotenoides y bixina durante el desarrollo de la flor, el fruto, semillas y cultivos <i>in vitro</i> de <i>B. orellana</i> L.	69
	Análisis del perfil de HPLC obtenido para los cultivos <i>in vitro</i> de <i>B. orellana</i> L.	69
	Conclusiones generales	71
Capítulo 5.	Perspectivas	75
	Introducción	75
	Función de la HMGR en <i>B. orellana</i> L.	75
	Regulación de la PSY durante la acumulación de bixina	75
	Clonación de la secuencia parcial del gen <i>DXS</i>	75
	Análisis de la síntesis de bixina	76

ABREVIATURAS

ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
ANA	Acido naftalenacético
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMV	Acido mevalónico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ARNr	Acido ribonucleico ribosomal
BAP	Bencil amino purina
CS	Capsantina sintasa
CTAB	Cetil trimetil amonio de bromo
CoA	Coenzima A
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DTT	Ditiotreitol
DXR	Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa
DXPS	Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa
EDTA	Sal disódica del ácido tetra-acético etilén diamino
FPPS	Farnesil difosfato sintasa
GAP	Gliceraldehido 3-fosfato
GGPP	Geranil geranil difosfato
GPP	Geranil difosfato
HMG	3-hidroxi-metilglutárico
HMG-CoA	3-hidroxi-metilglutáril coenzima A
HMGR	3-hidroxi-metilglutáril coenzima A reductasa
IPP	Isopentenil difosfato
IPI	Isopentenil difosfato isomerasa
KDa	Kilodaltones
LCYB	Licopeno β -ciclaza
LCYE	Licopeno ϵ -ciclaza
MCi	MiliCurie
MeJa	Acido metil jasmónico
MOPS	Acido 3-N-morfolino propano sulfónico
MEP	2-C-metil-D-eritritol 4-P
NA	Número de accesión
PDS	Fitoeno desaturasa
Pkat	PicoKatales
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
PSY	Fitoeno sintasa
RPA	Ensayo de protección contra ribonucleasas
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSC	Citrato de sodio salínico
TE	Amortiguador con 10 mM Tris-HCl pH 8 y 1 mM EDTA
ZDS	δ -caroteno desaturasa

RESUMEN

La planta tropical *Bixa orellana* (anato) es la principal fuente de bixina, el cual es el pigmento natural mas usado en la industria alimenticia. Sin embargo, poco se conoce acerca de la fisiología, bioquímica y genética molecular de este cultivo. En este estudio, se presentan algunos resultados sobre la síntesis de carotenoides en *B. orellana*. Se establecieron cultivos *in vitro* de diferentes tejidos de esta planta y se aisló y analizó el ADN, el ARN y las proteínas. Similarmente, se cuantificaron carotenoides totales y bixina. Durante la obtención de estos resultados se establecieron un conjunto de metodologías que pueden ser aplicadas al análisis de la síntesis de carotenoides en *B. orellana*.

Por otra parte, este trabajo representa el primer estudio con un enfoque molecular y bioquímico sobre el desarrollo de las flores y frutos. Esta investigación consistió en el estudio de dos enzimas involucradas en la síntesis de isoprenoides en *B. orellana*.

La primera enzima investigada fue la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (HMGR), la cual juega un papel importante en la síntesis del isopentenil difosfato, el precursor de los isoprenoides, esta enzima se investigó a nivel de su actividad enzimática y de su expresión genética a través del desarrollo de la flor, fruto y formación de las semillas. Un fragmento de 503 pb del gen *hmg* se obtuvo a partir del ADN genómico usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se usó como sonda para northern blot, southern blot y ensayos de protección contra ribonucleasas. En este trabajo, presentamos datos sobre la actividad específica de la HMGR y de la acumulación de sus transcritos en diferentes estadios del desarrollo de las flores y frutos de *B. orellana*. Nuestros datos indican que la HMGR es codificada por una pequeña familia génica y es regulada transcripcionalmente durante el desarrollo de la flor y el fruto. La actividad específica de la enzima, así como la acumulación de sus transcritos mostró ser significativa en las semillas inmaduras.

La segunda enzima analizada, la fitoeno sintasa (PSY) es clave en la síntesis de carotenoides. Se aisló un fragmento de 687 pb del gen *psy* a partir del ADN genómico usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se utilizó como sonda para estudios de expresión. En este trabajo presentamos datos de la acumulación de transcritos en diferentes estadios de desarrollo de las flores, frutos y semillas de *B. orellana*. La acumulación de transcritos fue significativa en las semillas inmaduras, el mismo órgano donde comienza la acumulación de bixina.

ABSTRACT

The tropical plant *Bixa orellana* (annatto) is the main source of bixin, which is one of the most frequently natural pigment employed in the food industry. However, little is known about the physiology, biochemistry and molecular genetics of this crop. In this study, some results on the study of carotenoid biosynthesis in *B. orellana* are presented. *In vitro* cultures from different *B. orellana* tissues were established and DNA, RNA and proteins were extracted and analyzed. Similarly, bixin and total carotenoids were quantified. These studies were intended to establish a set of methodologies to analyze the carotenoids synthesis in *B. orellana*.

On the other hand, this work represents the first study with a biochemical and molecular approach on flower and fruit development of this plant. This investigation consisted in the study of two enzymes involved during the isoprenoid biosynthesis in *B. orellana*. The first enzyme investigated was the 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR), which plays an important role in the synthesis of isopentenyl pyrophosphate, the precursor of isoprenoids, this enzyme was investigated a level of its activity and genetic expression through flowering, fruit development and seed formation. A fragment of 503 bp of the *hmg* gene derived from genomic DNA was obtained using the polymerase chain reaction (PCR) and it was utilized as probe for northern blotting and ribonuclease protection assay. In this work, we present data of HMGR specific activity and transcript accumulation at different development stages of flowers and fruit of *B. orellana*. Our data indicate that HMGR is part of a small genic family and is transcriptionally regulated during the development of the flower and fruit. The specific activity of the enzyme, as well as gene transcript accumulation was shown to be significant in immature seeds.

The second enzyme investigated was the phytoene synthase (PSY) that is key in the synthesis of carotenoids. It was isolated a fragment of 687 bp of the *psy* gene derived from genomic DNA using the polymerase chain reaction (PCR) and it was utilized as probe for the expression studies. In this work, we present data of transcript accumulation at different development stages of flowers, fruits and seeds of *B. orellana*. The transcript accumulation was significant in immature seeds, the same organ where it begins the bixin accumulation.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN GENERAL

Bixa orellana, es un arbusto originario de América tropical, apreciado por su producción de pigmentos carotenoides en la cubierta de sus semillas. Esta planta crece silvestre en toda América desde México hasta Brasil. Con la llegada de los españoles y el descubrimiento de sus cualidades colorantes, esta planta se introdujo en África y de allí pasó a Asia y Oceanía, actualmente se cultiva de forma comercial en diversas partes del mundo (Arce, 1999).

La bixina, el principal caroteno de *B. orellana* se encuentra acumulado en sus semillas y es un caroteno soluble en agua, aceites y grasas. Este pigmento tiene diversas aplicaciones en la industria de los alimentos, ya que posee una gran capacidad para colorearlos adecuadamente, de forma estable y en asociación con algún otro antioxidante sin disminuir su coloración, ni afectar su sabor (Meggos, 1984). El pigmento de las semillas posee además aplicaciones como condimento en alimentos tradicionales en la península de Yucatán, donde es conocido como achiote.

La demanda de este pigmento como colorante comercial va en aumento en el mercado mundial, ya que actualmente se prefiere su uso con respecto a otros colorantes sintéticos de características similares presentes en el mercado (Juárez *et al.*, 1998). Por lo anterior, el achiote ha pasado de ser un cultivo casi olvidado, a una fuente importante de recursos económicos en países donde se ha cultivado tradicionalmente y en África tropical donde fue introducido (León, 1987).

A pesar de la importancia económica de esta planta, sólo se han realizado algunos estudios de carácter agronómico y sobre la naturaleza química de los carotenoides presentes en sus semillas (Mercadante *et al.*, 1996; Godoy-Hernández, 2000).

La bixina y otros carotenoides presentes en las semillas de *B. orellana* pertenecen al grupo de los isoprenoides, una diversa familia de compuestos naturales que presentan más de 22,000 productos identificados y con una gran variedad de funciones en las plantas (Chappell, 1995; Wendt y Schulz, 1998).

La molécula precursora de todos los compuestos isoprenoides es el isopentenil difosfato (IPP). Debido a la gran diversidad de funciones que tienen estos compuestos en el metabolismo de las plantas, la regulación de la síntesis del IPP es compleja, existiendo dos rutas para su síntesis en las plantas, una ruta plastídica donde el IPP se origina a partir del gliceraldehido 3-fosfato y el piruvato (Rohmer *et al.*, 1996; Lichtenthaler, 1999) y una ruta citosólica donde se emplea mevalonato como precursor del IPP (Heintze *et al.*, 1994; Chappell, 1995). Por otra parte, la mayoría de los compuestos isoprenoides en las plantas son producidos únicamente en el interior de los plástidos (Hugueney *et al.*, 1996).

De las dos rutas productoras de IPP, las enzimas 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMGR) y desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXPS) son reguladas en las rutas citosólica y plastídica respectivamente (Bach *et al.*, 1990; Learned y Coonolly, 1997; Lichtenthaler, 1999). Por otra parte, se ha demostrado que la enzima fitoeno sintasa (PSY) es una enzima clave para la formación de carotenoides, ya que es la primera enzima involucrada de forma exclusiva en su biosíntesis (Bonk *et al.*, 1997).

Un primer aspecto de interés para el estudio sobre la acumulación de pigmentos carotenoides en *B. orellana*, es incrementar el conocimiento sobre la regulación de los

genes involucrados directamente en su biosíntesis y en la formación de los órganos donde estos se acumulan. Varias evidencias sugieren que la ruta plástica es más importante para la formación de los carotenoides (Lichtenthaler *et al.*, 1997) ya que el IPP que produce esta comprometido directamente en la formación de estos compuestos en las plantas.

En *B. orellana* se acumulan carotenoides en diferentes tejidos de la planta (Lancaster y Lawrence, 1995) y por lo tanto, resulta interesante como un modelo para el estudio y análisis de la expresión y regulación de enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides y en la formación de los órganos y tejidos donde estos se acumulan.

En este trabajo se analizó la expresión de los mensajeros que codifican para las enzimas HMGR y PSY, durante la producción de carotenoides a lo largo del desarrollo de las flores, frutos y semillas de esta planta, así como en diferentes cultivos *in vitro* recién establecidos para *B. orellana*, que presentan cantidades diferentes de carotenoides.

A lo largo del presente trabajo también se implementaron diversas metodologías moleculares y de cultivo de tejidos que serán usadas como herramientas para generar un mejor entendimiento de la biosíntesis de carotenoides en *B. orellana*, así como contribuir al conocimiento sobre la regulación del enzimas involucradas con la formación del IPP y de los carotenoides en las plantas.

BIBLIOGRAFIA

- Arce J** (1999) El achiote *Bixa orellana* L. Cultivo promisorio para el trópico. 1st Ed. Earth, Costa Rica p:50.
- Bach T, Weber T, Motel A** (1990) Some properties of enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in plants. In Recent Advances in Phytochemistry (GHN. Towers, HA. Stafford, eds.) New York: Plenum Press. 24:1-82.
- Bonk M, Hoffman B, Von Linting J, Schledz M, Al-Babili S, Hobeika E, Kleining H, Beyer P** (1997) Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes *in vitro* reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. Eur. J. Biochem. 247:942-950.
- Chappell J** (1995) Biochemistry and molecular biology of the isoprenoids biosynthetic pathway in plants. Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46:521-547.
- Godoy-Hernández G** (2000) El achiote. Una especie subexplotada. Ciencia y Desarrollo pp: 34-39.
- Heintze A, Grolach J, Leuschner C, Hoppe P, Hagelstein P, Schulze-Siebert D, Schultz G** (1994) Plastidic isoprenoid synthesis during chloroplast development. Change from metabolic autonomy to a division-of-labor stage. Plant Physiol. 93:1121-1127.
- Huguene P, Bouvier F, Badillo A, Quennemet J, D'Harlingue A, Camara B** (1996) Development and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits. Plant Physiol. 11:619-626.
- Juárez R, Morales R, Chacón E** (1998) Estudio preliminar del cultivo del Achiote (*Bixa orellana* L.) en Tabasco. XI Reunión Científica Tecnológica Forestal y Agropecuaria. Tabasco 98. pp:159-163.

- Lancaster F, Lawrence J** (1995) Determination of annatto in high-fat dairy products, margarine and hard candy by solvent extraction followed by high-performance liquid chromatography. *Food Addit. Contam.* 12:9-19
- Learned M, Coonolly E** (1997) Light modulates the spatial patterns of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Co A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 11:499-511.
- Lichtenthaler H** (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:47-65.
- Lichtenthaler H, Scwender J, Disch A, Rohmer M** (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplast proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* 400:271-274.
- León J** (1987) *Botánica de los cultivos tropicales*. 2ª Ed. San José, Costa Rica, IICA. pp:445-456.
- Meggos H** (1984) Colors-key food ingredients. *Food Technology* 1:70-74.
- Mercadante A, Steck A, Rodriguez-Amaya D, Pfander H, Britton G** (1996) Isolation of methyl 9'Z-apo-6'-lycopenoate from *Bixa orellana*. *Phytochemistry* 41:1201-1203.
- Rohmer M, Seemann M, Horbach S, Bringer-Meyer S, Sahn H** (1996) A novel route for synthesis of isoprenoids in the green algae *Scenedesmus obliquuos*. *J. Am. Chem. Soc.* 118:2564-2566.
- Wedt K, Schulz G** (1998) Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes. *Estructure* 6:127-133.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1. Modelo de estudio *Bixa orellana*

Características de *B. orellana*

La planta de *Bixa orellana*, la cual comúnmente se conoce como achiote; anato o bija, es un árbol silvestre originario de América tropical, iniciado como un cultivo debido a que de sus semillas se obtiene un colorante rojo-naranja muy apreciado en la industria alimenticia, principalmente en la elaboración de lácteos como quesos y mantequillas (Márquez y Del Amo, 1982).

Clasificación

El achiote se clasifica de la siguiente manera:

División: Spermatophyta.

Subdivisión: Angiospermae.

Clase: Dicotyledonae.

Orden: Guttiferales.

Familia: Bixaceae.

Genero: *Bixa*

Especie: *orellana* L. (Arce, 1999).

Descripción de la planta

El achiote es un arbusto que mide entre 2 y 7 m de altura, posee un sistema radicular bien desarrollado, hojas compactas con bases acorazonadas y punteadas en el ápice, las flores son hermafroditas con 5 pétalos, 5 sépalos, numerosos estambres y de color variado, el fruto es una cápsula espinosa dehiscente con dos valvas de simetría bilateral (Figura 1.1). Las diferentes combinaciones de forma, tamaño, color y tipos de espinas del fruto permiten hacer distinciones entre las diferentes variedades de la planta (Juárez *et al.*, 1998).

Variedades cultivadas

Son muchas las variedades cultivadas comercialmente de *Bixa orellana*. Sin embargo, las preferidas por los agricultores son aquellas que tienen altos contenidos de bixina (superior al 3 % en las semillas) y aquellas con mucha producción de semillas.

En México esta planta se cultiva principalmente en huertos familiares y con manejo agronómico mínimo en los estados de Veracruz, Tabasco, Campeche, Oaxaca, Chiapas y Yucatán. Hasta el momento se han caracterizado cuatro variedades de *B. orellana*; la india, la jamaquina, la peruana verde y la peruana roja (Juárez *et al.*, 1998).

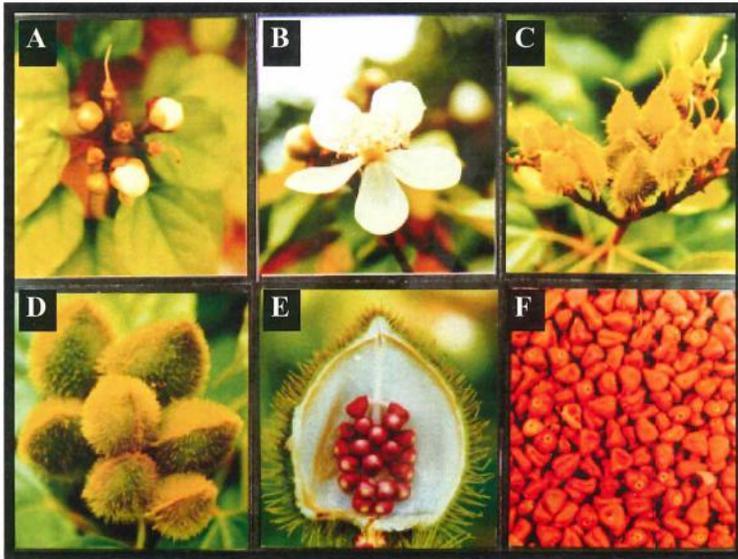


Figura 1.1. Diferentes órganos característicos de *B. orellana* var. india. **A)** botones florales, **B)** flores, **C)** frutos inmaduros pequeños, **D)** frutos inmaduros grandes, **E)** semillas inmaduras y **F)** semillas maduras.

2. Isoprenoides

Características generales de los isoprenoides

Los isoprenoides presentes en las plantas pertenecen a una gran familia de productos naturales que suman más de 22,000 compuestos, muchos de los cuales incluyen metabolitos esenciales como los esteroides, quienes actúan para la estabilización de la membrana y como precursores de las hormonas esteroidales, las hormonas ácido absísico y giberelinas, los carotenoides y cadenas prenil de las clorofilas que actúan en los complejos fotosintéticos, las ubiquinonas y las plastoquinonas requeridas para las cadenas de transporte de electrones; algunos otros metabolitos de esta ruta están involucrados en la prenilación de proteínas y otros más en una multitud de funciones dentro de la biología celular. La molécula base para la formación de los diferentes compuestos isoprenoides es el isopentenil pirofosfato (IPP) (Bach, 1987; Bach *et al.*, 1990; Rohmer, 1999).

Los isoprenoides están formados por adiciones subsecuentes de moléculas de IPP, este proceso es catalizado por diferentes prenil transferasas de las cuales se han caracterizado 16 tipos que catalizan desde la formación del geranil (10 carbonos) hasta el caucho (con más de 5000 carbonos) (Ogura y Koyama, 1998). La variedad estructural dentro de los isoprenoides es originada por diferentes terpenoclasas (Wendt y Schulz, 1998). Un esquema de la ruta se presenta en la figura 1.2.

Rutas biosintéticas para la formación del IPP en plantas

Durante mucho tiempo se creía que los compuestos isoprénicos sintetizados en todos los seres vivos derivaban del IPP formado por la vía conocida como mevalonato (MVA) (Fig.

1.2). Sin embargo, durante los últimos años se generaron resultados que no eran compatibles con la idea de una sola ruta de síntesis para los isoprenoides.

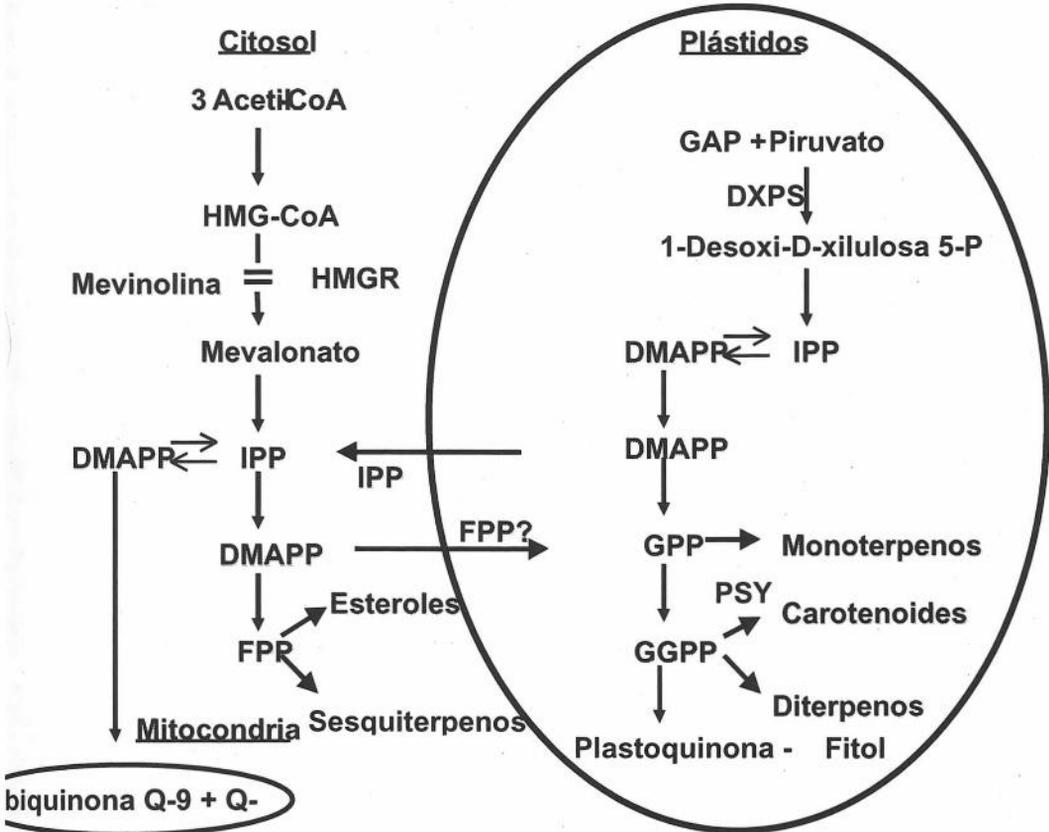


Figura 1.2. Síntesis de isoprenoides en plantas. Se muestran ambas vías productoras de IPP. La ruta del mevalonato para la producción de IPP desde acetil-CoA, por acción de la HMGR, es bien conocida en animales y levaduras y se sugiere se presenta en el citoplasma de las plantas. La ruta desde el piruvato y GAP para la formación de IPP es catalizada por la enzima DXPS y se presenta en bacterias, algas y se sugiere en los pláستidos de plantas. Abreviaciones; Dimetil alil difosfato (DMAPP), isopentenil difosfato (IPP), geranyl difosfato (GPP), farnesil difosfato (FPP), geranyl geranyl difosfato (GGPP), farnesil difosfato sintasa (FPPS), geranyl geranyl difosfato sintasa (GGPPS), desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXPS), gliceraldehido 3-fosfato (GAP) (Lichtenthaler, 1999).

La existencia de una ruta alternativa fue primero demostrada en algas verdes y bacterias, posteriormente en plantas usando experimentos de suministro con $[^{13}\text{C}]$ glucosa marcada en el carbono 1 (Rohmer *et al.*, 1996; Schwender *et al.*, 1996; Lichtenthaler *et al.*, 1997) (Fig. 1.3). Se cultivaron algas verdes en medio enriquecido con $[^{13}\text{C}-1]$ glucosa y se analizó la incorporación del carbono marcado en el IPP sintetizado, el cual no presentó el incremento de $[^{13}\text{C}]$ en los carbonos 2, 4 y 5 de acuerdo al patrón esperado por la ruta del mevalonato. El IPP se marcó en los carbonos 1 y 5, y esto sugería una ruta diferente para la síntesis de IPP en las algas verdes. Experimentos subsiguientes en plantas superiores demostraron la existencia de esta ruta productora de IPP en ellas (Schwender *et al.*, 1997;

Arigoni *et al.*, 1997; Contin *et al.*, 1998). La ruta alternativa para la producción de IPP fue llamada en un inicio como ruta de Rohmer (por su descubridor), ruta del GAP/piruvato, ya que estos últimos son los compuestos precursores del IPP (Schwender *et al.*, 1996; Lichtenthaler, 1999) y posteriormente ruta del 2-C-metil-D-eritritol 4-P (MEP) por el intermediario directamente anterior a la formación de IPP y DMAPP (Takahashi *et al.*, 1998).

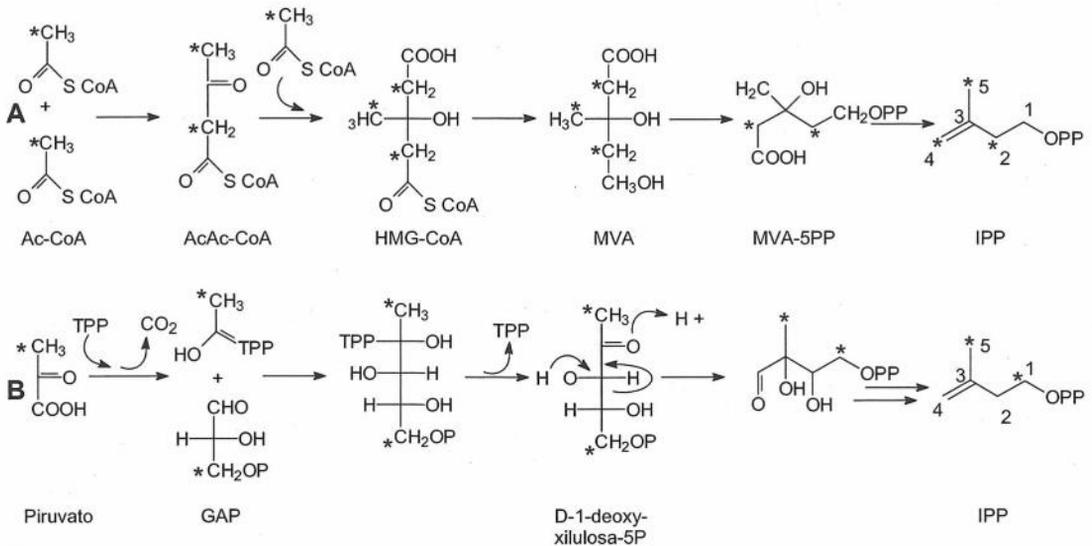


Figura 1. 3. Representación de ambas vías productoras de IPP, presentando los carbonos marcados, cuando se suministra [1-¹³C] glucosa. **A)** ruta del MVA, **B)** ruta del MEP. Los carbonos marcados se representan con asteriscos (Lichtenthaler *et al.*, 1997).

En las plantas la formación del IPP se localiza en diferentes compartimentos de la célula. La ruta que usa mevalonato se realiza en el citoplasma y la que utiliza GAP/piruvato en los plástidos (Lichtenthaler *et al.*, 1997).

La ruta que se lleva a cabo en el citoplasma, también llamada ruta del mevalonato (MVA) utiliza a este último compuesto como un precursor directo del IPP. La enzima que forma al MVA es la HMGR.

En contraste en los plástidos de las plantas, el IPP se forma por la condensación de gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y piruvato. La enzima encargada de realizar esta reacción es la desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXPS) (Rohmer *et al.*, 1996; Lichtenthaler, 1999). El producto de esta reacción es un intermediario temporal, la desoxi-D-xilulosa-5-fosfato, posteriormente esta molécula es reducida por la enzima desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (DXR) y el producto de esta reacción es fosforilado para formar el IPP (Fig. 1.3) (Schwender *et al.*, 1999; Lange y Croteau, 1999; Bouvier *et al.*, 1998).

Compartimentalización del IPP en las plantas superiores

La regulación de las dos rutas formadoras de IPP en una misma célula es un proceso poco claro. Sin embargo, en la actualidad se cree que los isoprenoides presentes en los plástidos son obtenidos principalmente por la ruta del MEP y del transporte de IPP desde la ruta del MVA en el citoplasma, esto en contraposición a la teoría que se tenía en un principio

(cuando se descubrió la ruta del MEP), que proponía que ambas rutas trabajan de manera separada sin que exista un intercambio de IPP desde el citoplasma al cloroplasto y viceversa (Heintze *et al.*, 1994; Hugueney *et al.*, 1996).

Como mencionamos anteriormente, existe una compartimentalización del IPP en diferentes partes de la célula vegetal (Fig. 1.2). Un ejemplo de la compartimentalización entre ambas rutas se presentó en los frutos de *Capsicum annuum* donde se observó que la expresión de mensajeros para las enzimas geranil geranil pirofosfato sintasa (GGPPS), fitoeno desaturasa (PDS), capsantina sintasa (CS) y fitoeno sintasa (PSY) se localizó en los plástidos, dicha expresión además está relacionada con la maduración del fruto y la acumulación de carotenos. Por otra parte, la expresión de mensajeros para las enzimas IPP isomerasa (IPI) y farnesil difosfato sintasa (FPPS) se localizó en el citoplasma y es constitutiva o se encuentra inducida por factores externos, como estrés o elicitores (Hugueney *et al.*, 1996). En *C. annuum* se demostró la presencia de la ruta del MEP en la maduración del fruto y la acumulación de mensajeros para la DXPS durante el desarrollo del fruto y acumulación de carotenos (Bouvier *et al.*, 1998).

En otro estudio usando tomate se observó que la inhibición de la HMGR empleando mevinolina un inhibidor específico, disminuye la producción de esteroides y modifica el desarrollo, pero no afecta la acumulación de carotenos en el fruto (Rodríguez-Concepción y Grisse, 1999). En *Arabidopsis thaliana*, las mutantes deficientes de la enzima DXPS (gen *CLA-1*) tienen alteraciones en sus cloroplastos y, en su producción de carotenos presentando un fenotipo albino, bajo condiciones especiales son capaces de crecer y desarrollarse, lo cual sugiere que la ruta del MEP se ve afectada, ya que los carotenoides se producen en los plástidos, no así la ruta del mevalonato que ayuda al crecimiento y desarrollo de la planta (Mandel *et al.*, 1996).

Las evidencias más directas acerca de la separación de ambas rutas productoras de IPP se presentan en *C. annuum* donde se realizaron inmunodetecciones con anticuerpos contra la DXPS y se encontró que esta enzima varía en los plástidos y no en el citosol (Bouvier *et al.*, 1998). Recientemente en *Lycopersicon esculentum* se demostró la localización de la DXPS en los cloroplastos mediante la fusión del péptido tránsito de la DXPS con la proteína verde fluorescente (Lois *et al.*, 2000)

Cooperación entre las dos rutas productoras de IPP en las plantas superiores

El intercambio entre IPP u otros prenol difosfatos, como geranil difosfato (GPP), farnesil difosfato (FPP) o geranil-geranil difosfato (GGPP) producidos por las dos rutas, permanece desconocido hasta el momento, algunas evidencias sugieren que existe intercambio. En experimentos empleando ¹³C-Glucosa en *Heteroscyphus* se observó que las primeras tres unidades isoprenicas del fitol son marcadas por la ruta del MVA, no así la última (Nabeta *et al.*, 1997). Schwarz en 1994, tomado de una revisión hecha por Lichtenthaler (1999), reportó el caso del diterpeno ginkgólido en *Ginkgo biloba*, donde el suministro exógeno de ¹³C-Glucosa resultó en la incorporación de tres unidades isoprenicas provenientes de la ruta del MVA y una unidad isoprenica proveniente de la ruta de MEP. La característica común en estos ejemplos anteriores es el transporte de tres unidades isoprenicas o de un FPP desde el citoplasma al cloroplasto. En *Catharanthus roseus* se observó que el alcaloide secologanina esta marcado principalmente por la ruta del MEP, sin embargo, se presentan algunos carbonos marcados que pudieran venir de la ruta del MVA. Los autores sugieren la incorporación al azar del acetil-CoA marcado producido por el metabolismo de la ¹³C-Glucosa, al alcaloide secologanina (Contin *et al.*, 1998). La exportación de IPP desde el

cloroplasto al citoplasma también puede existir, ya que los experimentos de incorporación de ^{13}C -MVA y $[1\text{-}^2\text{H}]$ desoxi-D-xilulosa-5-fosfato en algas demostraron que parte del $[1\text{-}^2\text{H}]$ de la desoxi-D-xilulosa-5-fosfato se incorporó en los esteroides citosólicos (Schwender *et al.*, 1997). En *C. roseus* también fue encontrada la incorporación de IPP producido por la ruta del MEP a fitoesteroides, sin embargo, la incorporación es 15 veces menos eficiente con respecto a isoprenoides plastídicos como carotenoides y fitol (Arigoni *et al.*, 1997). Las evidencias reportadas hasta el momento sugieren el intercambio del IPP producido por las dos rutas (MEP y MVA). Sin embargo, la cooperación y regulación entre las dos rutas productoras de IPP, necesita ser más investigado en el futuro.

3. Biosíntesis de carotenoides

Carotenoides

Los carotenoides son compuestos isoprenoides esenciales de las membranas fotosintéticas en todas las plantas. Estos compuestos principalmente asociados al complejo fotosintético ayudan a atrapar radicales libres formados durante el proceso de fotosíntesis y a disipar el exceso de energía (Britton, 1995; Norris *et al.*, 1995; Soffers *et al.*, 1999). En la actualidad son utilizados en la industria como colorantes y fuente de vitamina A (Misawa y Shimada, 1998).

Entre las fuentes naturales para la obtención de carotenoides se encuentran diferentes tipos de bacterias como *Erwinia spp.*, hongos como *Candida utilis* y algunas especies de plantas como *L. esculentum*, *Tagetes erecta* y *B. orellana* (Wendt y Schulz, 1998).

Los carotenoides se forman en los plástidos de las plantas y poseen un esqueleto de 40 carbonos, el cual se forma por la unión de dos moléculas de 20 carbonos de GGPP. La ruta se lleva a cabo con la dimerización de dos moléculas de IPP para formar al dimetil alil difosfato (DMAPP) el cual es el sustrato para la geranyl difosfato sintasa que forma al GPP, éste es el sustrato de la geranyl-geranyl difosfato sintasa para formar GGPP, que posteriormente forma al fitoeno, el primer compuesto carotenoide (Fig. 1.2) (Cunningham y Gantt, 1998).

Los carotenoides se sintetizan a partir del GGPP, el cual es precursor de otros isoprenoides de importancia, como las clorofilas, tocoferoles, quinonas y giberelinas (Fraser *et al.*, 1995).

Desaturaciones y ciclizaciones de los carotenoides

El fitoeno sufre una serie de reacciones de desaturación que resultan en la formación del fitoflueno y posteriormente el ζ -caroteno, neurosporeno y licopeno. Estas reacciones de desaturación sirven para formar los dobles enlaces carbono-carbono que constituyen la naturaleza cromófora de los pigmentos. Las cuatro reacciones secuenciales de desaturación del fitoeno son catalizadas en las plantas por dos enzimas, PDS y ζ -caroteno desaturasa (ZDS) (Bartley y Scolnik, 1995).

Los carotenoides en el aparato fotosintético de las plantas son compuestos bicíclicos principalmente con dos anillos β , la enzima licopeno β -ciclase (LCYB) cataliza esta reacción de ciclización. Algunos otros carotenoides cíclicos de plantas y algas poseen también un anillo ϵ característico, por ejemplo la luteína, la enzima que cataliza esta reacción es la licopeno ϵ -ciclase (LCYE) (Bartley y Scolnik, 1995; Cunningham y Gantt, 1998) (Fig. 1.4).

La ciclización del licopeno es un punto central de ramificación de los carotenoides, una ruta conduce a las β,β -xantofilas, zeaxantina, violaxantina y neoxantina, y la otra ruta conduce a las β,ϵ -xantofila y luteína. Las actividades relativas de la ϵ -ciclasa con respecto a la β -ciclasa pueden determinar el flujo de carotenoides desde el licopeno al α -caroteno o al β -caroteno. La regulación sobre los dos tipos de ciclizaciones del licopeno podrían por lo tanto controlar la composición de los carotenoides *in vivo*. Hay evidencia de que la ϵ -ciclización podría ser el proceso inicial en la biosíntesis del α -caroteno, y por lo tanto, este proceso podría ser regulado ya que su producto el δ -caroteno está destinado a formar el α -caroteno. El ADNc para la licopeno ϵ -ciclase ha sido clonado de *A. thaliana* y *L. esculentum* (Cunningham *et al.*, 1996; Ronen *et al.*, 1999) y el ADNc para la licopeno β -ciclase ha sido clonado de *L. esculentum* (Pecker *et al.*, 1996).

Apocarotenoides

Los apocarotenoides son compuestos derivados de la degradación oxidativa de los carotenoides. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y algunos poseen funciones importantes metabólicas y hormonales en diversos organismos. Los apocarotenoides se forman por rupturas al azar, producto de la fotooxidación o por la co-oxidación provocada por lipoxigenasas. La regulación de la síntesis de los apocarotenoides biológicamente importantes podría requerir de mecanismos más precisos para su síntesis, que incluyan rutas y enzimas específicas para su formación (Schwartz *et al.*, 1997).

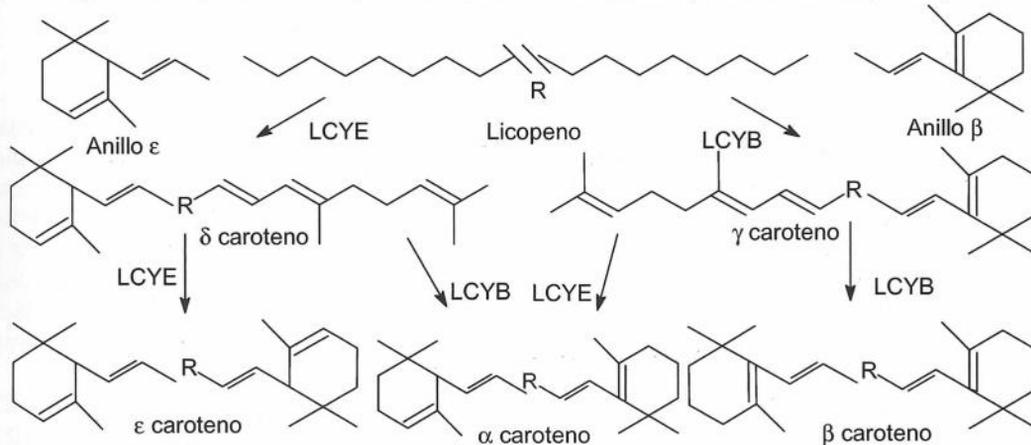


Figura 1.4 Ciclización del licopeno. El ϵ caroteno es producto del δ caroteno y presenta dos anillos ϵ , el β caroteno es producto del γ caroteno y presenta dos anillos β , el α caroteno esta formado con un anillo ϵ y β . LCYE: licopeno ϵ ciclasa, LCYB: licopeno β ciclase, R: cadena de carbono (Cunningham y Grant, 1998).

Existen algunos modelos propuestos para explicar la formación de algunos apocarotenoides, tal es el caso de la formación del β -ciclocitral (C_{10}) que se lleva a cabo en el alga *Microcystis* durante la formación de los derivados de la ciclohexanona (C_{13}) (Jüntner y Höflacher, 1985), otro ejemplo es la formación de las micorrizinas (C_{14}) en algunas plantas colonizadas por micorrizas (Walter *et al.*, 2000), otro modelo es la formación del ácido abscísico y los epoxi apo-aldehídos (C_{25}) en *Zea mays* (Cai-Tan *et al.*, 1997). Para el caso de la formación del ácido abscísico se clonó el gen de la enzima encargada de realizar

la ruptura inicial en el carotenoide de 40 carbonos, la VP14 (Cai-Tan *et al.*, 1997). Recientemente en *Drosophila melanogaster* fue clonado el gen β -diox que codifica para una enzima dioxigenasa que al expresarse en *E. coli*, forma al apocarotenoide retinol, precursor de la vitamina A, a partir del β -caroteno, al igual que la enzima VP14, el producto de este gen solo tiene efecto en el compuesto cíclico β -caroteno y no en carotenoides lineales, los autores proponen un modelo para la formación del retinol a partir de un carotenoide bicíclico (Von Lintig y Vogt, 2000).

En *B. orellana* se demostró la existencia de algunos apocarotenoides parecidos al licopeno como el metil 9'Z-apo-6'-licopenoato, el metil (9Z)-apo-8'-licopenato y el (all-E)-apo-8'-licopenoato (Mercadante *et al.*, 1996; 1997). La característica principal en estos apocarotenoides es que tienen más de 30 carbonos.

La gran acumulación de bixina en *B. orellana*, sugiere un control enzimático para su producción, más que una degradación oxidativa al azar. La formación de bixina a partir de carotenoides lineales es probable, sin embargo, no se conocen enzimas que corten carotenoides lineales, ni modelos para la formación de apocarotenoides a partir de estos, más aun, se cree que los carotenoides lineales desde el fitoeno participan en un canal metabólico, el cual termina en carotenoides cíclicos, tal como se describirá mas adelante. En contraste la presencia de apocarotenoides lineales de gran tamaño, así como la existencia de enzimas que corten carotenoides cíclicos en otras plantas y animales, sugiere una ruta metabólica para la formación de bixina que incluya al menos un paso con una enzima dioxigenasa, cuyo sustrato sea un carotenoide bicíclico o hemicíclico y al menos un paso subsecuente en el esqueleto lineal para la formación de bixina (Fig. 1.5).

Carotenoides en *B. orellana*

El pigmento más importante del extracto que produce *B. orellana* es la bixina, el cual fue el primer cis-carotenoide aislado de la naturaleza (Isler *et al.*, 1962) y ha sido encontrado únicamente en esta planta. La bixina es un pigmento rojo-naranja de 24 carbonos, perteneciente a la familia de los apocarotenoides, cuya formación se da a partir de carotenos de 40 carbonos y representa más del 80% de los carotenos totales de la planta y del 2 al 3% del peso total de la semilla (Fig. 1.5; compuesto 1) (Mercadante *et al.*, 1996). Entre las características de la bixina se encuentra su solubilidad, su facilidad para absorberse a los pH alcalinos de la mayoría de los alimentos y su capacidad de convertirse a una sal más estable, la norbixina (Freund, 1985).

La bixina es un colorante natural aceptado por la Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (FDA&C, de los Estados Unidos), por lo tanto se comercializa libremente en la Comunidad Económica Europea y en los Estados Unidos de América (Meggos, 1984).

La pasta comúnmente extraída de las semillas se comercializa como anato, sus componentes fueron separados por primera vez por McKeown y Mark (1962), usando cromatografía en papel y la cantidad de bixina fue medida por espectrofotometría. Poco después Dendy en 1966, reportó la separación de bixina por cromatografía de capa delgada (TLC) en placas de sílica gel. En años recientes se ha utilizado la separación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en extractos de anato (Rouseff, 1988) y en los alimentos coloreados con este pigmento (Lancaster y Lawrence, 1996).

Se sabe que en el extracto de anato además de pigmentos carotenoides, existen otros isoprenoides como el all-E-Geraniilgeraniol, la farnesilacetona, el geraniilgeraniol

Generalidades de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa

La enzima HMGR se caracteriza por su participación en la síntesis del mevalonato de forma irreversible a partir del 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG). La cinética de la enzima en la reacción involucra la incorporación del HMG-CoA, de dos moléculas de NADPH y su posterior oxidación a dos moléculas de NADP, HS-CoA y mevalonato (Bach, 1987).

En animales se ha generado una gran cantidad de información sobre la HMGR por su capacidad para regular la síntesis del colesterol (Goldstein y Brown, 1990). Se han realizado muchos trabajos con enfoque bioquímico para intentar elucidar la regulación de esta enzima en animales y se sabe que es regulada por la retroalimentación de sus productos finales los esteroides. La actividad del sitio catalítico es regulada por fosforilación con una cinasa dependiente de AMPc (Hampton *et al.*, 1996) y la degradación de la HMGR es regulada por su dominio N-terminal en el retículo endoplásmico (Ramulph *et al.*, 1994). En mamíferos se ha encontrado que esta enzima es producto de un sólo gen y su peso molecular varía entre 90 a 100 kDa (Gertier *et al.*, 1988). Se ha aislado el gen que codifica para esta enzima en algunos organismos como la rata, el hámster y el humano, entre otros (Chin *et al.*, 1994).

HMGR en plantas

En plantas existen múltiples isoformas de la HMGR las cuales son sintetizadas por una pequeña familia de genes (Chappell, 1995). La presencia de las diversas isoformas sugiere que cada una se regula diferencialmente y posea funciones específicas en diversos tejidos y procesos del desarrollo y del metabolismo en las plantas (Arévalo y Mitchel, 1984). En este sentido se realizaron diversos estudios para conocer la regulación de la expresión de mensajeros para los diversos genes *hmg* con respecto a ciertas funciones de la planta. En general, estas funciones pueden agruparse en cuatro grandes clases (Tabla 1.1).

Constitutivas: Se piensa que al menos un gen de cada familia génica del *hmg* está involucrado con el mantenimiento y desarrollo celular, principalmente por su función en la producción de esteroides, necesarios para la formación de membranas de las células recién producidas (Bach *et al.*, 1990).

Defensa: Se han reportado estudios que relacionan la expresión de genes del *hmg* con el daño mecánico, heridas, ataque de patógenos, infección por hongos o derivados del ácido araquidónico (Genschik *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 1992; Maldonado-Mendoza *et al.*, 1997; Joost *et al.*, 1995; Nelson *et al.*, 1994; Weissenborg *et al.*, 1995). El incremento de la expresión del *hmg* y la actividad enzimática de alguna de sus isoformas están asociados a la síntesis de sesquiterpenos y fitoalexinas involucrados en la defensa de las plantas (Burnett *et al.*, 1993).

Desarrollo específico: Se observa la expresión y actividad diferencial de algunas isoformas de la HMGR en diferentes tejidos u órganos de las plantas durante determinadas etapas de su desarrollo. Particularmente en zonas con intensa división celular ya que participa durante la producción de esteroides (Bach *et al.*, 1990). Por otra parte se han publicado trabajos donde se estudia la expresión del *hmg* o la actividad de la HMGR durante el desarrollo de la flor, el fruto y formación de semillas en diversas plantas (Arévalo y Mitchell, 1984; Loguercio *et al.*, 1999; Jain *et al.*, 2000).

Metabolitos de interés: Uno de los enfoques que más ha contribuido al estudio de esta enzima es su posible participación en la acumulación de diferentes metabolitos de interés para el hombre, por lo anterior se ha intentado relacionar su expresión con la acumulación

de alguno de estos metabolitos (Chye *et al.*, 1991; Maldonado-Mendoza *et al.*, 1997; Re *et al.*, 1995).

Se ha avanzado en el conocimiento sobre la forma en que se regulan algunos genes del *hmg* y se conoce que la regulación transcripcional es un mecanismo general para todos los *hmg* de plantas. Se ha demostrado que estos genes son influenciados por una gran variedad de estímulos ambientales y fisiológicos, tales como fitohormonas, luz, daños mecánicos, ataque de patógenos y factores proteicos endógenos (Bach *et al.*, 1990; Learned *et al.*, 1997). Se han identificado regiones regulatorias importantes para el *hmg2* de *A. thaliana*, *hmg3* de *Hevea brasiliensis*, *hmg2* de *Solanum tuberosum* y el *hmg1* de *L. esculentum* (Enjuntó *et al.*, 1995; Daraselia *et al.*, 1996; Chye *et al.*, 1992). Se ha realizado una descripción detallada de la región regulatoria del *hmg1* de *L. esculentum*, se determinó su tamaño con 180 pb, la localización de la caja TATA, una secuencia rica en pirimidinas que regula de forma positiva la expresión y una estructura secundaria en forma de horquilla alrededor del codón de inicio (ATG) que regula de forma positiva la expresión de este gen (Daraselia *et al.*, 1996).

Otro nivel de regulación de la HMGR estudiado en plantas, es su actividad enzimática la cual es modificada por proteínas cinasas, Ca^{2+} y lipooxigenasas en *S. tuberosum* (Choi y Bostock, 1994), por fosforilación en *A. thaliana* (Dale *et al.*, 1995) y se ha demostrado la existencia de una cinasa dependiente de AMPc que fosforila a la HMGR en *Hordeum vulgare* (Barker *et al.*, 1996).

Estructura de la HMGR de plantas

En la estructura primaria de la HMGR, se han definido cuatro regiones: la región N-terminal, el dominio membranal, la región de unión y el dominio catalítico. El dominio membranal y el catalítico son los más conservados entre todas las isoformas de la HMGR, mientras que los dominios N-terminal y la región de unión son los más divergentes. En *A. thaliana* y en *L. esculentum* se propuso un modelo hipotético para la estructura de la HMGR (Campos y Boronat, 1995; Denbow *et al.*, 1996), en este el dominio transmembranal contiene una región hidrofóbica de 120 aa y permanece unido a la membrana del retículo endoplásmico por dos giros transmembranales, lo que es una característica de todas las HMGR de plantas. El dominio catalítico consiste de aproximadamente 400 pb en el extremo carboxilo de la proteína. La región de unión presenta un sitio PEST, posiblemente involucrado en su regulación y se localiza entre el dominio transmembranal y la región catalítica. El dominio N-terminal y el dominio catalítico se localizan en el citosol.

Tabla 1.1. Genes y funciones de las isoformas de la HMGR en las plantas. Las funciones señaladas con suspensivos son probables. Los asteriscos denotan falta de información.

Planta	Copias Detectadas	Genes Clonados	Posibles funciones	Referencias
<i>Lycopersicon esculentum</i>	4	Hmg1 Hmg2	División celular, frutos inmaduros, "constitutiva". "Defensa" frutos maduros.	Jelesko <i>et al.</i> , 1999 Daraselia <i>et al.</i> , 1996 Narita y Gruissem, 1989 Rodríguez-Concepción y Gruissem, 1999 Park <i>et al.</i> , 1992
<i>Gossypium hirsutum</i>	7-9	Hmg1 Hmg2	"Constitutiva", "defensa", aumenta su expresión en pétalos y ovarios. Embriones en desarrollo, acumulación de gosypol.	Lougercio <i>et al.</i> , 1999 Joost <i>et al.</i> , 1995
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	Hmg1 Hmg2	"Constitutiva", se incrementa por luz Plántulas jóvenes, raíces, inflorescencias.	Caelles <i>et al.</i> , 1989 Learned y Fink, 1989 Enjundo <i>et al.</i> , 1994; 1995 Learned y Connolly, 1997
<i>Nicotiana sylvestris</i>	1 ó 2	Hmg1	Apices, anteras, raíz, "defensa".	Genschik <i>et al.</i> , 1992
<i>Triticum aestivum</i>	3-4	Hmg 10 Hmg18 Hmg 23	Únicamente en callos en crecimiento. Estimulado por luz y tejidos en crecimiento. Estimulado por luz, se presenta en todos los tejidos analizados, "constitutiva".	Aoyagi <i>et al.</i> , 1993
<i>Oryza sativa</i>	2	Hmg1	"Defensa".	Nelson <i>et al.</i> , 1994
<i>Solanum tuberosum</i>	12	Hmg1 Hmg1.1-1.7 Hmg2 Hmg2.2 Hmg3 Hmg3.3	"Constitutiva". La hmg1.2 es abundante en el polen. "Defensa". Flores, sepalos, ovarios. "Defensa". Pétalos maduros y anteras.	Yang <i>et al.</i> , 1991 Bhattacharyya <i>et al.</i> , 1995 Choi <i>et al.</i> , 1992 Korth <i>et al.</i> , 1997
<i>Hevea brasiliensis</i>	3	Hmg1 Hmg2 Hmg3	Lactíferos, hojas, posible acumulación de hule. * * * * Constitutiva.	Chye <i>et al.</i> , 1991 Chye <i>et al.</i> , 1992
<i>Camptotheca acuminata</i>	3	Hmg1 Hmg2 Hmg3	Semillas inmaduras, apices, "Defensa", frutos. "Constitutiva".	Burnett <i>et al.</i> , 1993 Maldonado-Mendoza <i>et al.</i> , 1997.
<i>Tagetes erecta</i>	2-5	Hmg1 Hmg2	* * * * * * * *	Del Villar Martínez y Paredes-López, 1999
<i>Catharanthus roseus</i>	1	Hmg1	"Constitutiva", no responde al Me-Ja.	Maldonado-Mendoza <i>et al.</i> , 1992 Maldonado-Mendoza <i>et al.</i> , 1994.
<i>Morus alba</i>	2-4	Hmg1	Flores, hojas juvenes	Jain <i>et al.</i> , 2000
<i>Lithospermum erythrorhizon.</i>	* * *	Hmg1	Acumulación de shikonina.	Lange <i>et al.</i> , 1998

Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa

Utilizando la información bioquímica obtenida acerca de la ruta alternativa, se realizó una búsqueda en el genoma de *Escherichia coli*, encontrándose una secuencia con las características esperadas del gen que podría codificar para una enzima capaz de catalizar la conversión de GAP y piruvato al intermediario de xilulosa fosfato propuesto (Sprenger *et al.*, 1997), posteriormente se clonó este gen de la bacteria y se demostró su actividad enzimática. Este gen recibió el nombre de *DXS* (Lois *et al.*, 1998) y la enzima fue llamada desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXPS).

La secuencia del gen *DXS* en *E. coli*, resultó tener una alta homología con el gen *CLA1* de *A. thaliana*, el cual fue previamente clonado y estaba involucrado en el desarrollo de los plástidos alterando la producción de carotenos y proporcionando un fenotipo albino (Mandel *et al.*, 1996). El *DXS* ha sido clonado en otras plantas como *C. annuum* (Bouvier *et al.*, 1998), *Oryza sativa* (Campos *et al.*, 1997), *Mentha piperita* (Lange *et al.*, 1998) y *L. esculentum* (Lois *et al.*, 2000). La enzima DXPS es codificada por un solo gene y su peso molecular en *E. coli* es de 70 kDa con una secuencia de nucleótidos de 2.1 kb y en *A. thaliana* es de 77 kDa con una secuencia de nucleótidos de 2.3 kb (Mandel *et al.*, 1996).

En *M. piperita* y *A. thaliana* se demostró la actividad enzimática de los genes *DXS* y *CLA1* respectivamente usando sus proteínas recombinantes en un sistema *in vitro* de *E. coli*, en ambos casos se demostró con éxito la síntesis de desoxi-D-xilulosa a partir de GAP y piruvato (Lange *et al.*, 1998; Estévez *et al.*, 2000).

Se generaron anticuerpos contra la proteína recombinante de la DXPS de *C. annuum* y se observó su inmunodetección en cloroplastos y cromoplastos del fruto, no así en la mitocondria (Bouvier *et al.*, 1998). En tomate se fusionó una secuencia que probablemente es el péptido transito de la DXPS con la proteína verde fluorescente y se observó su localización dentro de los plástidos de las hojas (Lois *et al.*, 2000).

Utilizando la estrategia de marcaje con glucosa ^{13}C se observó que los diterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, cadenas de fitol y carotenos, son producidos por la ruta del MEP en algunas plantas tales como, *C. roseus*, *L. esculentum*, *Nicotiana tabacum*, *Taxus chinensis*, *M. piperita*, *H. vulgare*, *Ginkgo biloba*, *Salvia officinalis* y *Thymus vulgaris* (Lichtenthaler, 1999).

La importancia de la DXPS y la ruta bioquímica en que participa para la formación de carotenoides se demostró en *A. thaliana* donde las plantas defectuosas para el gen *CLA1* producen muy pequeñas cantidades de carotenoides. Posteriormente, en *L. esculentum* utilizando experimentos de marcaje con glucosa ^{13}C se demostró que el licopeno es producido exclusivamente por la ruta del MEP (Schwender y Lichtenthaler, 1998) y los mensajeros para la DXPS están asociados a la producción del licopeno (Lois *et al.*, 2000). La sobreexpresión del *DXS* en bacterias productoras de pigmentos resultó también en un incremento de la producción de licopeno (Harker y Bramley, 1999).

Fitoeno sintasa

La enzima fitoeno sintasa cataliza la conversión de dos moléculas de GGPP (C_{20}) a fitoeno (C_{40}), el cual es considerado el primer caroteno. La PSY se encuentra localizada en los plástidos de las plantas y se sabe que generalmente está unida a la membrana del tilacoide (Hugueney *et al.*, 1996). Se propone un modelo multienzimático para la localización de la PSY con respecto a otras enzimas involucradas en la formación de los carotenos

dentro de los plástidos (Fig. 1.6) (Cunningham y Gantt, 1998). La PSY actúa primero de forma coordinada con enzimas en la ruta de los isoprenoides tales como la GGPS y la IPI en el estroma de los cloroplastos. Posteriormente la PSY se une a la membrana del tilacoide para que se activen las enzimas PDS LCYE y la LCYB involucradas en la formación de los carotenos (Bonk *et al.*, 1997).

La expresión de mensajeros para la PSY es regulada durante la formación de frutos y acumulación de carotenoides en *L. esculentum* y en *C. annuum* (Ray *et al.*, 1992; Römer *et al.*, 1993). En *L. esculentum* se han realizado diversos estudios para conocer más acerca de la regulación de esta enzima. De esta forma se conoce que el gen pTOM5 (*psy1*) solo se expresa en las etapas finales de maduración. Sin embargo, la actividad enzimática de la PSY se mantiene muy alta a través de todo el desarrollo del fruto (Ray *et al.*, 1992). Los experimentos de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales contra la PSY1 durante la formación del fruto mostraron dos proteínas con diferente peso molecular (42 y 38 kDa) y las inmunodetecciones realizadas con anticuerpos monoclonales de la PSY2 mostraron la presencia de una sola proteína de 38 kDa en las etapas iniciales de maduración del fruto (Fraser *et al.*, 1994). La sobreexpresión del *psy1* en antisentido ocasionó una disminución en la producción de licopeno y una acumulación de giberelinas (Fraser *et al.*, 1995) y la sobreexpresión constitutiva del *psy* conduce a la disminución de giberelinas y ocasiona anomalías en el crecimiento de la planta (Fray *et al.*, 1995).

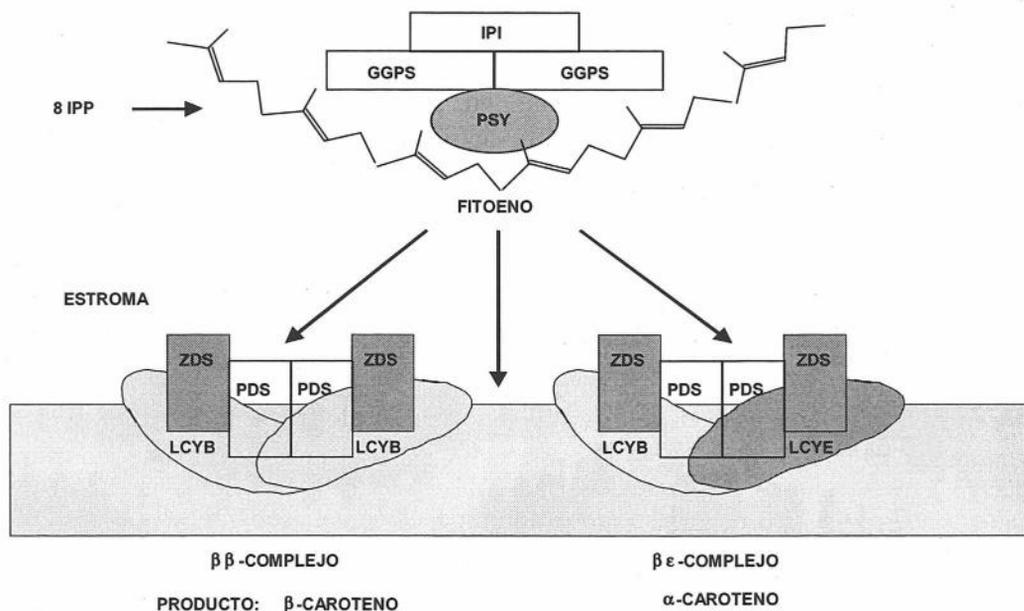


Figura 1.6. Complejo multienzimático propuesto para la formación de carotenoides. Este complejo se presenta en la membrana del tilacoide y estroma de las plantas. GGPS, geranilgeranil pirofosfato sintasa; IPI, isopentenil pirofosfato isomerasa; LCYB, licopeno β-ciclasa; LCYE, licopeno ε-ciclasa; PDS, fitoeno desaturasa; PSY, fitoeno sintasa; ZDS, δ-caroteno desaturasa (Cunningham y Gantt, 1998).

Se han clonado los ADNc que codifican para esta enzima de diferentes bacterias como *Erwinia spp.* y *Agrobacterium aurantiacum* (Misawa y Shimada, 1998) y en plantas como *A. thaliana* (Scolnik y Bartley, 1994), *L. esculentum*, donde se han clonado dos (Ray *et al.*, 1992; Bartley y Scolnik, 1993), en *Z. mays* (Buckner *et al.*, 1996), *Cucumis melo* (Karvouni *et al.*, 1995; Aggelis *et al.*, 1997), en *Narcissus pseudonarcissus* (Scludz *et al.*, 1996) y en *C. annuum* (Römer *et al.*, 1993). El tamaño de la secuencia de nucleótidos para la PSY en plantas es de aproximadamente 2 kb (Römer *et al.*, 1993).

HIPÓTESIS

Las hipótesis planteadas para este trabajo son:

1. Si la expresión de los mensajeros para la PSY es regulada durante la síntesis de carotenoides, entonces su expresión debe estar relacionada con la acumulación de carotenos durante el desarrollo de la flor, el fruto y en los cultivos *in vitro* productores de estos metabolitos. De esta forma la expresión de los mensajeros para la PSY puede funcionar como un indicador de la expresión de otros genes relacionados con la producción de carotenoides.

2. Si la ruta del MEP está involucrada con la producción de carotenoides en los plástidos de las plantas, entonces el gen *DXS* debe presentar una expresión asociada con la acumulación de carotenoides similar al caso del *psy* en los tejidos analizados.

3. Si la expresión del gen *hmg* no está involucrada con la producción de carotenoides, sino con procesos del desarrollo de la flor y el fruto, entonces debe presentar un comportamiento diferencial durante estos estadios del desarrollo, así mismo esta expresión no necesariamente debe estar ligada a la acumulación de carotenoides en *B. orellana*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la expresión de los mensajeros que codifican para las enzimas HMGR, la PSY y la DXPS durante el desarrollo del fruto y la acumulación de carotenos en *B. orellana*.

Objetivos particulares

1. Establecer protocolos para la obtención de ADN y ARN total en *B. orellana*.
2. Cuantificar la cantidad de carotenoides totales y bixina durante el desarrollo de la flor y el fruto y en los diferentes cultivos *in vitro* obtenidos de *B. orellana*.
3. Obtener secuencias parciales de los genes *DXS*, *hmg* y *psy*.
4. Realizar un análisis de la expresión de los mensajeros para las enzimas DXPS, HMGR y PSY en los diferentes tejidos seleccionados de la flor y el fruto en desarrollo.

BIBLIOGRAFIA

- Arce J** (1999) El achiote *Bixa orellana* L. Cultivo promisorio para el trópico. 1st Ed. Earth, Costa Rica p:50.
- Aggelis A, John I, Karvouni Z, Grieson D** (1997) Characterization of two cDNA clones for mRNA. expressed during ripening of melon (*Cucumis melo* L.) fruits. *Plant Mol. Biol.* 33:313-322.
- Aoyagi K, Anne B, Moon K, Fang L, Ulrich T** (1993) Isolation and characterization of cDNA encoding wheat 3-hydroxy-3-methylglutaryl~CoA reductasa. *Plant Physiol.* 102:623-628.
- Arébalo R, Mitchell D** (1984) Cellular distribution of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductasa and mevalonate kinase in leaves of *Nepeta cataria*. *Phytochemistry* 23:13-18.
- Arigoni D, Sagner S, Latzel C, Eisenreich W, Bacher A** (1997) Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:10600-10605.
- Bach T** (1987) Synthesis and metabolism of mevalonic acid in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 25:163-178.
- Bach T, Weber T, Motel A** (1990) Some properties of enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in plants. In *Recent Advances in Phytochemistry*, (GHN Towers, HA Stafford, eds.) New York: Plenum Press. 24:1-82.
- Barker J, Slocombe S, Ball K, Hardie G, Shewry P, Halford N** (1996) Evidence that barley 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase kinase is a member of the sucrose nofermenting-1-related protein kinase family. *Plant Physiol.* 112:1141-1149.
- Bartley GE, Scolnik PA** (1995) Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction and human health. *Plant Cell* 7:1027-1038.
- Bartley GE, Scolnik PA** (1993) cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of PSY2, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *J Biol. Chem.* 268:25718-21.
- Bhattacharyya M, Paiva N, Dixon R, Korth K, Stermer B** (1995) Features of the *hmg* 1 subfamily of genes encoding HMG-CoA reductase in potato. *Plant Mol. Biol.* 28:1-15
- Bonk M, Hoffman B, Von Linting J, Schledz M, Al-Babili S, Hobeika E, Kleining H, Beyer P** (1997) Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes *in vitro* reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. *Eur. J. Biochem.* 247:942-950.
- Bouvier F, D'Harlingue A, Suire C, Backaus R, Camara B** (1998) Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoids biogenesis in Pepper fruits. *Plant Physiol.* 117:1423-1431.
- Britton G** (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9:1551-1558.
- Buckner B, San Miguel P, Janick-Buckner J, Bennetzen J** (1996) The *yi* gene of maize codes for phytoene synthase. *Genetics* 143:479-488.

- Burnett R, Maldonado-Mendoza I, McKnight T, Nessler C** (1993) Expression of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene of *Camptotheca acuminata* is differentially regulated by wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 103:41-48.
- Caelles C, Ferrer A, Balcells L, Hegardt FG, Boronat A** (1989) Isolation and structural characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Mol Biol.* 13:627-38
- Cai-Tan B, Schwartz S, Zeevaart JA, McCarty RD** (1997) Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:12235-12240.
- Campos N, Boronat A** (1995) Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase. *Plant Cell* 7:2163-2174.
- Campos N, Lois LM, Boronat A** (1997) Nucleotide sequence of a rice cDNA encoding a transketolase-like protein homologous to the *Arabidopsis* CLA1 gene product (Accession No. AF024512). *Plant Physiol.* 115:1289-1293.
- Chappell J** (1995) Biochemistry and molecular biology of the isoprenoids biosynthetic pathway in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:521-547.
- Chin D, Gil D, Rusell L, Liscum K, Luskey S, Baso H, Okayama P, Berg J, Goldstein M, Brown M** (1994) Nucleotide sequence of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coA reductase a glucoprotein reticulum endoplasmic. *Nature* 308:613-617.
- Choi D, Ward BL, Bostock RM** (1992) Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* 4:1333-1344.
- Choi D, Bostock R** (1994) Involvement of de novo protein synthesis, protein kinase, extracellular Ca²⁺, and lipoxigenase in arachidonic acid induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase genes and isoprenoid accumulation in potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Physiol.* 104:1237-1244.
- Chye M, Chio-Tee T, Nam-Hai C** (1992) Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in *Hevea brasiliensis*: *hmg1* and *hmg3* are differentially expressed. *Plant Mol. Biol.* 19:473-484.
- Chye M, Kush A, Tan CT, Chua NH** (1991) Characterization of cDNA and genomic clones encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol. Biol.* 16:567-77.
- Contin A, Van Der Heiden R, Lefeber A, Verporte R** (1998) The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/piruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS Lett.* 434:413-416.
- Cunningham FX, Gantt E** (1998) Genes and enzymes of carotenoids biosynthesis in plants. *Annu Rev. Plant Physiol.* pp:557-577.
- Cunningham FX, Pogson B, Sun ZR, McDonald KA, Dellapenna D, Gantt E** (1996) Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8:1613-1626.
- Dale S, Arro M, Becerra B, Morrice A, Boronat A, Hardie G, Ferrer A** (1995) Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase

(isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by *Brassica oleracea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. J. Biochem. 233:500-506.

- Daraselia N, Tarchevskaya S, Narita J** (1996) The promotor for tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene 2 has unusual regulatory elements that direct high-level expression. Plant Physiol. 112:727-733.
- Del Villar-Martínez A, Paredes-López O** (1999) Molecular characterization of cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase in Marigold. J. Plant Physiol. 155:205-211.
- Denbow CJ, Lang S, Cramer CL** (1996) The N-terminal domain of tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductases. J. Biol. Chem. 271:9710-9715.
- Dendy D** (1966) The assay of annatto preparations by thin-layer chromatography. J. Sci. Food Agric. 17:75-76.
- Enjuto M, Lumbreras V, Marin C, Boronat A** (1995) Expression of the *Arabidopsis hmg2* gene, encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, is restricted to meristematic and floral tissues. Plant Cell 7:517-527.
- Enjuto M, Balcells L, Campos N, Caelles C, Arró M, Boronat A** (1994) *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:927-31.
- Estévez JM, Cantero A, Romero C, Kawaide H, Jiménez LF, Kuzuyuma T, Seto H, Kamiya Y, León P** (2000) Analysis of the expression of *CLA1*, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 124:95-103.
- Fraser P, Hedden P, Cooke D, Bird C, Schuch W, Bramley P** (1995) The effect of reduced activity of phytoene synthase on isoprenoid levels in tomato pericarp during fruit development and ripening. Planta 196:321-326.
- Fraser P, Truesdale M, Bird C, Schuch W, Bramley P** (1994) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. Plant Physiol. 105:405-413.
- Fray RG, Wallace A, Frase P, Valero D, Hedden P, Bramley P, Grierson D** (1995) Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. Plant J. 8:693-701.
- Freund P** (1985) Natural colors in cereal-based products. Cereal Foods World 30: 271-273.
- Genschik P, Criqui M, Parmentier Y, Marbach J, Dürr A, Fleck J, Jamet E** (1992) Isolation and characterization of a cDNA encoding a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from *Nicotiana glauca*. Plant Mol. Biol. 20: 337-341.
- Gertier F, Chiu C, Richtermann L, Chin J** (1988) Development and metabolic regulation of the *Drosophila melanogaster* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase. Mol. Cell Biol. 8:2713-2721.
- Goldstein J, Brow M** (1990) Regulation of the mevalonate pathway. Nature 343: 425-428.

- Hampton R, Dimster-Denk D, Riine J** (1996) The biology of HMG-CoA reductase; The pros of contra-regulation. *Trends Biochem. Sci.* 21: 140-146.
- Harker M, Bramley PM** (1999) Expression of prokaryotic 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatase in *Escherichia coli* increases carotenoid and ubiquinone biosynthesis. *FEBS Lett.* 448:115-119.
- Heintze A, Grolach J, Leuschner C, Hoppe P, Hagelstein P, Schulze-Siebert D, Schultz G** (1994) Plastidic isoprenoid synthesis during chloroplast development. Change from metabolic autonomy to a division-of-labor stage. *Plant Physiol.* 93:1121-1127.
- Huguene P, Bouvier F, Badillo A, Quennemet J, D'Harlingue A, Camara B** (1996) Development and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits. *Plant Physiol.* 11:619-626.
- Isler O, Rugg R, Schudel P** (1962) Recent progress in the chemistry of natural and synthetic coloring matter and related fields (T Gore, S Sounthakar, B Tilak eds.) Academic Press, New York pp:39.
- Jain AK, Vicent RM, Nessler CL** (2000) Molecular characterization of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene from mulberry (*Morus alba* L.). *Plant Mol. Biol.* 42:559-569.
- Jelesko JG, Jenkins SM, Rodriguez-Concepción M, Grisse W** (1999) Regulation of tomato HMG1 during cell proliferation and growth. *Planta* 208:310-318.
- Jondiko I, Pattenden G** (1989) Terpenoids and apocarotenoid from seeds of *Bixa orellana*. *Phytochemistry* 28:3159-3162.
- Joost O, Bianchini G, Bell AA, Benedict CR, Magill CW** (1995) Differential induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in two cotton species following inoculation with *Verticillium*. *Mol Plant Microbe Interact.* 8:880-885.
- Juárez R, Morales R, Chacón E** (1998) Estudio preliminar del cultivo del Achiote (*Bixa orellana* L.) en Tabasco. XI. Reunión Científica Tecnológica Forestal y Agropecuaria. Tabasco 98. pp:159-163.
- Jüntner F, Höflacher B** (1985) Formation of cyclohexanone products in extracts obtained from *Microcystis* alga. *Arch. Microbiol.* 14:337-340.
- Karvouni Z, John I, Taylor JE, Watson CF, Turner AJ, Grierson D** (1995) Isolation and characterization of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase. *Plant Mol Biol.* 27:1153-62.
- Korth K, Stermer B, Bhattacharyya M, Dixon R** (1997) HMG-CoA reductase gene families that differentially accumulate transcripts in potato tubers are developmentally expressed in floral tissues. *Plant Mol. Biol.* 33: 545-551.
- Lancaster F, Lawrence J** (1996) High performance liquid chromatographic separation of carminic acid and bixin, and norbixin, and the determination of carminic acid in foods. *J. Chrom. A* 732:394-398.
- Lange B, Croteau R** (1999) Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: Cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Arch. Biochem. Biophys.* 365:170-174.

- Lange B, Severin K, Bechthold A, Heide L** (1989) Regulatory role of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase for shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Planta* 204:234-41.
- Lange B, Wilding M, McCaskill D, Croteau R** (1998) A family of transketolases that directs isoprenoids biosynthesis via a mevalonate-independent pathways. *Proc. Natl. Acad. USA.* 95: 2100-2104.
- Learned M, Coonolly E** (1997) Light modulates the spatial patterns of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Co A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 11:499-511.
- Learned M, Fink G** (1989) 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase from *Arabidopsis thaliana* is structurally distinct from the yeast and animal enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:2779-2783.
- Lichtenthaler H** (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:47-65.
- Lichtenthaler H, Scwender J, Disch A, Rohmer M** (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplast proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* 400:271-274.
- Lintig JV, Vogt K** (2000) Filling the gap in vitamin A research. *J. Biol. Chem.* 275:11915-11920.
- Loguercio L, Scott H, Trolinder N, Wilkins T** (1999) HMG-CoA reductase gene family in cotton (*Gossypium hirsutum* L.): unique structural features and differential expression of *hmg2* potentially associated with synthesis of specific isoprenoids in developing embryos. *Plant Cell Physiol.* 4:750-761.
- Lois LM, Campos N, Putra S, Danielsen K, Rohmer M, Boronat A** (1998) Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamine, and pyridoxal biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:2105-2110.
- Lois LM, Rodriguez-Concepción M, Gallego F, Campos N, Boronat A** (2000) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J.* 22:503-513.
- Maldonado-Mendoza I, Vicent R, Nessler C** (1997) Molecular characterization of three differentially expressed members of the *Camptotheca acuminata* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR) gene family. *Plant Mol. Biol.* 34:781-790.
- Maldonado-Mendoza I, Burnet RJ, Lopez-Meyer M, Nessler CL** (1994) Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by wounding and methyl jasmonate. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38:351-356.
- Maldonado-Mendoza I, Burnet R, Nessler C** (1992) Nucleotide sequence of a cDNA encoding a 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase from *Camptotheca acuminata*. *Plant Physiol.* 100:1613-1614.
- Mandel A, Feldman K, Herrera-Estrella L, Rocha-Sosa M, León P** (1996) *CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.* 9: 649-658.

- Márquez W, Del Amo S** (1982) El Achiote. Comunicado No. II. Sobre recursos bióticos de plantas. Instituto Nacional sobre Investigación sobre Recursos Bióticos de Plantas. México p. 45.
- McKeown G, Mark E** (1962) Paper chromatography of bixin and related compounds. J. Assoc. Offic. Agr. Chemists. 45:761-766.
- Meggos H** (1984) Colors-key food ingredients. Food Technology 1:70-74.
- Mercadante A, Steck A, Pfander H** (1997) Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. J. Agric. Food Chem. 45:1000-1004.
- Mercadante A, Steck A, Rodriguez-Amaya D, Pfander H, Britton G** (1996) Isolation of methyl 9'-apo-6'-lycopenoate from *Bixa orellana*. Phytochemistry 41:1201-1203.
- Misawa N, Shimada N** (1998) Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeast. J. Biotech. 59:169-181.
- Nabeta K, Kawae T, Saitoh T, Kikuchi T** (1997) Synthesis of chlorophyll a and β -carotene from ^2H and ^{13}C -labeled mevalonates and ^{13}C -labeled glycine in cultured cell of liverworts *Heteroscyphus planus* and *Lophocolea heterophylla*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1:261-267.
- Narita J, Gruissem W** (1989) Tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening. Plant Cell 1:181-190.
- Nelson A, Doerner P, Zhu Q, Lamb C** (1994) Isolation of a monocot 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene that is elicitor inducible. Plant Mol. Biol. 25: 401-412.
- Norris S, Barrette T, Dellapena D** (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. Plant Cell 7: 2139-2149.
- Ogura K, Koyama T** (1998) Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. Chemical Reviews 98:1265-1276.
- Park H, Denbow C, Cramer C** (1992) Structure and nucleotide sequence of tomato *hmg2* encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase. Plant Mol. Biol. 20:327-331.
- Pecker I, Gabbay R, Cunningham FX, Hirschberg J** (1996) Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. Plant Mol. Biol. 30:807-819.
- Ramulph Y, Hampton D, Riine J** (1994) Regulated degradation of HMG-CoA reductase an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum, in yeast. J. Cell Biol. 125: 299-312.
- Ray J, Moreau P, Bird A, Grierson D, Maunder M, Truesdale M, Bramley P, Schuch W** (1992) Cloning and characterization of genes involved in phytoene synthesis from tomato. Plant Mol. Biol. 19:401-404.
- Re E, Jones D, Learned R** (1995) Co-expression of native and introduced genes reveals cryptic regulation of HMG CoA reductase expression in *Arabidopsis*. Plant J. 7:771-784.

- Rodríguez-Concepción M, Gruissem W** (1999) Arachidonic acid alters tomato HMG expression and fruit growth and induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent lycopene accumulation. *Plant Physiol.* 119:41-48.
- Rohmer M** (1999) A mevalonate independent route to isopentenyl diphosphate. In: Comparative natural products chemistry. (D Cant, ed.) Pergamon. Chap. 2. pp:45-68.
- Rohmer M, Seemann M, Horbach S, Bringer-Meyer S, Sahn H** (1996) A novel route for synthesis of isoprenoids in the green algae *Scenedesmus obliquus*. *J. Am. Chem. Soc.* 118:2564-2566.
- Römer S, Huguenev P, Bouvier F, Camara B, Kuntz M** (1993) Expression of the genes encoding the early carotenoids biosynthetic enzymes in *Capsicum annum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 196: 1414-1421.
- Ronen G, Cohen M, Zamir D, Hirschberg J** (1999) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *Plant J.* 17: 341-351.
- Rouseff R** (1988) High performance liquid chromatographic separation and spectral characterization of the pigments in turmeric and annatto. *J. Food Sci.* 53:1823-1826.
- Schledz M, al-Babili S, von Lintig J, Haubruck H, Rabbani S, Kleinig H, Beyer P.** (1996) Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering. *Plant J.* 10:781-92.
- Schwartz SH, Cai Tan B, Cage DA, Zeevaart JA, McCarty R** (1997) Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276:1872-1874.
- Schwender J, Lichtenthaler H** (1998) Biosynthesis of lycopene in tomato fruits via the non-mevalonate isoprenoid pathway. In *Advances in Plant Lipid Research* (J. Sánchez, E. Cerda-Olmedo, eds.) Universidad de Sevilla. España pp:462-464.
- Schwender J, Muller C, Zeidler J, Lichtenthaler H** (1999) Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-D-deoxyxylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 455:140-144.
- Schwender J, Zeidler J, Gröner R, Müller C, Focke M, Braun S, Lichtenthaler F, Lichtenthaler H** (1997) Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. *FEBS Lett.* 414:129-134.
- Schwender J, Seemann M, Hartmut M, Lichtenthaler K, Rohmer M** (1996) Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem. J.* 316:73-80.
- Scolnik P, Bartley G** (1994) Nucleotide sequence of an *Arabidopsis* cDNA for phytoene synthase. *Plant Physiol.* 104:1471-1472.
- Soffers A, Van Haandel M, Boersma M, Tyrakowska B, Laane C, Rietjens I** (1999) Antioxidant activities of carotenoids: quantitative relationship between theoretical calculations and experimental literature. *Free Radic. Res.* 30:233-40.
- Sprenger G, Schorken U, Wiegert T, Grolle S, Graff A, Taylor S, Begley T, Bringer-Meyer S, Sahn H** (1997) Identification of a thiamin-dependent synthase in

Escherichia coli required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. Proc. Natl. Acad. USA. 94:12857-12862.

Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, Seto H (1998) A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:9879-9884.

Tirimanna ASL (1981) Study of the carotenoid pigments of *Bixa orellana* L. seeds by thin layer chromatography. Microchim. Acta 2:11-16.

Walter M, Fester T, Strack D (2000) Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the yellow pigment and other apocarotenoids. Plant J. 21:571-576.

Wedt K, Schulz G (1998) Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes. Estructure 6:127-133.

Weissenborn DL, Denbow CJ, Laine M, Lang SS, Yang Z, Yu X, Cramer CL (1995) HMG-CoA reductase and terpenoid phytoalexins: Molecular specialization within a complex pathway, Physiol. Plant. 93:393-400

Yang Z, Park H, Lacy GH, Cramer CL (1991) Differential activation of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes by wounding and pathogen challenge. Plant Cell 3:397-405.

CAPÍTULO 2

MÉTODOS

1. Obtención del material vegetal

Planta adulta

Los tejidos de la planta adulta se clasificaron de acuerdo a su etapa de desarrollo. La clasificación se realizó como sigue: botón floral, flor, fruto inmaduro, fruto maduro, semilla inmadura (obtenida del fruto inmaduro) y semilla madura (obtenida del fruto maduro) (Figura 1.1). Los tejidos fueron colectados durante los meses de octubre y noviembre, en el unidad Temozon Yucatán del Centro de Investigaciones Regionales de Chapingo. Inmediatamente después de la cosecha, los tejidos se colocaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C para su análisis posterior.

Obtención de las plántulas

Para la obtención de las plántulas, se cosecharon semillas durante los meses de enero de la variedad india de *Bixa orellana*. Se conservaron en la oscuridad y a baja humedad relativa a fin de garantizar su potencial germinativo. Las plántulas se obtuvieron mediante la germinación de las semillas asépticas y escarificadas con HCl al 4%, en medio sólido MS (Murashige y Skoog, 1962). Para la desinfección y escarificación de las semillas, se efectuó un lavado con etanol al 70% por 15 min, se enjuagaron con agua destilada estéril por 3 min y posteriormente se trataron con una solución de cloro comercial al 6% (v/v) (Cloralex ©) por 15 min. Se realizaron de tres a cuatro lavados más con agua estéril para eliminar el exceso de cloro. Después de la asepsia, se realizó una incisión en la testa para facilitar la germinación, posteriormente se colocaron las semillas en una solución de cloro por un periodo de 7 min, a continuación se efectuaron tres lavados con agua estéril. Una vez desinfectadas, las semillas, se colocaron en agua destilada estéril durante 72 horas, para posteriormente sembrarlas en cajas Magenta con medio MS sólido.

Obtención de los callos

Para la inducción de callos se utilizaron como explantes segmentos de hojas y de tallos procedentes de las plántulas germinadas *in vitro*. En todos los casos se empleó como medio basal el medio PC (Phillips y Collins, 1979). Los explantes de hojas y cotiledones fueron cultivados en el medio de cultivo PC suplementado con 0.54 μM de ácido naftalenacético (ANA) y 8.88 μM de bencil amino purina (BAP), mientras que los segmentos de tallo se cultivaron en medio PC (2.68 μM de ANA y 4.44 μM de BAP) (Herrera, 1998). Los explantes provenientes de frutos inmaduros se colocaron en el mismo medio, con un balance ANA/BAP de 13.43/11.09 μM (Castillo, 1998).

Una vez formados los callos, su mantenimiento se realizó en medios de cultivo con ANA/BAP a razón de 0.54/8.88, 2.68/4.44 y 8.05 μM /11.09 μM , para hojas, tallos y frutos inmaduros, respectivamente (Herrera, 1998). Las resiembras se realizaron cada 30 días.

2. Aislamiento de ADN genómico

Se aisló ADN genómico para realizar la amplificación por PCR a partir de plántulas de *B. orellana* mediante la modificación de la técnica propuesta por Doyle y Doyle (1990). La técnica se describe a continuación: Un gramo de tejido se pulverizó en nitrógeno líquido. El macerado se resuspendió en 8 mL de solución de extracción (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM) y se incubó a 65 °C por 30 minutos. Posteriormente, se realizó una partición con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (F:Cl:Al) (25:24:1), la suspensión se centrifugó a 8000 rpm, durante 10 minutos en una centrifuga marca Beckman J2-21. El sobrenadante se colocó en otro tubo y se repitió la partición con F:Cl:Al en las mismas condiciones.

Posteriormente, se recuperó el sobrenadante en otro tubo y se precipitaron los ácidos nucleicos con un volumen de alcohol isopropílico durante 30 minutos a -20 °C. Los ácidos nucleicos se recuperaron al centrifugar a 12,000 rpm a 4 °C durante 30 minutos. Los ácidos nucleicos se lavaron con una solución de etanol al 76 % y acetato de amonio 10 mM, y se recuperaron al centrifugar a 12,000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. El ADN se resuspendió en 500 µL de agua y se le agregó 3 µL de ARNasa A (10 µg/mL), esta solución se incubó durante 30 minutos a 37 °C, para eliminar el ARN presente. Se extrajo la ARNasa con un volumen de F:Cl:Al, la solución se centrifugó a 8000 rpm a 4 °C durante 5 minutos en una centrifuga marca Eppendorf modelo 5417 R. El sobrenadante se transfirió a otro tubo donde el ADN se precipitó con 2 volúmenes de isopropanol y 50 µL de acetato de sodio 3M pH 7 a 4 °C durante 30 minutos. La pastilla se recuperó al centrifugar a 12, 000 rpm, a 4 °C y se resuspendió en 500 µL de etanol al 20 %.

Posteriormente, se lavó con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1), el sobrenadante se pasó a otro tubo y se precipitó el ADN con 2 volúmenes de etanol absoluto y 50 µL de acetato de sodio 3M pH 7. El ADN se recuperó al centrifugar a 12, 000 rpm a 4 °C durante 30 minutos. Finalmente, el ADN se resuspendió en 40 µL de agua estéril y se realizó la cuantificación del ADN por su absorbancia a 260 nm como propone Hoelzel, (1992) y por usar un VersaFluor Multiple-Wavelength Fluorometer (Bio-Rad) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La integridad del ADN se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio.

3. Aislamiento de ARN total

El método modificado a partir de los protocolos establecidos por De Vries *et al.*, (1988) y Schuler y Zielinski (1989) propuesto durante el desarrollo de este trabajo, por su uso común a lo largo de esta investigación se describe en esta sección: un gramo de tejido es macerado con nitrógeno líquido y resuspendido en 20 mL de amortiguador con 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 10 mM EDTA, 200 mM NaCl y 20 mL de solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1). La suspensión se incubó 10 minutos a 80 °C en agitación constante e inmediatamente se enfrió en hielo. Posteriormente, se extrajeron los ácidos nucleicos por centrifugar a 8000 g durante 5 min en una centrifuga Beckman J2-21. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo y se extrajeron los ácidos nucleicos una vez más con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1). Se recuperó el sobrenadante y se realizó una precipitación con un volumen de isopropanol a -20 °C durante 30 min y se centrifugó a 8000 g por 30 minutos.

Posteriormente, la pastilla obtenida fue resuspendida en 5 mL de amortiguador TE y se realizó una segunda precipitación con dos volúmenes de etanol absoluto frío y 0.1 vol de NaCl 5 M, durante 30 minutos a -20°C , para limpiar del exceso de fenol. Posteriormente se centrifugó a 7000 g por 20 minutos y se resuspendió en 0.5 mL de amortiguador TE. En este punto el ARN se encuentra contaminado con ADN y polisacáridos por lo que se realizó una precipitación selectiva con 0.25 vol de urea 8M y 0.25 vol de LiCl 10 M durante 12 horas a -20°C . El ARN fue recuperado al centrifugar a 15,000 g durante 30 minutos a 4°C , la pastilla obtenida se resuspendió en 0.5 mL de amortiguador TE y se volvió a precipitar con dos volúmenes de etanol absoluto frío y 0.1 vol de acetato de potasio 3 M durante 20 minutos a 20°C . La pastilla se recuperó centrifugando a 15,000 g con 4°C durante 20 minutos. El ARN obtenido se resuspendió en 0.5 mL de agua y se le agregó un volumen de etanol al 20 %, posteriormente a la resuspensión se le agregó un volumen de cloroformo, se agitó brevemente, y se centrifugó a 3000 g para obtener un sobrenadante, el cual se transfirió a un nuevo tubo donde se precipitó el ARN nuevamente con 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 vol de NaCl, se almacenó a -80°C para su uso posterior. La cantidad de ARN aislado se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y su integridad se verificó en un gel de agarosa al 1% no desnaturalizante corrido a 60 volts durante 1 hora.

4. Obtención de las sondas homólogas de los genes del *hmg*, *psy* y *DXS*

Selección y diseño de las secuencias de oligonucleótidos

Se diseñaron secuencias de oligonucleótidos para realizar la amplificación específica por PCR de los genes de interés (Tabla 2.1).

Hmg. En este caso se seleccionaron oligonucleótidos degenerados obtenidos de regiones conservadas producidas por el alineamiento de secuencias de aminoácidos de diferentes HMGR de plantas, tales como *A. thaliana* (Enjuto *et al.*, 1994; Learned y Fink, 1989), *O. sativa* (Nelson *et al.*, 1994), *H. brasiliensis* (Chye *et al.*, 1992) y *C. roseus* (Maldonado-Mendoza *et al.*, 1992) (Fig. 2.1).

Psy: En este caso se utilizaron oligonucleótidos degenerados obtenidos a partir de alinear las secuencias de diferentes PSY de *A. thaliana* (Scolnik y Bartley, 1994), *L. esculentum* (Ray *et al.*, 1992), *Z. mays* (Buckner *et al.*, 1996) y *C. annuum* (Römer *et al.*, 1993) (Fig. 2.2).

DXS. Para este caso se utilizaron oligonucleótidos sin degeneración obtenidos a partir de la secuencia reportada para el *DXS* de *Rhodobacter capsulatus* (Youvan *et al.*, 1984). La región de los oligonucleótidos se obtuvo a partir de la alineación de secuencias de diferentes DXPS de bacterias y una planta. El diseño y elaboración de estos oligonucleótidos fue realizado en el grupo de la Dra. Patricia León en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (Fig. 2.3).

Tabla 2.1. Nomenclatura y secuencia de los oligonucleótidos usados para la amplificación de los genes de estudio. Y:(C,G,T); R:(C,G); H:(A,T,C); N:(A,T,G,C); K:(G,T); D:(G,A,T).

Nombre	Gene blanco	Orientación	Traducción a aminoácidos	Secuencia
A	<i>Hmg</i>	Sentido	DAMGMNM	5'GATGCNATGGGNATGAAYATG 3'
B	<i>HmgI</i>	Sentido	GQCCEMP	5'GGNCARTGYTGYGARATGSC 3'
C	<i>Hmg</i>	Reverso	MMEAVND	5'GTCRTTNACNGCYTCCATCAT 3
A	<i>Psy</i>	Sentido	WAIYVWC	5'TGGGCNATHTAYGTNTGCTG 3'
B	<i>Psy</i>	Sentido	EANDYNN	5'AARTTRTRTARTCRTTNGCYTC 3'
RSF	<i>DXS</i>	Sentido	YPHKILT	5'TATCCGCACAAGATCCTGAC 3'
RSR	<i>DXS</i>	Reverso	DVGIAEQHA	5'TGCTGTTCGCGATGCCGAC 3'

Amplificación por PCR de los genes de interés

Se ensayaron diversas condiciones de PCR a partir del ADN genómico de *B. orellana*, variando la cantidad del ADN genómico como molde, la concentración de los oligonucleótidos, la concentración del MgCl₂, la temperatura de alineamiento, la duración y el número de ciclos. Las condiciones finales de amplificación para la obtención de fragmentos de interés que concordaran con el tamaño esperado para los diferentes genes blanco se resumen en la tabla 2.2.

Tabla 2.2 Condiciones finales de amplificación en el ADN genómico para cada par de oligonucleótidos diseñados. Solo se mencionan las combinaciones que generaron productos de PCR. (A + B); oligonucleótidos específicos para el *hmg*. (A + B); oligonucleótidos específicos para el *psy*. (RSR + RSF); oligonucleótidos específicos para el *DXS*.

Variables	(A + B) <i>hmg</i>	(A + B) <i>psy</i>	(RSF + RSR) <i>DXS</i>
ADN molde	250 ng	100 ng	200 ng
MgCl ₂	1.5 mM	1.5 mM	1.5 mM
Desnaturalización	94 °C, 3 min	94 °C, 3min	94 °C, 3 min
Alineamiento	55 °C, 2 min	60 °C, 2 min	53 °C, 1.5 min
Amplificación	72 °C, 2 min	72 °C, 2 min	72 °C, 2 min
Ciclos	45	25	35

Clonación de los productos de PCR

Los productos amplificados fueron purificados para su reamplificación cuando fue necesario o ligados directamente de la mezcla de reacción al vector seleccionado.

Los productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos degenerados para los *hmg* y *psy* fueron ligados directamente de la mezcla de reacción al vector pCR 2.1 usando el kit de TA cloning (Invitrogene). Los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos específicos del *DXS* se purificaron empleando agarosa bajo punto de fusión y se ligaron al vector pBluescript II KS +/- con el método propuesto por Marchuk y colaboradores (1991), el cual emplea una modificación de los extremos del vector al añadir una cola de timinas.

En todos los casos la transformación se realizó con bacterias competentes de la cepa α DH5 por choque térmico y CaCl₂ (Sambrook *et al.*, 1989).

			B
HB	211	GFDYESILGQCC	EMPVGYVQIPVGIAGPLLLDNGREYSVPMATTEGCLVASTNRGCKAIYL
AT	222	GFDYESILGQCC	EMPVGYIQIPVGIAGPLLLDGYEYSVPMATTEGCLVASTNRGCKAMFI
CA	226	GFDYESILGQCC	EMAVGYVQMAVGIAGPLLLDGREYLVPMATTEGCLVASTNRGCKAIYA
CR	230	GFDYASILGQCC	EMPVGYVQLPVGIAGPLLLDGREYMLPMATTEGCLVASTNRGCKAILA
HB	271	SGGATS	VLLKDGMTTRAPVVRFASATRAAELKFFLEDPNFDTLAVVFNKSSRFARLQGIK
AT	282	SGGATS	TVLKDGMTTRAPVVRFASARASELKFLENPENFDTLAVVFNRRSFRARLQGIK
CA	286	SGGATS	VLLRDGMTRAPVVRFGTAKMSAELKFFLEDPRNFDLAVVFNKSSRFGRFQGIH
CR	290	SGGANS	VLLRDGMTRAPVVRFGTAKRAAELKFYMEDTQNFETISVVFNKSSRFARLQSVQ
HB	331	CSIAGKNLYIRFSCST	A
AT	342	CTIAGKNAYVRFCCST	SDAMGMNMYSKGVQNVLEFLQSDFSMDMVDIGISGNFCSDKKPAA
CA	346	CALAGQNLVYRFSCST	SDAMGMNMYSKGVQNVLDLFLQNDFSMDMVDIGISGNFCSDKKPAA
CR	350	CAIAGKNLYIRFSCST	SDAMGMNMYSKGVQNVLEFLQTDYDPMDDVIGISGNFCADKKPAA
HB	391	VNWIEGRGKSVVCEAI	IKEEVVKVLKTNVASLVELNMLKNLGASAVAGALGGFNAHASN
AT	402	VNWIEGRGKSVVCEAV	IRGEIVNKVLKTSVAALVELNMLKNLGASAVAGSLGGFNAHASN
CA	406	VNWIEGRGKSVVCEAI	IKEEVVKVLKTNVASLVELNMLKNTGSAMAGALGGFNAHASN
CR	410	VNWIEGRGKSVVCEAI	IKEEIVKTVLKTVEVALIELNMVKNLAGSAIAGALGGFNAHASN
HB	451	IVSAIFIATQDPAQN	VNESSHCITNMEAVNDGKDLHISVTMPSIEVGTVGGGTQLASQSA
AT	462	IVSAVFIATQDPAQN	VNESSQCITNMEAINDKGDLHISVTMPSIEVGTVGGGTQLASQSA
CA	466	IVSAVYIATQDPAQN	VNESSHCITNMEAVNDGKDLHVSVMPSIEVIVGGG-TQLASQSA
CR	470	IVSAIFIATQDPAQN	VNESSQCITNMEAVNDGKDLHISVTMPSIEVGTVGGGTQLASQSA
			C

Figura 2.1. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de diferentes HMGR de plantas, con el objetivo de encontrar secuencias conservadas para elaborar oligonucleótidos degenerados para la posterior amplificación por PCR. HB: *Hevea brasiliensis*, OS: *Oryza sativa*, AT: *Arabidopsis thaliana*, CR: *Catharanthus roseus*. Las cajas indican la localización de la secuencia utilizada para la elaboración de los oligonucleótidos. El alineamiento de las secuencias de interés se realizó con el programa CLUSTALW: (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multialign>).

CA	114	LDVKKDIP	PGTLGLLS-EAYDRCEVCAEYAKTFYLGTMMLTPERRKAIWAIYVWCRR
LE	118	LDVKPDIVL	PGTLGLLS-EAYDRCEVCAEYAKTFYLGTMMLTPERRKAIWAIYVWCRR
AT	113	VKKPQDVV	LPGLSLLVGEAYDRCEVCAEYAKTFYLGTMMLTPERRKAIWAIYVWCRR
ZM	100	-VLDARPDMD	MPRNLKEAYDRCEVCAEYAKTFYLGTMMLTEERRRAIWAIYVWCRR
CA	173	DELVDGPNASHIT	PPALDRWEDRLEDVFSGRPFDMDLAALS
LE	177	DELVDGPNASHIT	PPALDRWEARLEELFQGRPFDMDLAALADTVTKFPVDIQPFKDMIEG
AT	173	DELVDGPNASHIT	PPALDRWEARLEELFQGRPFDMDLAALADTVARYPVDIQPFKDMIEG
ZM	159	DELVDGPNAN	YITPPALDRWEKRLEDLFTGRPYDMLDAALS
CA	233	MRMDLRKSR	YRNFDELYLYCYVAGTVGLMSVPMIAGIAPESKATTESVYNAALALGIANQ
LE	237	MRMDLRKSR	YRNFDELYLYCYVAGTVGLMSVPMIAGIAPESQASTESVYNAALALGIANQ
AT	233	MRMDLKR	SRYRNFDDLYLYCYVAGTVGLMSVPMIAGIAPESKATTESVYNAALALGIANQ
ZM	219	MRSDLR	KTRYNFDELYMYCYVAGTVGLMSVPMIAGIAPESKATTESVYNAALALGIANQ
CA	293	LTN-ILRDV	GEDARRGRVYLPQDELAQAGLSDEDIFAGRVTDKWRIFMKKQIQRARKFFD
LE	297	APPNILRDV	GEDARRGRVYLPQDELAQAGLSDEDIFAGRVTDKWRNFMKNQIKRARMFFD
AT	293	LTN-ILRDV	GEDARRGRVYLPQDELAQAGLSDEDIFAGRVTDKWRNFMKNQIKRARMFFD
ZM	279	LTN-ILRDV	GEDARRGRVYLPQDELAQAGLSDEDIFKGVVTVNRWRNFMKQIKRARMFFE
CA	352	EAEKGVTELSA	SRWPVWASLLLYRQILDEI
LE	357	EAEKGVTELSA	SRWPVWASLLLYRQILDEI
AT	352	EAEKGVTELSA	SRWPVWASLLLYRQILDEI
ZM	338	EAERG	VNELSQASRWPVWASLLLYRQILDEI
			B

Figura 2.2. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de diferentes PSY de plantas, con el objetivo de encontrar secuencias conservadas para elaborar oligonucleótidos degenerados para la posterior amplificación por PCR. C.A: *Capsicum annuum*, LE: *Lycopersicon esculentum*, A.: *Arabidopsis thaliana*. Las cajas indican la localización de la secuencia utilizada para la elaboración de los oligonucleótidos. El alineamiento *thaliana*, ZM: *Zea* de las secuencias de interés se realizó con el programa CLUSTALW: (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multialign>).

			RSF
CLA	116	LGSSGLGVVELTVALHYIFNTPQDKLIWDVGHQSYPHKILTGRGKMGPTMRQTNGLSGFTK	
CM	121	LSSSLGVVELTVMAMHYVFNTPEDKI IWDVGHQAYGHKILTGRKGMATIRQTNGLSGFTK	
RC	50	LGSSSLGVVELTVALHAVFNSPGDKLIWDVGHQCYPHKILTGRSRLMLTLRQAGGISGFPK	
EC	50	FASGLGTVELTVALHYVYNTPFQDLIWDVGHQAYPHKILTGRDRDKIGTIRQKGLHPPFW	
CLA	176	RGSEHDCFGTGHSSSTTISAGLGMAVGRDLKGNKNNVVAVIDGAMTAGQAYEAMNNAGY	
CM	181	RDESEYDFPGAGHSSTTISAALGMAVGRDVKGNKNSVIAVIGDGAITGGMAYEAMNHAGF	
RC	110	RSESPHDAFAGAGHSSTTISAALGFAVGRELGQPVGDGTIAIIGDGSITAGMAYEALNHAGH	
EC	110	RGSEYDVLVSVGHSSSTTISAGIGIAVAEKEGKNNRRTVCVIGDGAITAGMAFEAMNHAGD	
CLA	236	LDSDMIVILNDNKQVSLPTATLDGSPSPVVGALSSALSRLQSNPALRELREVAKGMTKQIG	
CM	241	LDKNMIVILNDNQVSLPTQYNNKNQDPVVGALSSALARLQANRPLRELRREIAKGVTKQLP	
RC	170	LKSRMFVILNDND-----MSIAPPVVGALQHYLNTIARQAPFAALKAAAEGIEMHLP	
EC	170	IRPDMLVILNDNE-----MSISENVGALNNHLAQLLSSGLKLYSSLREGGKVKVSGVP	
CLA	296	GPMHQLAAKVDVYARGMISGTGSSLFEELGLYYIGPVDGHNIDDLVAILKEVKSTRTTGP	
CM	301	DVVQKATAKIDEYARGMISGTGSLFEELGLYYIGPVDGHNLDLIVLSEVRSATVGP	
RC	221	GPVRDGAARRARQMVMTAMPG--GATLFEELGFDYIGPVDGHDMAELVETLRVTR-ARASGP	
EC	221	-PIKELKRTTEEHKGMVVP--GTLFEELGFNYIGPVDGHDVGLGITTLKNNR--DLKGP	
CLA	356	VLIHVVTEKGRGYPYAEARADDKYHGVVVKFDPATGRQFKTTNETQSYTTYFAEALVAEAEV	
CM	361	VLVHVUTEKGRGYPYAEARADDKYHGVVVKFDPRTGKQVQAKTKAMSYTNYFADALTAEAER	
RC	278	VLIHVCTTKGKYAPAEGAEDKLHGVSFKFDIETGKQKSI PNAPNYTAVFGERLTEEAAR	
EC	276	QFLHIMTKKGRGYEPAEKDPI TFHAVPKFDPSSGGLPKSSGGLPSYSKIFGDWLCETAAK	
CLA	416	DKDVVAIHAAMGGGTGLNLFQRRFPTRCFDVGIAEQHAVTFAAGLACEGLKPFCAIYSSF	
CM	421	DSRI VAVHAAMAGGTGLYRFEKKFPDRTFDVGIAEQHAVTFAAGLACEGLVPFCTIYSTF	
RC	338	DQAI VAVTAAMPTGTGLDIMQKRFPRRVFDVGIAEQHAVTFAAGMAAAGLKPFLLALYSSF	
EC	336	DNKLMAITPAMREGSGMVEFSRKFPPDRYFDVVAI AEQHAVTFAAGLAIGGYKPIVAIYSTF	

Figura 2.3. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de diferentes DXPS de bacterias y una planta. Se realizó el alineamiento con el objetivo de encontrar regiones conservadas a partir de secuencias heterólogas y de esta forma elaborar oligonucleótidos para la posterior amplificación por PCR. CLA: *Arabidopsis thaliana*, Clam: *Chlamydomonas reinhardtii*, Ecol: *Escherichia coli*. Las cajas indican la localización de la secuencia utilizada para la elaboración de los oligonucleótidos. El alineamiento de las secuencias de interés se realizó con el programa CLUSTALW: (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multialign>).

Análisis de los insertos de interés

Se realizó una selección de las clonas positivas a partir de las bacterias transformadas de acuerdo a la complementación α . La coloración azul ó blanco permite la elección de bacterias que contienen insertos (productos de PCR) en sus plásmidos. La coloración azul es originada por la hidrólisis del X-gal como un resultado de la expresión del gen *LacZ* presente en el plásmido pCR2.1 o pBluescript II KS +/- . El gen *LacZ* codifica para la subunidad pequeña de la β -galactosidasa que complementaría la subunidad grande expresada a partir del genoma bacteriano. La incorporación de un fragmento de PCR dentro del gen *LacZ* inactiva su función e impide a la bacteria producir una β -galactosidasa funcional, por lo que no es posible hidrolizar el X-gal presente en el medio. La hidrólisis de este compuesto que es un análogo de la galactosa produce un color azul, de esta forma las bacterias que mantienen su coloración blanca son positivas, ya que llevan un producto de PCR dentro de sus plásmidos.

Las clonas positivas fueron sometidas a una segunda selección por reamplificación por PCR del inserto de interés (con las condiciones establecidas en la Tabla 2.1) y/o directamente por el aislamiento y digestión del plásmido para liberar al inserto con las enzimas apropiadas de acuerdo al vector.

Se purificaron los plásmidos del conjunto de clonas seleccionadas utilizando el método de minipreparación alcalina descrito por Sambrook *et al.*, (1989). En el caso de los genes *hmg* y *psy*, se liberaron los insertos por digestión con la enzima de restricción *Eco* RI y en el caso de los productos de PCR para el gen *DXS* se realizó la digestión con *Eco* RI y *Hind* III.

Los insertos purificados de las clonas seleccionados fueron secuenciados directamente de forma parcial con los oligonucleótidos cebadores T1 y T7 utilizando el Taq DNA Sequencing Kit for Standard and Cycle sequencing (Boehringer Mannheim) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para verificar los resultados los insertos fueron resecuenciados completamente en el CINVESTAV Irapuato por secuenciación automática utilizando los mismos oligonucleótidos.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias presentes en el banco de secuencias EMBL usando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997). El alineamiento de las secuencias de interés se realizó con el programa CLUSTALW (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multialign>) y el sombreado con el programa BOXSHADOWN (<http://www.isrec.isb-sib.ch:8080/index.html>).

5. Estudios de expresión

Análisis de los mensajeros que codifican para la HMGR por dot blot

Para el análisis de expresión de mensajeros con la técnica de dot blot, se preparó un soporte de agarosa al 1% desnaturalizante, en el cual se dispusieron pocillos para la aplicación del ARN. El molde de agarosa se colocó sobre una membrana en un aparato de transferencia al vacío. Se desnaturalizaron 30 µg de ARN total de los diferentes tejidos durante 15 minutos a 65 °C antes de su aplicación. El ARN se fijó a la membrana utilizando el transiluminador de UV para unión cruzada (Stratagene).

Las condiciones de hibridación fueron a 42 °C con 50 % de formamida. Los lavados se realizaron durante 15 minutos con 2X SSC y 0.1 % SDS a temperatura ambiente, y una segunda vez por 10 minutos con 1X SSC y 0.1 % SDS a 62 °C. Se usó el fragmento clonado del *hmg* marcado con [α -³²P]-dCTP por el método de random primer con el kit de Megaprime (Amersham). Como control para comprobar que no existe hibridación inespecífica con el ADN, se aplicó una muestra con ARN de hoja incubada con ARNasa durante treinta minutos y como un control de la cantidad de ARN aplicado en cada punto, se hibridó la membrana con la sonda ribosomal de *Camptotheca acuminata* (Maldonado-Mendoza *et al.*, 1997) y/o se tiñó con bromuro de etidio para visualizar la cantidad de ARN presente.

Análisis de los mensajeros *hmg* y *psy* por northern blot

Para analizar la acumulación de los transcritos de las enzimas HMGR y PSY, se escogieron diversas etapas de la maduración del fruto y formación de semillas, ya que en estos órganos se acumula una gran cantidad de carotenoides y otros metabolitos secundarios (Mercadante *et al.*, 1996).

Se corrieron 20 µg de ARN total por electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa (1.2 %) y formaldehído (3 %) con MOPS 1X, empleando 50 volts durante 4 horas. Posteriormente el ARN se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon (Amersham) usando 10X SSC. El ARN se fijó a la membrana con rayos ultravioleta en un transiluminador

para unión cruzada UV 2400 (Stratagene) utilizando un ciclo automático de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se marcó el fragmento clonado del *hmg* con [α - 32 P]-dCTP por random primer con el kit de Megaprime (Amersham). El fragmento clonado del *psy* se marcó con [α - 32 P]-dCTP utilizando transcripción *in vitro* con el sistema MAXIscript (Ambion) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

En ambos casos las condiciones de hibridación empleadas fueron de 42 °C por 24 h como describen Church y Gilbert (1994) en 50 % de formamida. Después de la hibridación las membranas se lavaron en 2x SSC / 0.1% SDS a 42 °C por 15 min seguido por 1x SSC / 0.1% SDS a 42 °C por 15 min, 0.5x SSC / 0.1% SDS a 65 °C por 10 min.

Ensayo de protección de ARN contra ribonucleasas para el gen *hmg*

El ensayo de protección de ARN contra ribonucleasas (RPA) presenta ventajas con respecto a los northern blot, ya que permite analizar genes con pequeñas acumulaciones de transcritos, es más específico para la sonda seleccionada y no es necesario aislar totalmente el ARN.

Para realizar el RPA del gen *hmg* fue necesario sintetizar una ribosonda con 32 P UTP mediante el sistema de transcripción *in vitro*. Para realizar lo anterior la secuencia de 409 pb del *hmg* presente en el vector pCR2.1 se colocó en forma de antisentido en el vector pBluescript II KS +/-, este vector contiene los promotores T7 y T3 que permiten la transcripción del inserto en cualquier sentido.

La transcripción *in vitro* se realizó en un sistema libre de ARNasa. Al ADN molde se le agregó [α - 32 P]-dUTP (800 Ci/mmol 10 mCi/ml) y se transcribió usando el kits de MAXIscript™ *In Vitro* Transcription T7 kits (Ambion) según las instrucciones del fabricante.

Los tejidos seleccionados fueron macerados en nitrógeno líquido, posteriormente se les aplicó amortiguador de lisis (tiocinato de guanidina) usando el Kit de Direct Protect (Ambion). La mezcla se hibridó directamente con la ribosonda durante la noche. Posteriormente se aplicó ARNasa T1 para la destrucción de todos los mensajeros (y RNA ribosomal) no hibridados.

El principio por el cual trabaja este sistema es mediante la hibridación *in situ* de los mensajeros del gen de interés con la ribosonda marcada, posteriormente se agrega RNAasa T1, la cual tiene la capacidad de degradar todo el ARN no hibridado. De esta forma solo se mantienen en la solución de hibridación los mensajeros hibridados del gen de interés.

Las muestras se corrieron en un gel no desnaturante de acrilamida al 5% y los transcritos presentes fueron detectados por su señal en film de rayos X. Una sonda ribosomal 28S de 158-pb de *C. acuminata* cADN (U42789) se usó como control de la cantidad de ARN presente en cada muestra. Se utilizaron 100 000 cpm (5 μ L) de la ribosonda del *hmg* y 500 000 cpm (5 μ L) de la ribosonda de la subunidad 28S en 45 μ L del lisado para cada muestra, para llegar a un volumen final de 50 μ L. La cantidad relativa de ARNm fue cuantificado usando un Bio-Image Analyzer GS25 de RedBio.

6. Análisis de pigmentos

Purificación y cuantificación de carotenos y bixina

Para la purificación de los carotenoides de *B. orellana* en todos los tejidos de interés se modificó un protocolo tomado de (Biacs y Daood, 1994), el cual se describe a continuación: Se muelen 2 g de material vegetal en 2 mL de acetonitrilo/metanol/isopropanol (75/10/15) con un politrón. La solución se colocó en agitación constante durante 45 min en oscuridad, durante este tiempo se le fueron adicionando pequeñas cantidades de nitrógeno para eliminar el oxígeno atmosférico, evitando la luz directa, para impedir la oxidación y degradación de los carotenoides presentes en la solución. Después se centrifugó durante 20 min dos veces, se recuperó el sobrenadante, se secó y se concentró en 40 μ L con acetonitrilo/metanol/isopropanol (75/10/15).

Se cuantificó la cantidad de bixina en un espectrofotómetro Beckman DU-65 a una absorbancia de 500 nm de acuerdo a la fórmula propuesta por McKeown y Mark (1962), la cual se describe a continuación:

$$\text{Carotenoides totales} = A_{500} + A_{404} - 0.256 (A_{500})/282.6 \times V/1000 \times 100/P.$$

Donde: A_{500} = Absorbancia de bixina.

A_{404} = Absorbancia de los productos de degradación.

0.256 = Factor concerniente a las absorbancias de 404 y 500 nm en cloroformo.

V = Volumen final

P = Peso fresco empleado.

La ecuación para determinar la concentración de bixina por espectrofotometría en las semillas es :

$$\text{Bixina (g/100 g)} = A_{500}/282.6 \times V/1000 \times 100/P.$$

Análisis por HPLC de los pigmentos en los cultivos *in vitro*

Los carotenoides aislados y resuspendidos en 45 μ L de la solución acetonitrilo/metanol/isopropanol (75/10/15) se inyectaron en una columna de fase reversa C-18 (25cm largo x 4.6mm i.d.) empacada con una matriz de lichrosob, (Alltech) con un flujo de 1.5 mL/min. Se observó la absorbancia a 493 nm como describen Biacs y Daood (1994) para frutos de otras plantas que contienen carotenoides.

Como un control de la señal de bixina se corrió un estándar purificado del extracto de semilla a partir de una cromatografía en capa fina (TLC) con una placa de silica gel con soporte de aluminio de 2 cm de ancho por 5 cm de largo, la mezcla de elusión para este caso también fue acetonitrilo/metanol/isopropanol (75/10/15), el tiempo de retención de la bixina en este sistema fue 0.72.

7. Análisis de la actividad enzimática

Los tejidos cosechados se congelaron en nitrógeno líquido. Posteriormente se pulverizaron con nitrógeno líquido en morteros. El macerado se resuspendió en un amortiguador que contiene 100 mM Tris-HCl pH 7.2, 250 mM sacarosa, 1mM EDTA, pH 7.5, 5 mM DTT fresco, 1mM PMSF y 7.5 μ g/ml de leupeptina. La fracción microsomal se obtuvo por centrifugar con 10,000 g por 10 min, el sobrenadante se centrifugo nuevamente a

100,000 g por 75 min y la pastilla resultante se resuspendió en 100 mM Tris-HCl pH 7.2, 20% (v/v) glicerol, 1mM EDTA pH 7.5, 50 mM DTT, 1mM PMSF y 7.5 µg/mL de leupeptina.

La actividad de la HMGR se analizó midiendo la formación de [3-¹⁴C]-mevalonato a partir del [3-¹⁴C]-hidroxi-metilglutaril CoA, el cual fue usado como sustrato. La mezcla de reacción contiene 3 mM NADPH, 5 mM DTT, 700 pmol [3-¹⁴C]-hidroxi-metilglutaril CoA (0.04 µCi, Amersham CFA732. Corp. Buckinghamshire, England) y proteína microsomal (10-60 µg) en un volumen final de 26µL. La mezcla de reacción se incubó por 1h a 18-20 °C y se separó el mevalonato producido por lactonización usando 5 mL de mevalonato lactato como acarreador. La mezcla se incubó durante 15 min a 20 °C, y luego se aisló con 300 µL de acetato de etilo y 125 µL de amortiguador de fosfatos saturado pH 7.5. La fase orgánica que contiene el mevalonato radioactivo se recobro y se analizó con un contador de centelleo. Se hicieron tres replicas por tejido

8. Determinación del número de copias del gen *hmg*

El ADN genómico se aisló a partir de plántulas etioladas al día 30 de crecimiento como se describió anteriormente. Se usaron 10 µg de ADN genómico para el análisis tipo southern blot. Las enzimas de restricción usadas fueron *Eco* RV, *Hind* III y *Bam* HI. Los fragmentos de ADN se separaron en un gel de agarosa al 0.8 %, y se transfirieron a una membrana de nylon (Amersham Corp. Buckinghamshire, England). Posteriormente el ADN se fijó a la membrana usando un stratalinker UV crosslinker 2400 (Stratagene, La Jolla, CA). Se uso un fragmento de 503 pb del *hmg* marcado con digoxigenina sintetizado por PCR como sonda. Las condiciones de hibridación empleadas fueron de 65 °C por 24 h como describen Church y Gilbert (1994) en amortiguador de fosfatos. Después de la hibridación las membranas se lavaron en 2x SSC / 0.1% SDS a 42 °C por 15 min seguido por 1x SSC / 0.1% SDS a 42 °C por 15 min, 0.5x SSC / 0.1% SDS a 65 °C por 10 min. La detección se realizó usando el sistema DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim Biochemicals) según las instrucciones del fabricante.

BIBLIOGRAFIA

- Altschul A, Stephen F, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Biacs P, Daood H** (1994) High-performance liquid chromatography with photodiodearray detection of carotenoids and carotenoid esters in fruits and vegetables. *J. Plant Physiol.* 143:520-525.
- Buckner B, San Miguel P, Janick-Buckner J, Bennetzen J** (1996) The *yi* gene of maize codes for phytoene synthase. *Genetics* 143:479-488.
- Castillo F** (1998) Establecimiento de cultivos de callos a partir de cortes del fruto de *Bixa orellana* L. Tesis de Licenciatura. UADY. Mérida Yucatán p:57.
- Chye M, Chio-Tee T, Nam-Hai C** (1992) Three genes encode 3-hydroxy-3- methylglutaryl CoA reductase in *Hevea brasiliensis*: *hmg1* and *hmg3* are differentially expressed. *Plant Mol. Biol.* 19:473-484.

- Church G, Gilbert W** (1994) Genomic sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:1991-1995.
- De Vries S, Hoge H, Biseeing T** (1988) Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. Plant Mol. Biol. Manual B6: 64-71.
- Doyle J, Doyle L** (1990) Isolation of DNA from fresh plant tissue. Focus 12:13-15.
- Enjundo M, Balcells L, Campos N, Caelles C, Arró M, Boronat A** (1994) *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:927-931.
- Herrera V** (1998) Inducción de callos a partir de tallo y hojas de plántulas de *Bixa orellana*. Tesis de Licenciatura. UADY. Mérida Yucatán p:78
- Hoelzel A** (1992) Molecular genetic analysis of population a practical approach. Oxford University Press. USA. p.134.
- Learned M, Fink G** (1989) 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase from *Arabidopsis thaliana* is structurally distinct from the yeast and animal enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:2779-2783.
- Maldonado-Mendoza I, Burnett R, Nessler C** (1992) Nucleotide sequence of a cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Catharanthus roseus*. Plant Physiol. 100:1613-1614.
- Maldonado-Mendoza I, Vicent R, Nessler C** (1997) Molecular characterization of three differentially expressed members of the *Camptotheca acuminata* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR) gene family. Plant Mol. Biol. 34:781-790.
- Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins F** (1991) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. Nucleic Acid Res. 19:1154-1155.
- McKeown G, Mark E** (1962) Paper chromatography of bixin and related compounds. J. Assoc. Offic. Agr. Chemists 45:761-766.
- Mercadante A, Steck A, Rodriguez-Amaya D, Pfander H, Britton G** (1996) Isolation of methyl 9'-Z-apo-6'-lycopenoate from *Bixa orellana* L. Phytochemistry 41:1201-1203.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Nelson A, Doerner P, Zhu Q, Lamb C** (1994) Isolation of a monocot 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene that is elicitor-inducible. Plant Mol. Biol. 25: 401-412.
- Phillips G, Collins G** (1979) *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus culture of red clover. Crop. Sci. 19:59-64.
- Ray J, Moreau P, Bird A, Grierson D, Maunders M, Truesdale M, Bramley P, Schuch W** (1992) Cloning and characterization of genes involved in phytoene synthesis from tomato. Plant Mol. Biol. 19:401-404.
- Römer S, Hugueney P, Bouvier F, Camara B, Kuntz M** (1993) Expression of the genes encoding the early carotenoids biosynthetic enzymes in *Capsicum annum*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 196: 1414-1421.

- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T** (1989) Molecular cloning a laboratory manual. Second ed. Cold Spring harbor Laboratory Press, New York. USA.
- Schuler M, Zielinski R** (1989) RNA isolation from light-and dark-grown seedlings. In: Methods in Plant Molecular Biology. (M Shuler, R Zielinski, eds.). Academic Press, Inc. USA. pp:89-96.
- Scolnik P, Bartley G** (1994) Nucleotide sequence of an *Arabidopsis* cDNA for phytoene synthase. Plant Physiol. 104:1471-1472.
- Youvan D, Bylina J, Alberti M, Begusch H, Hearst J** (1984) Nucleotide and deduced polypeptide sequences of the photosynthetic reaction-center, B870 antenna, and flanking polypeptides from *Rhodobacter capsulatus*. Cell 37:949-957

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

1. Establecimiento de cultivos *in vitro*

Para el establecimiento de diferentes cultivos *in vitro* de *B. orellana*, se obtuvieron plántulas a partir de semillas en condiciones asépticas. Las plántulas se crecieron en luz continua y a temperatura constante de 25 °C. Se cosecharon las plántulas al día 30 después de la germinación.

En nuestro laboratorio también se obtuvieron callos a partir de explantes generados de tallos y hojas de las plántulas crecidas *in vitro* y a partir de explantes generados de cortes de los frutos de la planta adulta (Castillo, 1998; Herrera, 1998). De los callos obtenidos de explantes de plántulas se seleccionaron líneas de diferentes colores (verde o amarillo claro) y de los callos obtenidos de explantes del fruto se seleccionó una línea de color café oscuro. En todos los casos se seleccionaron los callos que presentaron mayor velocidad de crecimiento y consistencia friable, sugiriendo que son viables para la inducción de cultivos de células en suspensión. Después de caracterizar los cultivos se observó que el día 30 de crecimiento era la fecha óptima para la resiembra, ya que los callos entran a una fase estacionaria de crecimiento y presentan cambios en su coloración.

Los cultivos de callos fueron analizados en función de su acumulación de carotenos y con ellos se realizó la optimización de diferentes protocolos bioquímicos y moleculares.

2. Extracción de ARN total

Se ensayaron diversos protocolos de extracción de ARN para plantas tropicales. Entre los métodos probados sin éxito, está el protocolo propuesto por Chomczynski y Sacchi (1987) que emplea tiocianato de guanidina en el amortiguador de extracción; el protocolo propuesto por De Vries y colaboradores (1988) que emplea fenol caliente en el amortiguador de extracción; el protocolo propuesto por López-Gómez y Gómez-Lim (1992) que emplea Tris-Borato en el amortiguador de extracción y el protocolo de precipitación selectiva con urea y LiCl propuesto por Schuler y Zielinski (1989).

Las figuras 3.1, 3.2 y 3.3 presentan algunos geles de agarosa representativos de las diferentes extracciones realizadas. Como se puede apreciar, con el método de extracción que emplea tiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987) en los tejidos de la plántula fue posible extraer ARN, sin embargo, este se encuentra totalmente degradado y presenta cierta contaminación ya que parte del ARN no migra y se queda en los pocillos. Por otra parte, con este método no es posible extraer ARN de los órganos de la planta adulta, principalmente por la gran cantidad de polisacáridos y otros metabolitos presentes (Fig. 3.1).

Con el método de fenol ácido y caliente (De Vries *et al.*, 1988), fue posible extraer ARN total, pero éste se encuentra parcialmente degradado (3.2a). Al equilibrar el fenol caliente con amortiguador tris-HCl pH 7.2, se observó que el ARN total se extrajo en mayor cantidad y calidad, sin embargo, aun existe una contaminación con ADN (Fig. 3.2b).

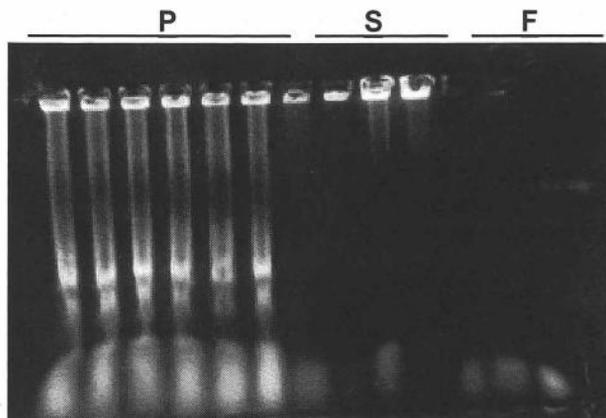


Figura 3.1. Extracción de ARN total de *B. orellana*, utilizando la minipreparación con tiocinato de guaninida en el amortiguador de extracción. Se realizó la electroforesis del ARN total aislado por este método en un gel de agarosa 1 %, puede observarse en tejidos de la plántula ARN total, pero éste se encuentra degradado. P: plántula; S: semilla; F: frutos.

El método propuesto por Schuler y Zielinski (1989), el cual incluye una precipitación selectiva con urea y LiCl permite eliminar el exceso de ADN, sin embargo este método es recomendado solamente para los cultivos *in vitro*, debido a la pequeña cantidad de polisacáridos que estos contienen (Fig. 3.3a). Este método no es aplicable para los tejidos de la planta adulta por su mayor cantidad de polisacáridos y pigmentos (Fig. 3.3b).

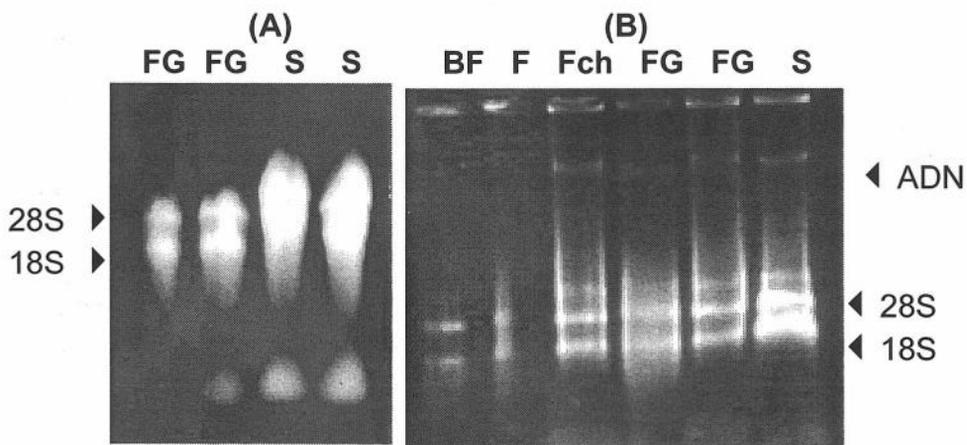


Figura 3.2. Extracción de ARN total con el método de fenol ácido y caliente. **A)** Gel de agarosa 1% mostrando el ARN extraído con fenol ácido y caliente de diferentes órganos de la planta adulta. **B)** Gel de agarosa al 1% mostrando el ARN extraído de diferentes órganos de la planta adulta, empleando fenol equilibrado con amortiguador Tris-HCl pH 7.2. BF: botón floral, F: flor, Fch: fruto chico, FG: fruto grande y S: semilla. Las flechas indican la presencia de los ARN ribosomales y la presencia de ADN.

De acuerdo a los resultados obtenidos se optó por desarrollar un método de extracción de ARN total para todos los tejidos analizados de *B. orellana*, en el cual se mezcló la extracción con fenol caliente equilibrado y la precipitación selectiva con urea y LiCl. Con

este método, el cual por su uso común durante el desarrollo de este trabajo se describe en el capítulo 2, se obtiene ARN total de buena calidad, libre de ADN y de polisacáridos para todos los tejidos analizados. El ARN total así obtenido corre bien en geles desnaturalizantes, los cuales son necesarios para realizar estudios de expresión tipo northern (Fig. 3.4). El ARN aislado por este método resultó ser viable para su análisis durante la expresión de mensajeros.

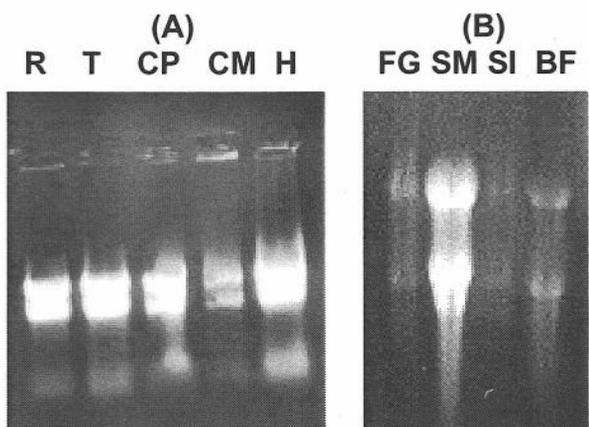


Figura 3.3. Extracción de ARN total con el método de Schuler y Zielinski (1989). Geles de agarosa al 1 %. **A)** ARN de los tejidos *in vitro* de *B. orellana*. **B)** ARN de tejidos provenientes de la planta adulta de *B. orellana*. El ARN está parcialmente degradado. R:raiz, T: tallo, H: hoja, CB: callo blanco proveniente de hojas, CP: callo pardo proveniente de frutos, FG: fruto grande, SM: semilla madura, SI: semilla inmadura y BF: botón floral.

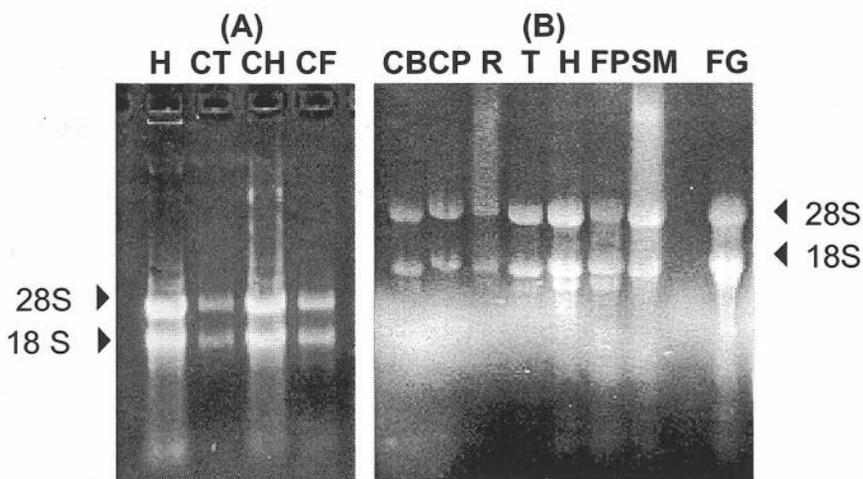


Figura 3.4. Extracciones de ARN total utilizando fenol caliente equilibrado en el amortiguador de extracción y una precipitación selectiva con urea y LiCl. **A)** Gel de agarosa al 1% mostrando el ARN extraído de diferentes cultivos de callos. **B)** Gel de agarosa desnaturalizante al 1 %, mostrando diferentes extracciones de ARN obtenidas de diferentes órganos de la planta adulta. H: hoja, T: tallo, R: raíz, CT: callo originado de tallo, CH: callo originado de hoja, CB: callo blanco, CP: callo pardo, FP: fruto pequeño, FG: fruto grande y SM: semilla madura. Las flechas indican la posición de los ARN ribosomales de la planta.

3. Clonación de las secuencias parciales de los *hmg*, *psy* y *DXS*

Aislamiento y clonación de la secuencia parcial del *hmg*

Se realizó la clonación de una secuencia parcial del *hmg*. Los oligonucleótidos A, B y C, se probaron en diversas condiciones de amplificación por PCR. Con las condiciones descritas en la tabla 2.1 se obtuvo la presencia de bandas discretas en el gel (Fig.3.5). Se ligó la muestra con el fragmento más abundante de 500 pb producido con los oligonucleótidos A y C (Fig. 3.5a) en el vector pCR2.1. Se transformaron bacterias competentes de la cepa α DH5, y se realizó una selección inicial de las clonas de interés por color como se describe en el capítulo 2.

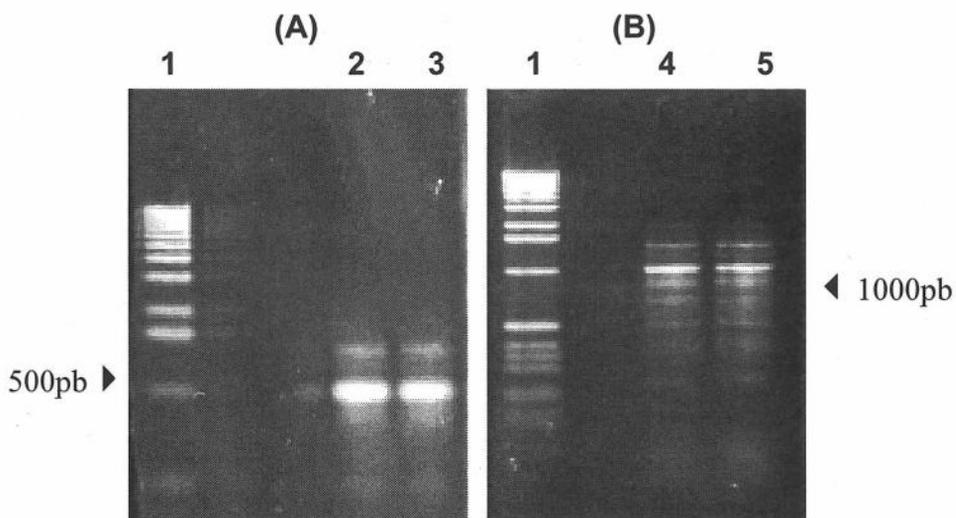


Figura 3.5. Amplificación por PCR a partir del ADN genómico del *hmg* de *B. orellana*. Se realizó la amplificación con los oligonucleótidos diseñados en las condiciones de PCR de 45 ciclos, 55 °C de temperatura de alineamiento y 1.5 mM de MgCl₂. Se seleccionó un fragmento de 500 pb generado con los oligonucleótidos A y C. **A)** Amplificación del ADN genómico con los oligonucleótidos A y C, **B)** Amplificación del ADN genómico con los oligonucleótidos B y C. 1; marcador de peso molecular número X, 2 y 3: amplificación con los oligonucleótidos A y C, 4 y 5: amplificación con los oligonucleótidos B y C.

La muestra con los productos de PCR amplificados que se ligó al vector poseía además del fragmento abundante de 500 pb otros productos de PCR de diferentes tamaños apenas visibles en el gel, por esta razón se realizó una segunda selección por PCR de las clonas positivas (con posibles diversos productos de PCR), para seleccionar la o las clonas a secuenciar (Fig. 3.6). Esta segundo análisis se realizó mediante la amplificación del ADN de los plásmidos en las bacterias ya seleccionadas con los oligonucleótidos iniciales (A y C) en las condiciones iniciales de amplificación, los resultados muestran que la clona 2 posee un inserto de 500 pb, se escogió esta clona para la extracción de su plásmido y posterior digestión del inserto presente para secuenciar (Fig. 3.6).

La secuencia obtenida de la clona 2 se muestra en la figura 3.7, se obtuvieron 503 pb correspondientes al gen *hmg*. Se realizó un análisis de la secuencia en la base de datos

empleando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997). El análisis resultante demostró una alta similitud del fragmento clonado con diversos *hmg* de plantas (Tabla 3.1).

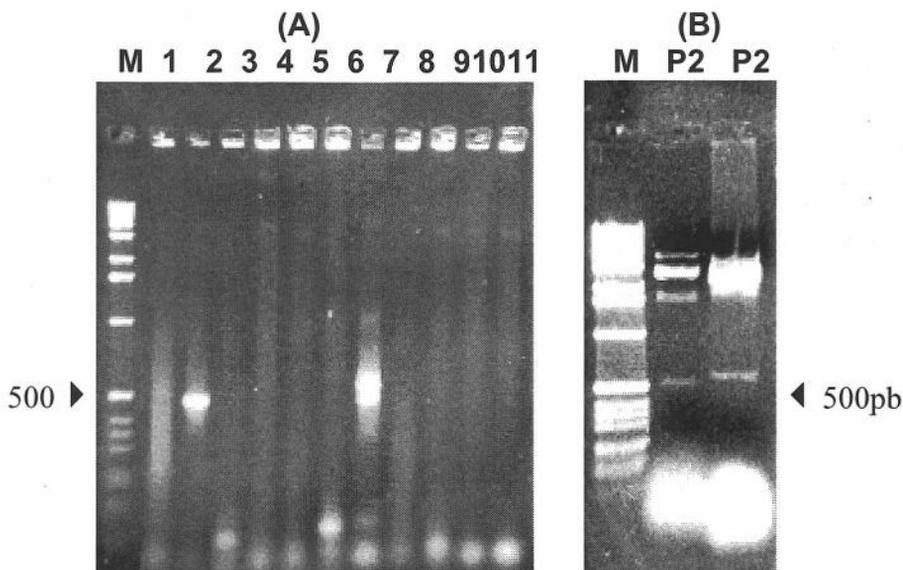


Figura 3. 6. Selección de clonas que contienen probablemente el fragmento del gen *hmg* de *B. orellana*. **A)** Amplificación con los oligonucleótidos A y C de las clonas positivas por selección en color. **B)** Purificación del plásmido de la clona 2 y digestión mostrando el inserto de 500 pb de la clona 2 con la enzima *Eco* RI presente dentro del polilinker de pCR2.1. M: marcador de peso molecular número X, 1-11: clonas analizadas, P2: clona 2 digerida con la enzima de restricción *Eco* RI.

```

CTTGATGCAATGGGTATGAACATGGTTTCCAAGGGAGTCCAGAACGTTTTTG 51
17  L D A M G M N M V S K G V Q N V L
GATTTCCCTTCAGAGTGATTTCCCTGACATGGATGTGATTGGTATCTCTGGT 102
34  D F L Q S D F P D M D V I G I S G
AAGTTGCACTTTGCATATTTTTCTTCATCATTTTTTATTTTTTTCTTTTTTC 153
AACTGGATCACTAAATTGAGGGATTTATGTTTTCA  GGAATTTCTGTTCT 203
39                                     G N F C S
GACAAGAAGCCAGCGGCTGTAAACTGGATTGAAGGACGGGGGAAGTCAGTT 254
56  D K K P A A V N W I E G R G K S V
GTCTGCGAGGCCATCATTAAAGGTGACGTGGTGAAGAAGGTCTTGAAGACT 305
73  V C E A I I K G D V V K K V L K T
AATGTAATGCTCTGGTGGAGCTTAACATGCTCAAGAACCCTACTGGTTCT 356
90  N V N A L V E L N M L K N P T G S
GCCATGGCAGGAGCTCTAGGTGGCTTCAATGCCCATGCCAGCAACATTGTT 407
107 A M A G A L G G F N A H A S N I V
ACTGCGATCTATATAGCTACTGGGCAAGATCCTGCTCAAATGTGGAGAGT 458
124 T A I Y I A T G Q D P A Q N V E S
TCTCACTGCATCACAATGATGGAGGCAGTGAACGAC 494
136 S H C I T M M E A V N D

```

Figura 3.7. Secuencia parcial obtenida del *hmg*. Los nucleótidos subrayados representan un intrón de 86 pb. La fila de abajo representa a los aminoácidos. Los números a la izquierda indican el número de aminoácidos, los números a la derecha indican el número de nucleótidos.

En general la similitud encontrada con los diversos genes de *hmg* clonados en plantas fue alta (Tabla 3.1). Sin embargo, al agrupar diversas secuencias de *hmg* seleccionadas de acuerdo a sus características, se observó que el *hmg* clonado de *B. orellana* posee mayor similitud (más de 90 %) con genes que funcionan dentro de las semillas o asociados con la producción de metabolitos secundarios (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Identidad a nivel de aminoácidos de diferentes HMGR de plantas con la HMGR de *B. orellana*. Se seleccionaron las secuencias de los genes reportados de los cuales se tiene más información y se agruparon de acuerdo a su función conocida en 5 grandes grupos. Se utilizó el programa BLAST 2, para realizar las comparaciones, los resultados se presentan como porcentaje de identidad de aminoácidos (la secuencia de aminoácidos resultante de la traducción de los genes). Se presentan con un asterisco, las isoformas que presentan más del 90 % de identidad de aminoácidos con respecto a la secuencia de la HMGR de *B. orellana*.

Especie	Nombre	No. accesión	Expresión	Función específica	Identidad (%)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Hmg2	M63642	Durante las etapas iniciales de maduración de los frutos, y órganos reproductores, algunas también responden como mecanismo de defensa.	Maduración del fruto	88
<i>Morus alba</i>	Hmg1	U43711		Flores, hojas	88
<i>Solanum tuberosum</i>	Hmg3	L01402		Pétalos y anteras	87
<i>Solanum tuberosum</i>	Hmg2	L01401	Principalmente defensa	Defensa	89
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hmg2	L19262		Defensa, esteroides	81
<i>Capsicum annuum</i>	Hmg2	AF110383		Defensa	88
<i>Oryza sativa</i>	Hmg1	U43961		Defensa	87
<i>Hevea brasiliensis</i>	Hmg3	M74800	Únicamente constitutivas, o inducidas por luz.	Constitutiva	87
<i>Triticum aestivum</i>	Hmg23	PQ0763		Constitutiva	84
<i>Catharanthus roseus</i>	Hmg1	M96068		Constitutiva	85
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Hmg1	X74783		Constitutiva, shikonina	86
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hmg1	J04537		Constitutiva	85
<i>Hevea brasiliensis</i>	Hmg1*	X54659	Asociada principalmente a metabolitos.	Hule, lactíferos	93
<i>Campotheca acuminata</i>	Hmg3*	U72145		Campotecina	91
<i>Gossypium hirsutum</i>	Hmg2*	AF038046	En las semillas	Semillas inmaduras, Gosypol	94
<i>Campotheca acuminata</i>	Hmg1*	L10390		Desarrollo de las semillas	90

La secuencia obtenida presenta un intrón de 86 pb. En otras plantas existen intrones de diferentes tamaños colocados en la misma región de la secuencia que codifica para la HMGR. En *O. sativa* existe un intrón que se inicia después del codón que codifica para el aminoácido glicina 314, con un tamaño de 513 pb, mientras que en *L. esculentum*, *H. brasiliensis* y *M. alba*, existen intrones de 201, 318 y 1015 pb respectivamente (Chye *et al.*, 1992; Nelson *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1992; Jain *et al.*, 2000) (Fig. 3.8).

```

HMGB1      1 -SSRFARLQGIKCS IAGKNLYIRFSCSTGDAMGMNMVSKGVQNVLEELQSDFS DMDVIGI
HMGB1      1 RSRFARLQGIKCAIAGKNLYMRFSCTGDAMGMNMVSKGVQNVLDYLDYQSDFPDMD IIGI
HMGB1      1 -SSRFARLQGVKCAVAGENLYMRFSCTGDAMGMNMVSKGVQNVLDYLDYQSDFPDMDVIGI
HMGB1      1 -SSRFARLQRIQCATAGKNLYMRLC CSTGDAMGMNMVSKGVQNVLDYLDYQSDFPDMDVIGI
HMGB1      1 -----I-DAMGMNMVSKGVQNVLDYLDYQSDFPDMDVIGI

HMGB1      60 SG-----//-----
HMGB1      61 SG-----//-----
HMGB1      60 SN-----//-----
HMGB1      60 SN-----//-----
HMGB1      33 SG-----//-----

HMGB1      61 ---FCSDKKPAAVNWIEGRGKSVVCEAIIKKEEVVKKVLKTNVSLVELNMLKNLGSAV
HMGB1      62 ---NFCSDKKPAAVNWIEGRGKSVVCEAVIKKEEVVKKVLKTNVDALVELNMLKNLGSAV
HMGB1      63 ---FCSDKKSAAVNWIEGRGKSVVCEAVIKKEEVVKKVLKTNVQSLVELNMLKNLGSAV
HMGB1      63 ---FCSDKKPAAVNWIEGRGKSVVCEAIIIEEVVKKVLKTEVAALVELNMLKNLGSAV
HMGB1      34 ---NFCSDKKPAAVNWIEGRGKSVVCEAIIKKEEVVKKVLKTNVSLVELNMLKNLGSAV

```

Figura 3.8. Alineamiento de secuencias de la HMGR de plantas. La secuencias de nucleótidos correspondientes a los aminoácidos (no mostradas) presenta un intrón después del codón que codifica para el aminoácido glicina, el cual es conservado entre todas las secuencias de HMGR analizadas. Los espaciadores indican la presencia de la secuencia de nucleótidos correspondiente al intron, el cual varía en tamaño de acuerdo a la secuencia analizada. HMGB1: Isoforma 1 de la HMGR de *Hevea brasiliensis*, HMGMA: HMGR de *Morus alba*, HMGOS: HMGR de *Oryza sativa*, HMGLS2: Isoforma 2 de la HMGR de *Lycopersicon esculentum*, HMGB0: HMGR de *Bixa orellana*.

Aislamiento de la secuencia parcial del gen *psy*

Usando los oligonucleótidos A y B, para el gen *psy* y las condiciones finales de amplificación descritas en la tabla 2.1, se obtuvo aparentemente una sola banda de 700 pb (Fig. 3.9A).

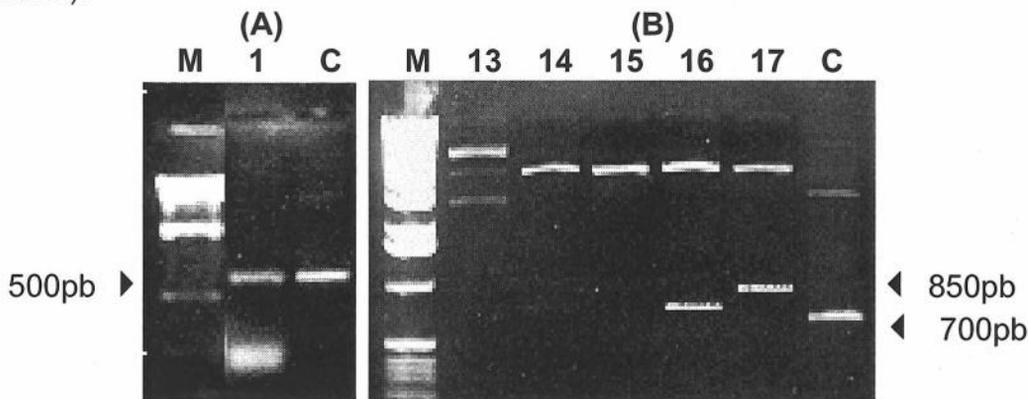


Figura 3.9. Amplificación y clonación del gen parcial del *psy* en *B. orellana*. **A)** Gel de agarosa al 1.2%, mostrando la amplificación del *psy* a partir del ADN genómico con condiciones de 94 °C de temperatura de desnaturalización, 60°C de temperatura de alineamiento, 72 °C de temperatura de extensión, 1.5 mM de MgCl₂ y 25 ciclos. (1) Amplificación a partir del ADN genómico, (C) Control de amplificación usando el plásmido con el *psy* de *Tagetes erecta*. **B)** Gel al 1.2% de agarosa mostrando las digestiones con *Eco* RI de los plásmidos aislados a partir de las clonas positivas. Se pueden observar dos posibles insertos de 700 y 850 pb presentes en las clonas P16 y P17. M: marcador de peso molecular (A: fago λ digerido con *Hind* III y *Bam* H1; B: marcador número X); 13: clona P13, 14: clona P14; 15: clona P15; 16: clona P16; 17: clona P17 y C: control de digestión del plásmido del *psy* de *T. erecta*.

El producto de PCR amplificado se insertó en el vector pCR2.1 como se describió en el capítulo 2. De las clonas seleccionadas se realizó la búsqueda de los fragmentos de interés por purificación de los plásmidos y digestión de sus insertos con la enzima de restricción *Eco* RI (Fig. 3.9B). Como resultado se obtuvieron dos insertos de 700 y 850 pb de las clonas p16 y p17 respectivamente, como se muestra en la figura 3.9B.

Las secuencias obtenidas demuestran que la clona P17 (557pb) no corresponde a un gen *psy*. Sin embargo, el reporte BLAST indica una pequeña similitud de esta con otras secuencias registradas en el banco de genes (Gen Bank EMBL), la mayoría de las cuales no tienen función conocida. Presenta pequeña similitud con la clona PAC de humano con 18 pb idénticos y función desconocida (NA: AC004843). Por otra parte, esta secuencia presenta diversos codones de interrupción de la transcripción en todos sus marcos de lectura, por lo que probablemente se trate de una secuencia no codificante.

La secuencia obtenida para la clona P16 (687 pb), se presenta en la figura 3.10 con su respectiva traducción a aminoácidos. La búsqueda de identidad de la secuencia usando el programa BLAST muestra una alta similitud con otros *psy* clonados de plantas y bacterias (Tabla 3.2). La secuencia obtenida representa un gran porcentaje del gene completo (80 %) así como la región catalítica de la enzima. Por otra parte el fragmento clonado no presenta intrones (Fig. 3.11).

```

ATTCCGCTTTGGGCGATATACGTTTGGTGTAGAAGAACTGATGAACCTGTG 51
17  I R L W A I Y V W C R R T D E L V
   GATGGCCAATGCTTCACATATAACTCCCATGGCTTTAGATAGATGGGAC 102
34  D G P N A S H I T P M A L D R W D
   GCAAGTTTGAAGATCTTTTCCGTGGTCGTCCTTTCGATATGCTTGAGCT 153
51  A R L E D L F R G R P F D M L D A
   GCTCTCGCTGATACAGTTGCTTGATACCCGGTCGATATCAGCCATTTCGA 204
68  A L A D T V A * Y P V D I Q P F R
   GACATGATCGAAGGAATGAGAATGGACTTGAAGAAATCGAGATACCAGAAC 255
85  D M I E G M R M D L K K S R Y Q N
   TTCGATGATCTATACCTTTACTGCTACTACGTCGCTGGAACCGCTCGGATTG 306
102 F D D L Y L Y C Y Y V A G T V G L
   ATGAGCGTTCCGGTTATGGGAATCGATCCTAAGTCGAAAGCAACAACGGAA 357
119 M S V P V M G I D P K S K A T T E
   AGTGTTTACAAACGCTGCCTTGGCCCTTGGTATAGCCAATCAGCTTACTAAC 408
136 S V Y N A A L A L G I A N Q L T N
   ATACTCAGAGCGTAGGCGAAGATGCGAGAAGAGGAAGGGTTTATCTGCCT 459
153 I L R D V G E D A R R G R V Y L P
   CAGGATGAATGGCTCAGGCTGGTCTTTTCAGATGAAGACATATTCGCCGGA 510
170 Q D E L A Q A G L S D E D I F A G
   AAAGTAACTGATAAATGGAGAACTTCATGAAAATGCAGCTTAAACGAGCA 561
187 K V T D K W R N F M K M Q L K R A
   AGAATGTTCTTCGACGAAGCTGAGAAAGCGTCAACCGAGCTCAGTGCCGCT 612
204 R M F F D E A E K G V T E L S A A
   AGCAGATGGCTGTATGGGCTTCATTGCTATTGTACAGGAGAATACTGAGAC 663
221 S R W P V W A S L L L Y R R I L D
   GAGATTGAGGCAAACGATTACAAC 687
229 E I E A N D Y N

```

Figura 3.10. Secuencia parcial obtenida del *psy* de *B. orellana*. Se presenta la secuencia obtenida del *psy* con su correspondiente traducción a aminoácidos. La fila de abajo corresponde a los aminoácidos. Los números a la izquierda indican el número de aminoácidos, los números a la derecha el número de nucleótidos. El asterisco el codón de terminación.

A pesar de que la secuencia clonada no presenta intrones y posee una alta homología con los diversos *psy* clonados, no es posible afirmar que se trate de un gen funcional ya que

presenta un codon de terminación dentro de su secuencia (Fig. 3.10), por lo anterior podría tratarse de un pseudogen como se discutirá más adelante en el capítulo 6.

Tabla 3.2. Comparación a nivel de aminoácidos de la PSY clonada de *B. orellana*, con respecto a regiones de secuencia similares de otras PSY de plantas. Se utilizó el programa BLAST 2, para realizar las comparaciones, los resultados se presentan como porcentaje de identidad. Como referencia se usan los números de accesión, ya que no todas las secuencias analizadas se han publicado.

Nombre	Especie	Identidad (%)	No. Accesión
Psy1	<i>P. pseudonarcissus</i>	76	X78814
Gtom5	<i>L. esculentum</i>	77	X60441
Psy2	<i>L. esculentum</i>	79	L23424
Psy1	<i>C. annuum</i>	79	X68017
Psy	<i>T. erecta</i>	86	AF158024
Psy	<i>D. carota</i>	73	AB032797
Psy	<i>A. thaliana</i>	86	L25812
Psy	<i>Z. mays</i>	74	U32636
Psy1	<i>C. melo</i>	77	Z37543
Psy1	<i>Citrus unshiu</i>	79	AF220218

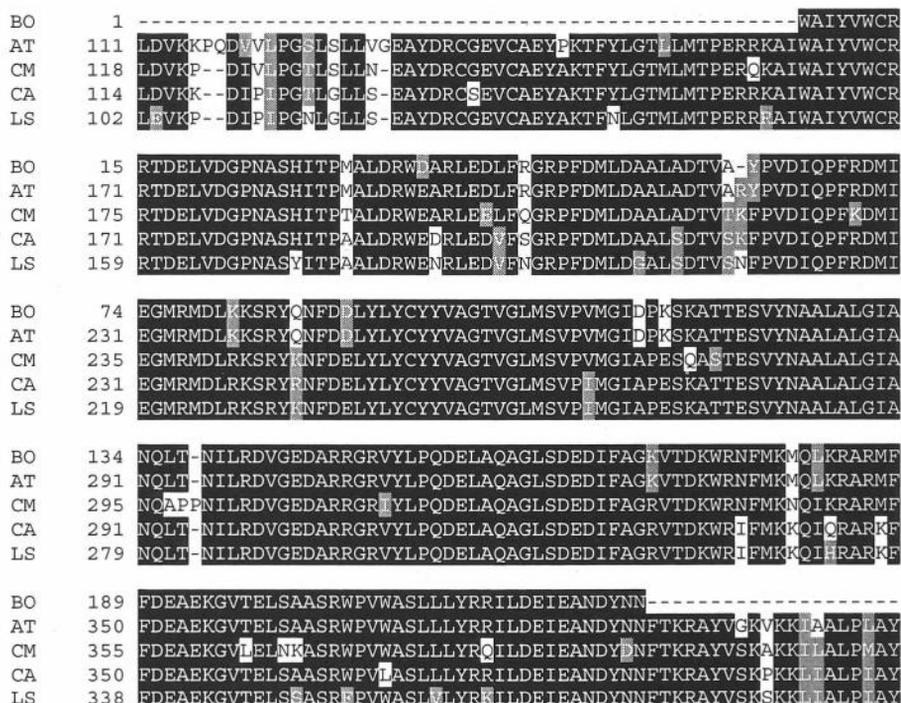


Figura 3.11. Alineamiento de secuencias de la PSY de *B. orellana* con otras secuencias de plantas. El sombreado negro muestra homología entre todas las secuencias analizadas, el sombreado gris muestra homología solo en algunas de las secuencias analizadas. El (-) simboliza el codón de terminación. BO: secuencia parcial de la PSY de *Bixa orellana* (NA:AF196963), AT: PSY de *Arabidopsis thaliana* (NA:L25812), CM: PSY de *Cucumis melo* (NA:Z37543), CM: PSY de *Capsicum annuum* (NA:X68017). LS: GTOM5 (PSY) de *Lycopersicon esculentum* (NA:M84744).

Clonación de productos de PCR amplificados con oligonucleótidos específicos para el gen *DXS*

Con el objetivo de clonar la secuencia parcial del gen *DXS* de *B. orellana* para que sirviera como sonda homóloga para los estudios de expresión, se usaron oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR secuencias similares a este gen. Estos oligonucleótidos fueron diseñadas a partir de la secuencia del *DXS* de *R. capsulatus* en el grupo de la Dra. Patricia León.

Se usaron los oligonucleótidos denominados RSF y RSR y las condiciones de amplificación descritas en la tabla 2.1. Con estas condiciones se obtuvieron tres bandas de 650pb, 1000pb y 1200pb en un gel de agarosa. La banda de 650pb presentó la mayor intensidad (Fig. 3.12A) y su tamaño concuerda con el tamaño obtenido en la secuencia del gen *CLA1* (*DXS*) de *A. thaliana* (Mandel *et al.*, 1996).

Los productos de PCR obtenidos se ligaron directamente (sin una purificación previa de la muestra) en el vector pBluescript II KS +/- y los plásmidos resultantes se usaron para transformar bacterias competentes de la cepa α DH5 como se describió en el capítulo 2.

Se purificaron los plásmidos de las clonas que presentaron cambios en sus coloración y se aislaron los insertos para contrastar sus tamaño y comparar con el de los productos de PCR amplificados previamente (Fig. 3.12B). Los resultados demuestran la presencia de dos insertos en las clonas seleccionadas, uno de los cuales posee 700 pb y es digerido internamente con *Eco*RI (datos no mostrados) para producir los dos fragmentos de 300 y 400 pb que se aprecian en el gel (Fig. 3.12B), el otro inserto corresponde a un fragmento de aproximadamente 800 pb sin sitio interno de corte con las enzimas usadas (Clona 22).

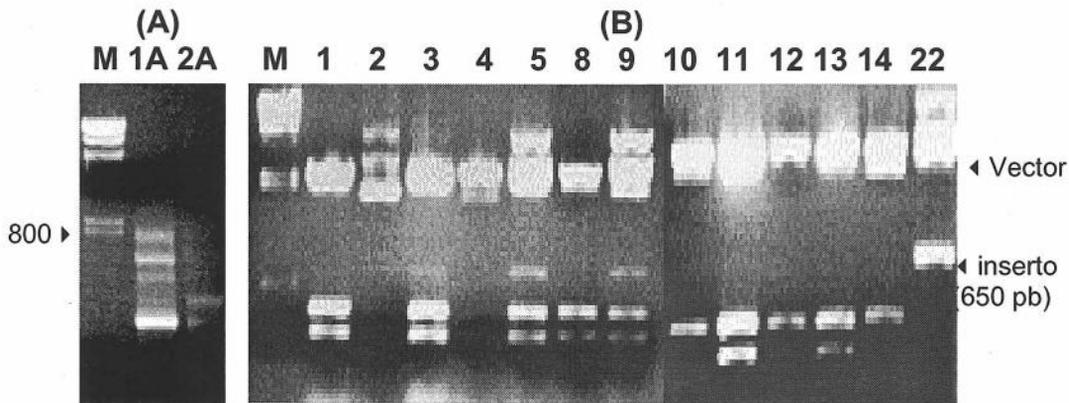


Figura 3.12. Amplificación y clonación de diversos productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos específicos para el *DXS*. Se amplificaron a partir del ADN genómico tres bandas con 58°C de temperatura de alineamiento, 35 ciclos y 1.5 mM de $MgCl_2$, empleando oligonucleótidos diseñados a partir del *DXS* de *Rhodobacter capsulatus*. **A)** Gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación a partir del ADN genómico de *B. orellana*, se observa una banda con mayor intensidad a 650 pb. **B)** Gel de agarosa mostrando la digestión con *Eco*RI y *Hind* III de las clonas seleccionadas por color. M: marcador de peso molecular (fago λ digerido con *Hind* III y *Bam* H1), 1A: amplificación a partir del ADN genómico, 2A: control positivo a partir del fragmento clonado para el *DXS* de maíz empleando los mismos oligonucleótidos (secuencia no publicada obtenida por el grupo de la Dra. Patricia León). (1-22): diversas clonas seleccionadas por color. La flecha indica la banda clonada con mayor intensidad a 800 pb.

Se escogió la clona 11 como representativa del primer inserto identificado. La secuencia de la clona 11 (143 pb secuenciadas), presentó pequeña similitud (19 pb idénticos) con el gen α -1 tubulina de *Volvox carteri* (no publicado), también posee pequeñas similitudes con otras secuencias reportadas dentro de la base de datos (HTLM) con funciones desconocidas, tales como una secuencia en humanos (NA:AP000689) y en el alga *Caenorhabditis elegans* (NA:Z81564.1). Sin embargo, al traducir la clona 11 se presentan codones de terminación en todos los marcos de lectura.

La secuencia de la clona 22 (472 pb) presentó pequeña similitud con otras secuencias en el banco mundial de genes, tiene 20 pb idénticas correspondientes con la secuencia del oligonucleótido *DXS* de *R. capsulatus* (NA:Z11165.1). Otras porciones de la secuencia clonada presentan pequeña similitud con el oncogen *c-jun* de humano (NA:J04111.1) con 18 pb idénticas. Al traducirse en todos los marcos de lectura se encuentran varios codones de terminación. Las pequeñas similitudes encontradas en estas secuencias, así como la presencia de codones de terminación, no permiten asignar ninguna función a estos productos de PCR clonados y de esta forma se concluye que no se tratan del gen *DXS*.

4. Evaluación de la expresión de mensajeros en diferentes tejidos de *B. orellana*

Análisis de la expresión de los mensajeros que codifican para la HMGR usando la técnica de dot blot

El análisis preliminar de la acumulación de mensajeros que codifican para la HMGR en diferentes etapas de maduración del fruto, en semillas, y en diferentes partes de la plántula, se realizó usando la técnica de dot blot aplicando 30 μ g de ARN total en la mayoría de los casos, la transferencia, hibridación y lavados se realizaron como se describió en el capítulo 2.

Al emplear como sonda a la región catalítica del *hmg* de *C. roseus*, se observó una expresión diferencial de los mensajeros de la HMGR durante el desarrollo de la flor y el fruto. Los mensajeros de la HMGR se acumulan principalmente en los tejidos del fruto y no en la semilla madura (Fig. 3.13A). La observación de que los frutos (que contienen semillas) acumulan una mayor cantidad de mensajeros para la HMGR con respecto a las semillas por si solas, planteo la interrogante de algún error experimental. Sin embargo, al aumentar la cantidad de ARN a 45 μ g para las semillas inmaduras la expresión aun se observaba baja (Figura 3.13 A y C, SM1). Lo anterior llevó a la consideración de que las semillas inmaduras (dentro de los frutos inmaduros) poseían acumulaciones de mensajeros para la HMGR diferentes a las semillas maduras, más aun esta acumulación podría ser mayor y por lo tanto incrementar la expresión de mensajeros en los tejidos de los frutos que las contienen, para contestar esta pregunta se realizó una comparación de expresión para la HMGR entre las semillas inmaduras y maduras empleando la sonda del *hmg* de *B. orellana*. El análisis reveló que los mensajeros se acumulan principalmente en las semillas inmaduras (Fig. 3.13C; SM2, SI). Con esta técnica se analizaron también las diferentes partes de la plántula como son; raíz, tallo y hoja usando como sonda al *hmg* de *B. orellana* (Fig. 3.13C). El análisis mostró que los mensajeros que codifican para la HMGR se expresan diferencialmente en los diferentes partes de la plántula y se acumulan principalmente en las hojas y raíces. Sin embargo, las diferencias observadas entre las cantidades de ARN dificultan éste análisis. La variación en la cantidad del ARN puede deberse al error en su cuantificación introducido por la contaminación con pigmentos y polisacáridos.

Los resultados preliminares obtenidos en este dot blot sugieren que los mensajeros que codifican para la HMGR se expresan diferencialmente en todos los tejidos analizados y presentan una mayor acumulación en el tejido de la semilla inmadura.

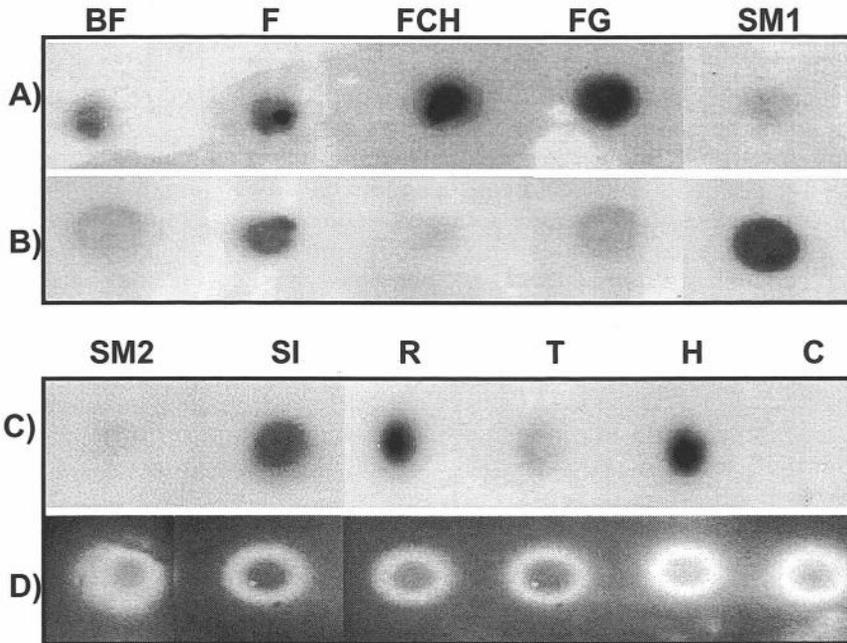


Figura 3.13. Análisis de la acumulación de los mensajeros que codifican para HMGR por dot blot. Se aplicaron 30 μg de ARN en la mayoría de los puntos como es descrito en el capítulo 2. Se observa la expresión diferencial de mensajeros para la HMGR en los tejidos seleccionados. **A)** Diferentes etapas de la maduración del fruto de *B. orellana*. **B)** Control con sonda ribosomal de *C. acuminata*. **C)** Diferentes etapas en la maduración de las semillas y tejidos de la plántula de *B. orellana*. **D)** Control de aplicación de ARN, por tinción con bromuro de etidio. Se aplicó un control de hibridación contra el ADN al incubar 30 μg de ARN total de hoja con ARNasa por 30 minutos antes de la aplicación. SM1: 45 μg de ARN para la semilla madura; SM1: 30 μg de ARN para la semilla madura; SI: semilla inmadura; BF: botón floral; F: flor; FCH: fruto chico; FG: fruto grande; R: raíz; T: tallo; H: hoja y C: ARN de hoja incubado treinta minutos con ARNasa.

Análisis de expresión de los mensajeros del *hmg* por northern blot

Se determinó realizar un análisis tipo northern blot para los tejidos seleccionados. El gel, la transferencia y el marcaje de la sonda se realizaron como se describió en el capítulo 2. En todos los casos se empleó la sonda del *hmg* de *B. orellana*.

Durante el desarrollo de este método se presentaron dos problemas que no se pudieron superar; 1) La sonda del *hmg* hibridó inespecíficamente aun bajo condiciones de alta astringencia (65 $^{\circ}\text{C}$ hibridación y 30 minutos de lavado adicionales con 0.1 X SSC, 0.1 X SDS) con los ARN ribosomales, lo cual interfiere con la determinación de sus mensajeros. 2) El ARN de ciertos tejidos al aplicarse en grandes cantidades (aproximadamente mayores a 5 μg) no corre bien en los geles desnaturalizantes, posiblemente por la contaminación de los metabolitos presentes y modifica la cantidad real del ARN disponible para la hibridación.

Se realizaron numerosos ensayos para el northern blot, con diferentes condiciones de hibridación, lavados, marcaje de la sonda y tiempo de exposición, en todos los casos se

detectó la presencia de una banda en las muestras correspondientes a las semillas inmaduras y frutos en una zona del gel donde también se resuelven los ARN ribosomales. Con las condiciones mencionadas en el capítulo 2, se lograron los mejores resultados pero solo fue posible la determinación de un mensajero de aproximadamente 2.5 kb de acuerdo a la localización de las subunidades 28 S y 18 S de los ARN ribosomales (datos no mostrados). La acumulación de este mensajero sugirió una expresión diferencial a través del desarrollo del fruto y se acumuló principalmente en los tejidos del fruto y semilla inmadura. Sin embargo, estos resultados se interpretaron con reserva, debido a los problemas anteriormente mencionado durante el desarrollo de este método, por lo anterior y para optimizar el método de evaluación de la acumulación de mensajeros se propuso el ensayo de protección contra ribonucleasas (RPA).

Análisis de expresión de los mensajeros del *hmg* por RPA

El ensayo de protección de ARN contra ribonucleasas (RPA) presenta ventajas con respecto a los northern blot, ya que permite analizar la expresión de mensajeros que se acumulan en pequeñas cantidades, es más específico para la sonda seleccionada y no es necesario aislar totalmente el ARN. Con este método se analizó el comportamiento de los mensajeros de la HMGR durante el desarrollo del botón floral, flor, fruto inmaduro, semillas inmaduras y semillas maduras. Los resultados sugieren que los mensajeros de la HMGR se expresan diferencialmente durante el desarrollo de la flor y el fruto, observándose un incremento gradual de la acumulación de mensajeros hasta la etapa de fruto inmaduro, teniendo su máxima acumulación en el tejido de la semilla inmadura, posteriormente se observó una ligera disminución de los mensajeros de la HMGR en la semilla madura (Fig. 3.14).

Análisis de expresión de los mensajeros del *psy* por northern blot

Se realizó el análisis de la expresión de mensajeros que codifican para la PSY en diferentes cultivos de callos, plántulas y órganos en la planta adulta, como son el fruto grande y las semillas.

Por los problemas anteriormente mencionados en el caso del northern blot para el gen *hmg*, se realizaron diversos ensayos de northern blot cambiando las condiciones de hibridación y lavados, para mejorar la hibridación y disminuir el fondo (datos no mostrados), sin embargo, los resultados no fueron claros, finalmente se optó por modificar el marcaje de la sonda (usualmente marcada con el método de random primer) y se empleó el sistema de transcripción *in vitro* MAXIscripTM *In Vitro* Transcription kits T7/T3 (Ambion), el cual incorpora más eficientemente ³²P a la sonda, ya que la marca se incorpora a lo largo de toda la secuencia, además la ribsonda obtenida facilita una hibridación ARN-ARN que es de naturaleza más estable con respecto a la hibridación ARN-ADN de la sonda generada con el método de random primer.

Como puede observarse en la figura 3.15, al cambiar el tipo de marcaje de la sonda es posible observar la presencia de un mensajero para el *psy*, el cual al parecer se expresa diferencialmente en todos los tejidos analizados y presenta un pico de expresión en el tejido de la semilla inmadura de forma similar a lo que sucede con el *hmg*. Sin embargo, los resultados deben interpretarse con reserva ya que la cantidad de ARN no es homogénea para todas las muestras debido que al aplicarse en volúmenes mayores a 5 µg, algunas

muestras no corren bien en los geles desnaturalizantes y se modifica la cantidad real del ARN disponible para la hibridación.

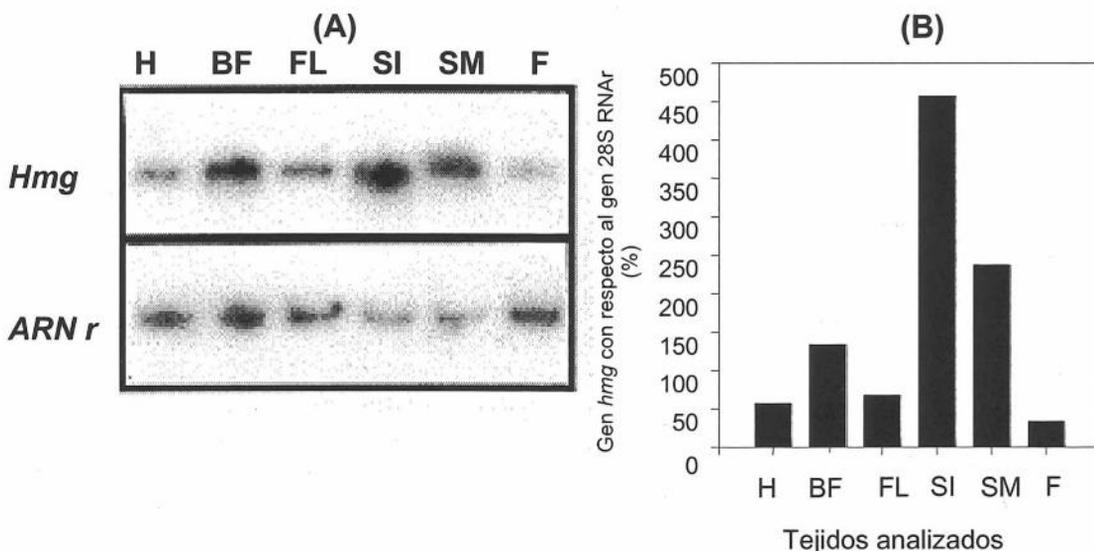


Figura 3.14. Expresión diferencial de los mensajeros del *hmg* por el método de RPA. Se hibridó el ARNm de diferentes órganos durante el desarrollo de la flor, fruto y semillas de *B. orellana* como se describió en el capítulo 2. **A)** Expresión de mensajeros del *hmg* por RPA. **B)** Gráfica mostrando el porcentaje de ARN protegido para el gen *hmg* con respecto al ARN protegido de la hibridación con la subunidad 28S ribosomal de *C. acuminata* como control. Los valores fueron normalizados a partir de su señal en el film usando el Bio-Image Analyzer GS25. H: hoja; BF: botón floral; FL: flor; SI: semilla inmadura; SM: semilla madura y F: fruto.

El tamaño del mensajero observado es de casi 2 kb (aparece debajo de la subunidad 18 S del ARN ribosomal) y su tamaño se ajusta al esperado de acuerdo a la literatura (Aggelis *et al.*, 1997; Buckner *et al.*, 1996; Römer *et al.*, 1993). Además de la expresión diferencial de este gen, puede observarse que algunos tejidos como la raíz y hoja y callos cafés del fruto, presentan una mayor acumulación de mensajeros, a pesar de la menor cantidad del ARN presente. Los resultados obtenidos solo permiten sugerir una expresión diferencial del gen *psy* durante el desarrollo del fruto y formación de semillas y una posible mayor acumulación de este mensajero en el órgano de la semilla madura. Se propone realizar un análisis de RPA como en el caso del gen *hmg* para confirmar los resultados.

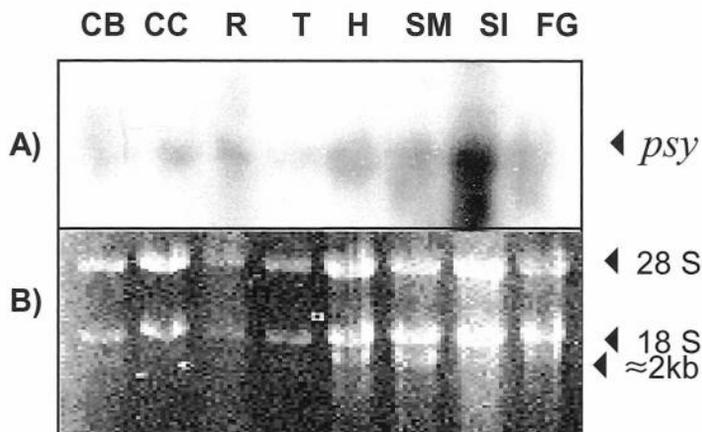


Figura 3.15. Acumulación de los mensajeros del *psy* en diferentes tejidos productores de pigmentos. Se aplicaron 20 μ g de ARN total de diferentes tejidos de *B. orellana* en un gel desnaturalizante de agarosa al 1 %. **A)** Expresión diferencial de un mensajero de aproximadamente 2 kb. **B)** Gel desnaturalizante de agarosa al 1 % mostrando las subunidades de ARN ribosomal y la localización del transcrito observado. Las subunidades 18 S y 28 S en plantas, poseen 2 kb y 4 kb respectivamente y son usadas comúnmente como marcadores de peso molecular en gels desnaturalizantes de ARN. CB: callo blanco; CC: callo café; R: raíz; T: tallo; H: hoja; SM: semilla madura; SI: semilla inmadura; FG: fruto grande. 28S y 18S: subunidades ribosomales.

5. Evaluación de la acumulación de pigmentos en *B. orellana*

Análisis de la cantidad de carotenoides en los tejidos seleccionados de *B. orellana*

Se analizó la acumulación de pigmentos en los diferentes tejidos seleccionados con el objetivo de caracterizar la acumulación de sus pigmentos, como se describe en el capítulo 2. La técnica para cuantificar carotenos y bixina fue desarrollada para usarse únicamente en las semillas donde estos compuestos constituyen un gran porcentaje del peso total (McKeown y Mark, 1962). Para analizar tejidos diferentes a la semilla primero se validó si la fórmula propuesta para cuantificar los carotenoides era adecuada para otros tejidos de la planta donde los carotenos no ocupan el mayor porcentaje de los metabolitos (3.16A).

Para esto se realizó un perfil espectrofotométrico de los carotenoides aislados en los tejidos de la planta adulta. El objetivo de este experimento fue determinar si la absorbancia a 500 nm en cloroformo representa únicamente a la bixina en el extracto total de carotenoides. Los resultados se presentan en la figura 3.16A, donde puede observarse el perfil espectrofotométrico característico de la bixina a 500 nm en el extracto de las semillas, dicho pico puede seguirse a esta absorbancia en otros tejidos de la planta adulta sin problemas, por lo tanto este método es adecuado para cuantificar la bixina en tejidos diferentes a la semilla.

Los resultados mostraron que la cantidad de carotenos totales y en particular de la bixina se modifican de acuerdo a los tejidos analizados. Puede observarse un aumento gradual de bixina a través del desarrollo del fruto sin que interfieran otros carotenoides presentes en esta lectura. Los perfiles espectrofotométricos entre el extracto de carotenoides de las semillas y la bixina purificada a partir de cromatografía en capa fina fueron similares (Fig. 3.16B).

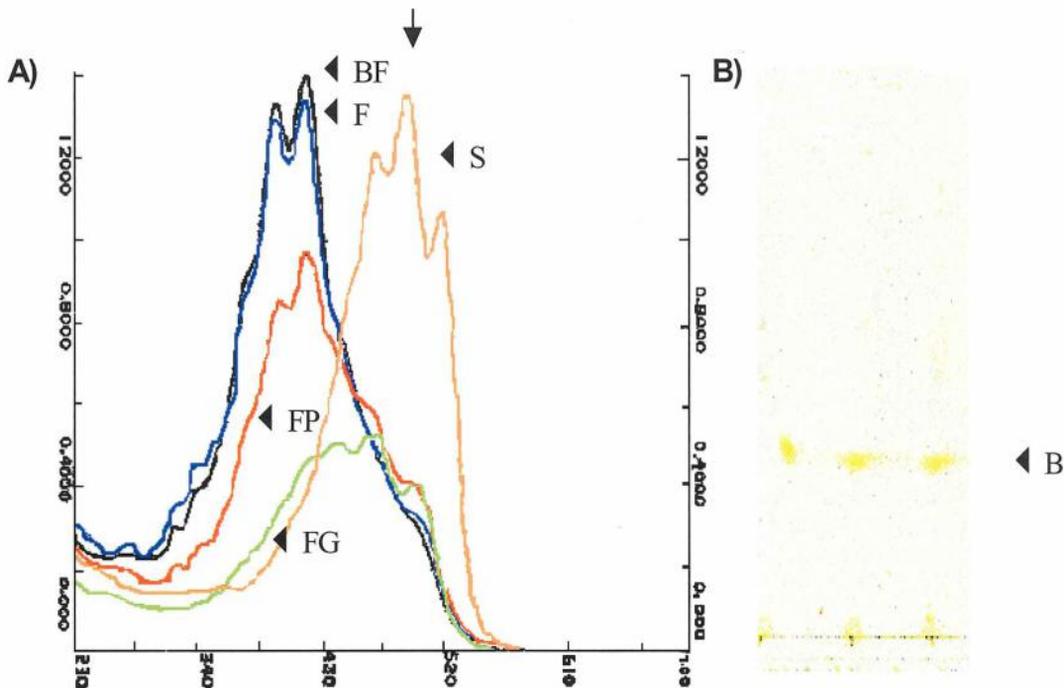


Figura 3.16. Cuantificación de bixina por método propuesto por McKeown y Mark (1962) en diferentes tejidos de la planta adulta de *B. orellana*. Se realizó la extracción de pigmentos carotenoides como se describe en el capítulo 2, posteriormente se realizó el perfil espectrofotométrico de los diferentes tejidos analizados. Se usó una muestra de bixina purificada a partir de la semilla por TLC (como se describió en el capítulo 2) como control. **A)** Perfil espectrofotométrico de los carotenoides aislados durante el desarrollo del fruto y semilla en *B. orellana*. **B)** Cromatografía en placa fina del extracto de pigmentos de la semilla antes de purificar la bixina. La flecha indica la zona donde se resuelve la bixina. BF: botón floral, F: flor, FP: fruto pequeño, FG: fruto grande, S: semilla, B: bixina.

Cuantificación de carotenos totales y bixina en todos los tejidos analizados de *B. orellana*

Se cuantificó la cantidad de carotenos totales y de bixina en los tejidos seleccionados para este estudio. La tabla 3.3 presenta el comportamiento de los carotenos totales y de bixina durante la maduración del fruto y formación de semillas. Se observa un incremento gradual de la bixina durante el desarrollo del fruto, alcanzando la mayor acumulación en la semilla madura (hasta con 12500 mg de bixina por Kg de tejido), estos valores son similares a los reportados en la literatura para este órgano (Mercadante *et al.*, 1996).

La acumulación de carotenos totales en los tejidos de la planta adulta posee un comportamiento diferente al de la bixina, aun cuando la máxima acumulación se observó también en la semilla madura (hasta con 16900 mg por kg de tejido). Ya que durante el desarrollo del fruto no se presentó un incremento gradual, de esta forma el porcentaje de bixina con respecto a los carotenos totales se incrementó hasta alcanzar el 74.4 % lo que es usual en las semillas maduras.

El análisis de la acumulación de carotenos en los diferentes cultivos *in vitro* seleccionados mostró que el tejido de la hoja es el que concentran la mayor cantidad de

carotenos totales (hasta con 10000 mg por Kg de tejido fresco). Sin embargo, los tejidos del tallo y los callos cafés también poseen altas cantidades. El comportamiento de la bixina fue similar al de los carotenos totales, y se acumula principalmente en los tejidos de la plántula y callos cafés, aun cuando en este último es menos abundante. Por otra parte los callos blancos provenientes de las hojas y tallo de la plántula poseen una pequeña cantidad de carotenos totales y bixina (142 mg.Kg⁻¹ y 9 mg.Kg⁻¹ respectivamente).

Tabla 3.3. Acumulación de los carotenoides totales y bixina durante la maduración de la flor, el fruto y diferentes tejidos *in vitro*. Se aislaron los carotenos totales y bixina como se describe en el capítulo 2, se realizó la determinación por espectrofotometría de acuerdo a la fórmula propuesta por McKeown y Mark (1962). El experimento se realizó por triplicado. BF: botón floral, F: flor, FI: fruto inmaduro. FM: fruto maduro, S: semillas, R: raíz, T: tallo, H: hoja, CB: callo blanco, CBC: callo blanco café y CF: callo café.

Tejidos	Carotenoides Totales (mg.Kg ⁻¹)	Bixina (mg.Kg ⁻¹)	Porcentaje de bixina (%)
BF	10920 ± 350	2480 ± 200	22.7
F	10320 ± 400	2080 ± 150	20.1
FI	7780 ± 470	2680 ± 180	34.4
FM	65310 ± 250	4010 ± 180	6.1
S	16900 ± 1700	12570 ± 800	74.4
R	449 ± 30.4 ^z	266 ± 43.2	59.2
T	6567 ± 186	4530 ± 162.4	68.9
H	10526 ± 251	4600 ± 188.9	43.7
CB	142 ± 21.6	9 ± 25.1	6.3
CBC	300 ± 48.2	141 ± 30.4	47.0
CC	635 ± 54.5	400 ± 46.7	62.9

Desarrollo del método de HPLC para separar los carotenos totales en los cultivos de callos de *B. orellana*

Con el objetivo de tener un protocolo de cuantificación por HPLC que permitiera analizar más específicamente los diferentes carotenoides de *B. orellana*, se ensayaron diversos protocolos en los cultivos de callos de *B. orellana*, optando finalmente por una modificación al método propuesto por Biacs y Daood (1994) para frutas y vegetales, como se reportó en el capítulo 2.

La figura 3.17 muestra el perfil característico de la corrida de HPLC para los callos cafés (del fruto), los callos blancos/cafés (del tallo), callos blancos (de la hoja), semillas maduras y bixina purificada de estas últimas como un control de su tiempo de salida. El tiempo de salida para la bixina purificada y para el pico mayoritario de las semillas fue de 5.95 min. Se observaron grandes diferencias entre los perfiles de HPLC de los callos con respecto a las semillas.

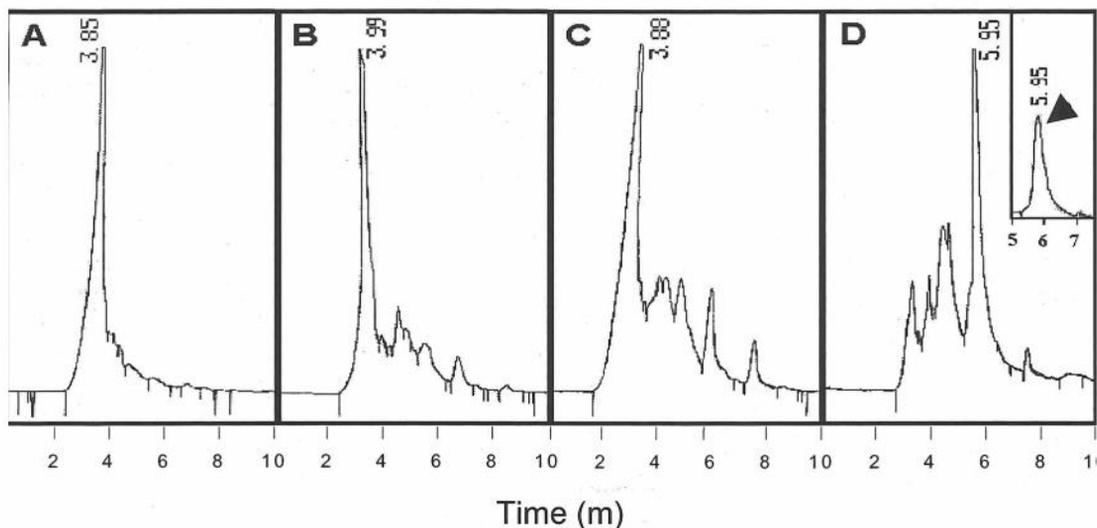


Fig. 3.17. Cromatogramas por HPLC de carotenoides en cultivos de callos de *B. orellana*. Los carotenoides se aislaron y las muestras se analizaron como se describe en el capítulo 2. Las muestras se coleccionaron de callos al día 30 de crecimiento. A: callos blancos, B: callos blancos cafés, C: callos cafés y D: semillas. La bixina purificada por TLC (dentro del recuadro) se usó como un control de su tiempo de salida. La flecha indica el pico de bixina. El eje de tiempo indica el tiempo exacto de retención.

6. Análisis de actividad enzimática de la HMGR

La actividad enzimática de la HMGR se analizó en los mismos tejidos que fueron utilizados durante el análisis previo de mensajeros para el gen *hmg* por el método de RPA. Se observó un incremento gradual de la actividad específica durante el desarrollo de la flor y el fruto. El tejido donde se observó la mayor actividad específica fue la semilla inmadura. El nivel de actividad de la HMGR en la semilla inmadura fue desde 3.6 veces más alto con respecto a las semillas maduras hasta 200 veces más alto con respecto a las hojas. El incremento de actividad enzimática de la HMGR se correlaciona con el incremento de la acumulación de mensajeros para el gen *hmg* (Tabla 3.4).

Table 3.4. Actividad enzimática y acumulación de mensajeros para la HMGR durante el desarrollo de la flor, el fruto y las semillas de *Bixa orellana*. La actividad enzimática se midió usando $[3-^{14}\text{C}]\text{-HMG-CoA}$ como un sustrato. La actividad específica de la HMGR fue determinada por medir la formación de $[^{14}\text{C}]\text{-mevalonato}$. Se realizaron tres replicas para cada tejido. La expresión del *hmg* se estimó usando un Bio-Image Analyzer GS25 (BioRad, Hercules CA).

Organo	Actividad específica (Pkat mg proteína ⁻¹)	Acumulación de mensajeros (CPM de HMGR relativas a 28S)
Semillas inmaduras	165.00	457.69
Semillas maduras	45.16	237.83
Flores	3.52	68.20
Botones florales	1.19	134.40
Frutos	1.46	34.32
Hojas	0.80	57.71

7. Análisis de southern blot del gen *hmg*

Con el objetivo de conocer si el gen *hmg* en esta planta es parte de una pequeña familia génica, se realizó un análisis tipo southern blot. El análisis confirmó la presencia de al menos 4 copias del gen *hmg* en *B. orellana*. El patrón de hibridación del ADN se presenta en la figura 3.18. Las enzimas de restricción usadas para el análisis cortan al ADN fuera de la secuencia reconocida por la sonda. Por lo tanto, la sonda podría reconocer únicamente un fragmento único en el ADN por gen, a menos que la secuencia genómica contenga algún sitio de corte para estas enzimas dentro de los intrones.

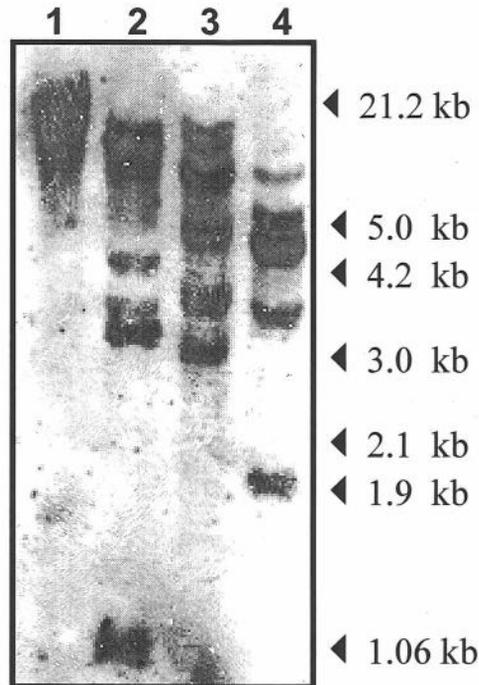


Figura 3.18. Análisis de southern blot en el ADN genómico de *B. orellana*. Se usó un fragmento del gen *hmg* clonado como sonda. Cada carril contiene 10 µg de ADN genómico. 1: ADN no digerido, 2: ADN digerido con *EcoRV*, 3: ADN digerido con *BamHI* y 4: ADN digerido con *HindIII*.

BIBLIOGRAFIA

- Aggelis A, John I, Karvouni Z, Grieson D (1997)** Characterization of two cDNA clones for mRNA. expressed during ripening of melon (*Cucumis melo* L.) fruits. *Plant Mol. Biol.* 33:313-322.
- Altschul A, Stephen F, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

- Biacs P, Daood H** (1994) High-performance liquid chromatography with photodiodearray detection of carotenoids and carotinoid esters in fruits and vegetabales. *J. Plant Physiol.* 143:520-525.
- Buckner B, San Miguel P, Janick-Buckner J, Bennetzen J** (1996) The *yi* gene of maize codes for phytoene synthase. *Genetics* 143:479-488.
- Castillo F** (1998) Establecimiento de cultivos de callos a partir de cortes del fruto de *Bixa orellana* L. Tesis de Licenciatura. UADY. Mérida Yucatán p:57.
- Chomczynski P, Sacchi N** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Chye M, Chio-Tee T, Nam-Hai C** (1992) Three genes encode 3-hydroxy-3- methylglutaryl CoA reductase in *Hevea brasiliensis*: *hmg1* and *hmg3* are differentially expressed. *Plant Mol. Biol.* 19:473-484.
- De Vries S, Hoge H, Biseeing T** (1988) Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. *Plant Mol. Biol. Manual B6*: 64-71.
- Herrera V** (1998). Inducción de callos a partir de tallo y hojas de plántulas de *Bixa orellana*. Tesis de Licenciatura. UADY. Mérida Yucatán p:78.
- Jain AK, Vicent RM, Nessler CL** (2000) Molecular characterization of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene from mulberry (*Morus alba* L.). *Plant Mol. Biol.* 42:559-569.
- López-Gómez R, Gómez-Lim MA** (1992) A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using mango mesocarp. *HortScience* 27:440-442.
- Mandel A, Feldman K, Herrera-Estrella L, Rocha-Sosa M, León P** (1996) *CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.* 9: 649-658.
- McKeown G, Mark E** (1962) Paper chromatography of bixin and related compounds. *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists.* 45:761-766.
- Mercadante A, Steck A, Rodriguez-Amaya D, Pfander H, Britton G** (1996) Isolation of methyl 9'-Z-apo-6'-lycopenoate from *Bixa orellana*. *Phytochemistry* 41:1201-1203
- Nelson A, Doerner P, Zhu Q, Lamb C** (1994) Isolation of a monocot 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene that is elicitor inducible. *Plant Mol. Biol.* 25: 401-412.
- Park H, Denbow C, Cramer C** (1992) Structure and nucleotide sequence of tomato *hmg2* encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase. *Plant Mol. Biol.* 20:327-331.
- Römer S, Hugueney P, Bouvier F, Camara B, Kuntz M** (1993) Expression of the genes encoding the early carotenoids biosynthetic enzymes in *Capsicum annum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1414-1421.
- Schuler M, Zielinski R** (1989) RNA isolation from light-and dark-grown seedlings. In: *Methods in Plant Molecular Biology.* (M. Shuler, R. Zielinski eds.) Academic Press, Inc. USA. pp:89-96.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Discusión

1. *Bixa orellana* como un modelo para el estudio de la ruta biosintética de los carotenoides

La importancia económica de *Bixa orellana* así como la gran acumulación de pigmentos carotenoides en sus semillas hacen necesario e interesante el estudio de la biosíntesis de dichos pigmentos. Este trabajo tuvo como objetivo principal iniciar y establecer metodologías para el estudio de la biosíntesis de carotenoides a nivel molecular en *B. orellana*. Para lograr esto fue necesario caracterizar diferentes etapas de desarrollo a lo largo de la maduración de las flores, frutos, formación de semillas y diferentes líneas de cultivos *in vitro* con diversos contenidos de carotenoides. La caracterización se realizó a nivel de la acumulación de pigmentos, extracción de ácidos nucleicos, proteínas y expresión de los mensajeros que codifican para las enzimas HMGR y PSY.

Se establecieron protocolos para la extracción y la cuantificación de pigmentos (Tabla 3.3), para la extracción de ácidos nucleicos (Fig. 3.4), para el análisis de la expresión de mensajeros (Fig. 3.13; 3.14; 3.15) y se obtuvieron sondas de genes involucrados en la biosíntesis de isoprenoides (Fig. 3.7; 3.11).

Los cultivos *in vitro* utilizados provienen de diferentes partes de la plántula y diferentes líneas de callos con diferentes acumulaciones de carotenoides. Los diferentes órganos de la plántula producen carotenoides y bixina, además tienen buenos rendimientos de ADN, ARN y proteínas (resultados no mostrados). Esto nos permite estudiar la regulación de los genes involucrados en la producción de dichos compuestos.

Los callos obtenidos en nuestro grupo permitieron el análisis subsecuente del gen *psy*, así como la aplicación de una metodología para separar carotenoides por HPLC en estos tejidos. Hasta ahora no existen trabajos publicados sobre la aplicación de las metodologías propuestas en este estudio para cultivos *in vitro* y órganos de planta adulta en *B. orellana*.

2. Extracción de ARN total

Para el establecimiento de un protocolo de extracción eficiente de ARN en *B. orellana*, fue necesario probar diversas metodologías generadas para plantas que acumulan metabolitos secundarios. La extracción del ARN de este tipo de plantas es un proceso complicado, ya que los polisacáridos presentes interfieren con su pureza y calidad (López-Gómez y Gómez-Lim, 1992). Las metodologías analizadas en este trabajo no resultan en ARN con buen rendimiento y calidad en *B. orellana*, ya que al parecer la cantidad de polisacáridos y carotenoides presentes en los diferentes órganos de la planta adulta interfieren con el ARN aislado.

Con el método propuesto por López-Gómez y Gómez-Lim (1992) solo es posible extraer ARN de los cultivos *in vitro* y éste se encuentra frecuentemente degradado, posiblemente por que en este método no se emplean lavados subsecuentes con fenol y esto no permite eliminar el exceso de polisacáridos presentes en los tejidos de la planta adulta.

Con el método propuesto por De Vries *et al.* (1988) solo es posible extraer ARN de algunos tejidos y éste se encuentra contaminado con polisacáridos y ADN (Fig. 3.2). Las frecuentes degradaciones encontradas en las muestras durante este método se deben a la naturaleza del fenol empleado, el cual no se encontraba equilibrado y la contaminación con ADN se debe a que no se usa ninguna etapa de precipitación selectiva de ARN. Con el método propuesto por Schuler y Zielinski (1989) es posible obtener ARN de los cultivos *in vitro*, pero no de los órganos de la planta adulta (Fig. 3.3), esto se debe a la naturaleza del amortiguador de extracción, el cual se emplea en bajos volúmenes y a temperatura ambiente. Una alternativa ensayada fue escalar el método. Sin embargo, esto ocasionó un aumento en la viscosidad de la muestra, en todo caso, para separar al ARN de la viscosidad es necesario aumentar la temperatura del amortiguador a 80 °C y para asegurar la integridad de los ácidos nucleicos en esta temperatura se equilibró el pH del amortiguador.

La metodología propuesta durante este trabajo (capítulo 2) incluye una extracción con fenol caliente, esto permite liberar una mayor cantidad de ácidos nucleicos de la matriz de polisacáridos donde se encuentran inmersos, provocando un mayor rendimiento de ARN. Sin embargo, esta etapa de extracción presenta varios inconvenientes, ya que el fenol es perjudicial para realizar cualquier reacción enzimática posterior en el ARN, por lo que es necesario eliminarlo completamente, esto se logró mediante la incorporación de precipitaciones subsecuentes con etanol y NaCl como propone De Vries *et al.* (1988).

Otro problema presentado durante la extracción de ARN es la contaminación por ADN, esto se solucionó usando una precipitación selectiva para el ARN con urea y LiCl₂ como propone Schuler y Zielinski (1989).

Finalmente, las pastillas obtenidas de ARN presentaban ligeras coloraciones con pigmentos, según el tipo de tejido de donde fueron aisladas. Sin embargo, esta contaminación no interfiere con el uso del ARN para los estudios de expresión, pero sí afecta la síntesis de ADNc. Por lo anterior se agregó al método una resuspensión final del ARN en alcohol al 20 %, y un lavado con un volumen de F:Cl:Al (50:49:1), lo que elimina el remanente de polisacáridos y pigmentos. Un indicador de la pureza del ARN aislado con este método es su empleo con éxito en la síntesis de ADNc.

El método desarrollado durante este trabajo permite extraer ARN de la mayoría de los órganos analizados, con altos rendimientos, con buena calidad, libre de polisacáridos y ADN (Fig. 3.4). El órgano del cual se obtuvo el mayor rendimiento fue la hoja de la plántula hasta con 300 µg por gramo de tejido. Los cultivos de callos también presentaron buenos rendimientos.

3. Clonación de las secuencias parciales de los genes de interés

Secuencia parcial del *hmg*

La secuencia parcial del *hmg* de *B. orellana* corresponde a la región catalítica de esta enzima, su comparación con otras secuencias de *hmg* de plantas muestra una alta similitud (entre un 80 y 94 % de identidad a nivel de aminoácidos) (Tabla 3.1).

Durante el análisis de los resultados se agruparon las secuencias de acuerdo a su función conocida, encontrándose que la identidad alcanzada del *hmg* de *B. orellana* a nivel de aminoácidos es mayor con genes de *hmg* asociados a metabolitos específicos o que son expresados durante el desarrollo de las semillas. Un ejemplo sobre las diferencias encontradas entre la identidad del *hmg* de *B. orellana* con respecto a diferentes *hmg* de plantas, se observó en *H. brasiliensis* donde la identidad encontrada con respecto al *hmg1*

de esta planta es de 94%. Se ha reportado que este gen está asociado principalmente con la producción de hule, expresándose de forma abundante en los laticíferos, por lo contrario el gen *hmg3* de esta planta muestra un 87% de identidad, este gen se reporta como constitutivo y con una baja expresión en todos los tejidos analizados (Chye *et al.*, 1991; 1992).

Por otra parte, los resultados obtenidos al comparar el gen *hmg* de *B. orellana* con respecto a otros *hmg* asociados a semillas inmaduras, muestran que las identidades alcanzadas con estos genes son muy altas. Por ejemplo, la identidad alcanzada con el *hmg2* de *G. hirsutum* fue de 94%, la máxima identidad alcanzada en este estudio, este gen está asociado a la producción del gosispol, un isoprenoide sesquiterpeno que se acumula en pequeñas glándulas de las semillas inmaduras (Lougercio *et al.*, 1999). La expresión del *hmg2* de *G. hirsutum* es similar al encontrado para el *hmg* de *B. orellana*, de hecho ambos genes están asociados con la producción de metabolitos específicos en sus semillas. Es posible que el primer *hmg* encontrado en *B. orellana* se trate de un gen tejido específico, particular de la semilla.

Otro aspecto de interés fue la conservación de los intrones entre los diferentes *hmg* de plantas. En el *hmg* de *B. orellana* se presentó un intrón de 86 pb insertado después del codón que codifica para el aminoácido glicina (314) de acuerdo a la secuencia del *hmg* de arroz. El tamaño del intrón varía entre las diferentes plantas analizadas, en *O. sativa* es de 513 pb, en *L. esculentum* es de 201, en *M. alba* es de 477pb y en *H. brasiliensis* es de 318 pb (Chye *et al.*, 1991, Nelson *et al.*, 1994, Park *et al.*, 1992; Jain *et al.*, 2000) (Fig. 3.8).

Secuencia parcial del *psy*

La secuencia parcial obtenida para el *psy* de *B. orellana* fue de 705 pb, lo que corresponde al 80 % del ADNc esperado de acuerdo a otros *psy* de plantas. La secuencia clonada se tradujo correctamente en el marco de lectura (-3) utilizando el programa CLUSTALW (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multialign>), el cual es capaz de traducir cualquier secuencia en sus 6 marcos de lectura e indicar la presencia de codones de terminación. La secuencia del gen *psy* de *B. orellana*, no presentó intrones y además posee una alta identidad a nivel de aminoácidos con las secuencias reportadas de otros *psy* de plantas (entre 73 y 86 %). (Tabla 3.2).

Caso del pseudogen para el *psy*

Una característica de la secuencia clonada del *psy*, es la presencia de un codón de terminación (TGA) después del codón que codifica para la arginina (56). Las posibilidades de error en la lectura de la secuencia ó bien la posible introducción de cambios a nivel de nucleótidos son pequeñas, ya que la secuenciación se repitió dos veces a partir de diferentes extracciones de plásmidos y cuando se realizó la ligación y clonación del producto de PCR, este nunca se expuso directamente a la luz ultravioleta.

La localización de este codón de terminación se presentó a nivel de la secuencia que codifica para un aminoácido poco conservado entre las PSY de plantas (Fig. 3.12). La presencia del codón de terminación le confirió a este gen *psy* una posible característica de pseudogen. La presencia de pseudogenes en la naturaleza es un fenómeno común y se definen como secuencias inactivas pero estables del genoma derivadas de mutaciones de un gen ancestral activo. De hecho, se piensa que son productos aun no eliminados a lo largo de la evolución (Vanin, 1985).

La presencia de otros pseudogenes para el *psy* en plantas solo se ha reportado para *L. esculentum* donde se identificó al ψ *psy* (X60440) (Ray *et al.*, 1992). En el caso de *B. orellana*, la presencia de un pseudogen propone por lo menos la presencia de otra copia activa del *psy* en su genoma, por lo que el *psy* en esta planta podría ser codificado por una pequeña familia génica, característica que ya se ha reportado anteriormente en *L. esculentum* (Bartley y Scolink, 1993).

Secuencias clonadas con los oligonucleótidos específicos para el *DXS*

Las secuencias analizadas con los oligonucleótidos específicos para el *DXS*, no presentaron similitud con ninguna secuencia de función conocida dentro de la base de datos (HTLM), posiblemente debido a que los oligonucleótidos empleados fueron diseñados a partir de la secuencia de un gen *DXS* de bacterias y no presentaron degeneración.

4. Análisis de expresión

Expresión del *hmg* durante el desarrollo de la flor, el fruto y formación de semillas en *B. orellana*

Durante el presente trabajo se usaron diversas metodologías para realizar estudios sobre la expresión de los mensajeros. Para el caso del gen *hmg* los resultados fueron similares entre las metodologías de dot blot y northern blot ensayadas, sin embargo, la hibridación inespecífica observada de la sonda de *hmg* con los ARN ribosomales en los geles desnaturalizantes interfirió con su análisis. Por lo anterior se realizó el análisis de RPA en el cual no existen problemas de hibridación inespecífica con los ARN ribosomales. Los resultados finales del RPA muestran una clara expresión diferencial del *hmg* durante el desarrollo de la flor, la maduración del fruto y la formación de las semillas (Fig. 3.17), la máxima expresión se observó en la semilla inmadura, dichos resultados coincidieron con los resultados del estudio de actividad enzimática para la HMGR (Tabla 3.4). La mayor acumulación de mensajeros y la mayor actividad coincidieron en el tejido de la semilla inmadura, un tejido donde se llevan a cabo fuertes cambios metabólicos. Se han realizado estudios previos para tratar de encontrar una relación entre actividad y expresión de la HMGR con la síntesis de algunos isoprenoides involucrados en el metabolismo de las plantas (Chappell *et al.* 1995; Re *et al.*, 1995).

Al descubrirse la ruta alternativa para la formación del IPP en los plástidos de las plantas (ruta del MEP) (Lichtenthaler *et al.*, 1997), se cuestionó la importancia del papel que desempeña la HMGR para la síntesis de los isoprenoides cloroplásticos, ya que los carotenos y otros metabolitos se producen dentro de los plástidos (Lichtenthaler, 1999). Las últimas publicaciones asumen que la HMGR en la ruta del mevalonato está restringida a la producción de sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos en el citoplasma (Lichtenthaler, 1999). Algunas de los anteriores compuestos como los esteroides en el citoplasma están involucrados en procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento de las plantas, ya que actúan como precursores de membrana (Bach, 1990).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la expresión y actividad de la HMGR podrían estar asociados con procesos involucrados en la formación de semillas de *B. orellana*.

Diversos reportes en la literatura también muestran relación entre la HMGR con el crecimiento y desarrollo de diferentes tejidos de plantas. Por ejemplo, en aguacate (*Persa*

americana) se observó que la mevastatina, un inhibidor específico de la HMGR detuvo el desarrollo del fruto y la posterior adición de mevalonato restableció este proceso (Cowan *et al.*, 1997). En *L. esculentum*, la mevinolina otro inhibidor específico de la HMGR también detuvo el desarrollo del fruto pero no la acumulación de carotenoides (Rodríguez-Concepción y Gruissem, 1999). En tomate el *hmg1* se expresó durante el crecimiento y proliferación celular de los meristemas y frutos jóvenes (Jelesko *et al.*, 1999). La aplicación externa de mevinolina a cultivos celulares de *Helianthus tuberosus* también inhibió su crecimiento (Ceccarelli y Lorenzi, 1984).

Para el caso específico de formación de semillas, en maíz (*Z. mays*) se observó un incremento de la actividad enzimática de la HMGR asociado al desarrollo de semillas y germinación de plántulas. En este trabajo, la actividad máxima de la HMGR también se encontró en las semillas inmaduras (Moore y Oishi, 1993). Estos autores puntualizan la importancia de la HMGR durante el desarrollo de los embriones. Otros trabajos también reportan la importancia de la HMGR durante el desarrollo del embrión. Por ejemplo, en cultivos embriogénicos de zanahoria la adición de mevinolina reduce su capacidad embriogénica (Tsung-Hesien *et al.*, 1987). En el algodón (*G. hirsutum*), la acumulación máxima de mensajeros para el *hmg2* se observó durante el desarrollo del embrión y acumulación de un isoprenoide, el gopipol (Loguercio *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre la expresión de los mensajeros y actividad enzimática de la HMGR durante el desarrollo de las semillas señalan que el *hmg* clonado de *B. orellana* podría codificar para un gen relacionado con la formación del embrión en las semillas.

Possible regulación transcripcional del *hmg* en *B. orellana*

El análisis de la acumulación de mensajeros del *hmg* obtenidos de los experimentos de RPA en conjunto con los resultados de su actividad enzimática durante el desarrollo de la flor y el fruto en *B. orellana*, revelan una posible regulación transcripcional como mecanismo de control (Tabla 3.4). Sin embargo, deben existir otros tipos de regulación para esta enzima, ya que el órgano de la flor, presentó solo una pequeña acumulación de mensajeros con respecto a la actividad enzimática. La forma en que se regula la expresión y actividad de la HMGR en plantas es un tema muy interesante y motivo de muchos estudios. En el caso de la regulación transcripcional existen algunos trabajos publicados en plantas (Narita y Gruissem 1989; Choi *et al.*, 1992; Chye *et al.*, 1992; Learned y Conolly, 1997). Al parecer la actividad de la HMGR es regulada durante el crecimiento y desarrollo de diversos tejidos en las plantas y el hecho de que esta enzima sea tan regulada conserva la hipótesis de su relevancia en el desarrollo de las plantas.

La HMGR de *Bixa orellana* es codificada por una familia génica

El análisis de southern blot sugirió que el gen *hmg* es codificado por una pequeña familia de genes con 4 posibles copias en *B. orellana* (Fig. 3.18). Se ha reportado resultados similares para casi todas las plantas analizadas (Bach, 1995) con un rango de copias que va desde 2 genes en *A. thaliana* (Enjuntó *et al.*, 1994; Learned y Fink, 1989) hasta 8 genes en *S. tuberosum* (Choi *et al.*, 1992). El número de copias del gen *hmg* reportado en *B. orellana* aunado a sus altos niveles de expresión, así como a su elevada actividad enzimática son evidencias de su importancia dentro de la fisiología de la planta.

Expresión del *psy* durante el desarrollo del fruto y formación de semillas en *B. orellana*

Se realizaron diversas pruebas de northern blot con diferentes condiciones para evaluar la expresión del gen *psy*, pero los resultados fueron poco claros. Como se mencionó anteriormente con este método se presentaron problemas con la aplicación del ARN en el gel y en general cuando la sonda era marcada por el método de random primer, se observó una hibridación inespecífica con más de una banda.

Al realizar northern blots en condiciones de hibridación y lavados con alta astringencia (65 °C hibridación y 30 minutos de lavado con 0.1 X SSC, 0.1 X SDS) se mantuvo la inespecificidad observada, por lo que se decidió cambiar el tipo de protocolo para marcar la sonda, el método usado fue sintetizar una ribosonda para tener un incremento de especificidad debido a la naturaleza del enlace RNA-RNA presente como se describió anteriormente.

La ribosonda para el *psy* se sintetizó con el sistema MAXIscript *in vitro* Transcription T7/T3 (Ambion, Austin TX), con esta modificación fue posible observar la presencia de un solo transcrito de aproximadamente 2 kb, el tamaño esperado para el gen *psy* según los reportes publicados en otras plantas (Römer *et al.*, 1993) (Fig. 3.17).

La acumulación de mensajeros para el *psy* al parecer presenta una expresión diferencial durante el desarrollo del fruto con un máximo de expresión en la semilla inmadura, el órgano donde se acumula la mayor cantidad de pigmentos carotenoides en esta planta. Sin embargo, estos resultados deben tomarse con cautela debido a las diferencias en la cantidad de ARN disponible para la hibridación en cada muestra. La expresión diferencial de mensajeros para la PSY durante la maduración del fruto se ha observado en plantas como; *L. esculentum*, *C. annuum* y *C. melo*. La expresión y actividad de esta enzima está asociada con la acumulación de pigmentos en los cromoplastos de los frutos (Bartley y Scolink, 1993; Karvouni *et al.*, 1995; Römer *et al.*, 1993; Shewmaker *et al.*, 1999). Por otra parte, la expresión del *psy* en *B. orellana* podría tratarse de un fenómeno más complejo, ya que el *psy* además de estar involucrado en la acumulación de pigmentos durante la maduración del fruto y en la fotosíntesis, también podría estar relacionado con la acumulación de bixina en el arilo de las semillas. La expresión diferencial del *psy* durante la acumulación de pigmentos específicos se ha reportado en *L. esculentum*, donde la expresión diferencial del *psy1* ocurre durante la acumulación de licopeno en el desarrollo del fruto.

Existen también otros ejemplos de *psy* asociados con procesos de desarrollo particulares como órganos y etapas de desarrollo anteriores a la maduración del fruto, de esta forma en *N. pseudonarcissus* se observó un incremento de la expresión de el *psy* durante la formación de la flor (Scludz *et al.*, 1996) y en *L. esculentum* se ha demostrado que el gen *psy2*, está activo en hojas y durante las etapas iniciales de desarrollo del fruto (Fraser *et al.*, 1999; Fray y Grierson, 1993)

La presencia de un posible pseudogen indica la existencia de otros posibles genes del *psy* con diferentes funciones en esta planta. La codificación del *psy* por parte de una pequeña familia génica en plantas ha sido demostrado para los casos de *L. esculentum* con los genes *psy1* y *psy2* (Fraser *et al.*, 1994) y en *C. melo* donde se detectó la presencia de dos o más copias del *psy* (Karvouni *et al.*, 1995). En tomate se ha planteado que la presencia de diversos isogenes del gen *psy* es debido a que se necesitan carotenoides de forma permanente para los complejos fotosintéticos en los tejidos verdes y carotenoides

específicos (como el licopeno) durante la maduración del fruto (Fraser *et al.*, 1994). Por lo anterior, se puede proponer que el *psy* en *B. orellana* puede ser parte de una pequeña familia génica y que al menos un isogene esté asociado a la acumulación de bixina en sus semillas. Se necesitan realizar más estudios en este sentido con el fin de contestar esta pregunta, ya que el conocimiento sobre la forma en que se regula la síntesis de bixina en esta planta es necesario para cualquier estudio enfocado a su mejoramiento genético.

5. Acumulación de carotenoides en *B. orellana*

Análisis de carotenoides y bixina durante el desarrollo de la flor, el fruto, semillas y cultivos *in vitro* de *B. orellana*

Los órganos de la planta adulta analizados demuestran un claro incremento de la acumulación de carotenoides, principalmente bixina, durante el desarrollo del fruto y consecuente formación de semillas (Tabla. 3.3). El incremento de carotenoides es gradual durante el desarrollo de la flor, el fruto y semillas. Se observa la mayor acumulación de carotenoides en la semilla madura. Estos valores son similares a los reportados en la literatura para este órgano (Mercadante *et al.*, 1996).

La acumulación de carotenos durante el desarrollo del fruto en las plantas se ha reportado en *C. annuum*, *C. melo* y *L. esculentum* (Fraser *et al.*, 1994). En el caso de las plantas antes mencionadas, la acumulación de carotenoides ocurre en los cromoplastos formados durante la maduración de los frutos. Los resultados anteriores sugieren que las etapas de desarrollo del fruto y semillas son un buen modelo para estudiar la regulación de genes involucrados en la acumulación de carotenos y bixina. El análisis de los diferentes cultivos *in vitro* demuestra variaciones en el contenido de carotenoides y de bixina, aunque en general la acumulación de carotenoides fue menor a la observada en los órganos de la planta adulta (Tabla 3.3). Los callos generados a partir de los frutos poseen una mayor cantidad de carotenos, posiblemente debido a que los frutos también poseen una mayor cantidad de carotenos con respecto a los diferentes tejidos de la plántula, los cuales fueron usados para generar los otros cultivos de callos analizados.

Otro aspecto de interés a considerar en este estudio, es el uso del método propuesto por Biacs y Daood (1994) que permitió la extracción de carotenos en todos los tejidos seleccionados, así como del método de análisis propuesto por McKewon (1962) que permite cuantificar bixina disuelta en cloroformo sin que interfieran otros carotenoides presentes (Fig. 3.16). El empleo con éxito del cloroformo como disolvente durante la cuantificación de carotenoides comunes como el β -caroteno, luteína, zeaxantina y violoxantina, con picos de absorción que varían dentro de un rango de 420 a 490 nm ha sido reportado por Wellburn (1994). De esta forma, la detección de la bixina con un pico de absorbancia característico a 500 nm no interfiere con la lectura de otros carotenoides presentes, lo cual es muy importante al analizar tejidos diferentes a las semillas, como son los cultivos *in vitro* y órganos de la planta adulta donde la bixina se acumula en menores cantidades y otros carotenoides son más abundantes.

Análisis del perfil de HPLC obtenido para los cultivos *in vitro* de *B. orellana*

Las diferencias encontradas entre la cantidad de carotenoides presentes y bixina en tejidos diferentes a la semilla, plantearon la necesidad de conocer y evaluar con mayor precisión los diferentes carotenos presentes en estos tejidos. Hasta la fecha no existe

ningún trabajo sobre detección y análisis de carotenos en tejidos diferentes a la semilla. Los análisis de HPLC realizados en esta planta han sido limitados a las semillas, el extracto de anato y los alimentos coloreados por éste (Lancaster y Lawrence, 1996; Luf y Brandl, 1988; Rouseff, 1988). Como una primera etapa de estudio se desarrolló el análisis por HPLC para separar la bixina de los otros compuestos carotenoides presente en los cultivos *in vitro* de *B. orellana*. El método de extracción y las condiciones de corrida fueron modificadas del método propuesto por Biacs y Daood (1994) para otras plantas (ver capítulo 2). El análisis por HPLC de las semillas mostró el pico para la bixina a los 5.95 min de tiempo de retención (Fig. 3.17), en otros tejidos también se observaron otros carotenoides presentes, pero estos ya no fueron identificados. Los resultados del HPLC muestran cambios cualitativos en el perfil de carotenoides de los diferentes cultivos *in vitro* de callos analizados. Los callos blancos presentaron una menor presencia de picos en el rango de salida de la bixina que los callos blanco/café y callos café. Los callos de fruto presentaron los picos más altos en el rango de salida para la bixina entre los cultivos *in vitro* analizados. En todos los cultivos de callos se observa un pico mayoritario a los 3.85 min, este pico también fue encontrado en el extracto de semillas pero a una concentración mucho más baja, la identificación de este caroteno permanece por ser realizada.

Esta es la primera vez que la técnica de HPLC se emplea para separar carotenoides en tejidos diferentes a las semillas en *B. orellana*.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Las etapas de desarrollo durante la formación de la flor, fruto y semillas son un buen modelo para el análisis de la biosíntesis de carotenoides en *B. orellana*, ya que durante estas etapas fue posible determinar un incremento gradual de los pigmentos carotenoides y de la bixina. Esta es la primera vez que se realizó la extracción y cuantificación de carotenoides totales en los tejidos seleccionados de la planta adulta y en los cultivos *in vitro*. (Una excepción es la semilla donde ya se han analizado los carotenoides). El conocimiento de cómo se acumulan los pigmentos carotenoides en estos diferentes tejidos ayudará a diseñar estrategias de investigación encaminadas al estudio de la formación de pigmentos carotenoides.
2. Los diversos cultivos *in vitro* de *B. orellana* como son las plántulas y cultivos de callos son herramientas adecuadas para el estudio de la biosíntesis de pigmentos carotenoides, ya que poseen diferentes acumulaciones de estos pigmentos, en este sentido, además de la cuantificación por espectrofotometría, se realizaron los perfiles cromatográficos por HPLC de los carotenoides presentes en los cultivos de callos, como un primer acercamiento a la identificación de sus carotenoides.
3. Se establecieron protocolos de extracción y análisis de los ácidos nucleicos en los tejidos de la planta adulta y en los tejidos de los cultivos *in vitro*, esto facilitara en un futuro la realización de estudios moleculares con otros genes importantes dentro de la ruta de biosíntesis de carotenoides.
4. Se logró el aislamiento y clonación de fragmentos de los genes *hmg* y *psy* de *B. orellana*. Dichos fragmentos pueden ser usados como sondas en los estudios de expresión o para la búsqueda de los genes completos.
5. Se analizó la acumulación de mensajeros del *hmg* con diversas metodologías, finalmente se observó la expresión diferencial de este gen durante el desarrollo de la flor, fruto y semillas. Se determinó que la mayor acumulación de mensajeros del gen *hmg* se alcanza en los tejidos de la semilla inmadura.
6. Los resultados obtenidos del análisis de expresión de mensajeros y actividad enzimática de la HMGR sugieren una probable regulación transcripcional durante el desarrollo de la flor y fruto, sin embargo, otros tipos de regulación podrían estar presentes y aguardan por ser investigados.
7. Los resultados obtenidos del análisis de southern blot sugieren que el *hmg* de *B. orellana* es codificado por una familia génica.
8. Se analizó la acumulación de los mensajeros del *psy* durante la formación de la flor, fruto y maduración de semillas, los resultados sugieren una expresión diferencial de este gen. Los resultados también sugieren que el tejido donde se observó el máximo de expresión para el *psy* fue la semilla inmadura y correlaciona con el inicio de la acumulación de pigmentos carotenoides.

BIBLIOGRAFIA

- Bach T, Weber T, Motel A** (1990) Some properties of enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in plants. In *Recent Advances in Phytochemistry*, (GHN Towers, HA Stafford, eds.) New York: Plenum Press. 24:1-82.
- Bach TJ** (1995) Some new aspects of isoprenoids biosynthesis in plants: A Review. *Lipids* 30:191-202.
- Bartley GE, Scolnik PA** (1993) cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of PSY2, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *J. Biol. Chem.* 268:25718-21.
- Biacs P, Daood H** (1994) High-performance liquid chromatography with photodiodearray detection of carotenoids and carotenoid esters in fruits and vegetables. *J. Plant Physiol.* 143:520-525.
- Cecarelli N, Lorenzi R** (1984) Growth inhibition by competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in *Helianthus tuberosus* tissue explants. *Plant Sci. Lett.* 34:269-276.
- Chappell J** (1995) Biochemistry and molecular biology of the isoprenoids biosynthetic pathway in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:521-547.
- Chomczynski P, Sacchi N** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Choi D, Ward BL, Bostock RM** (1992) Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* 4:1333-1344.
- Chye M, Chio-Tee T, Nam-Hai C** (1992) Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in *Hevea brasiliensis*: *hmg1* and *hmg3* are differentially expressed. *Plant Mol. Biol.* 19:473-484.
- Chye M, Kush A, Tan CT, Chua NH** (1991) Characterization of cDNA and genomic clones encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol Biol.* 16:567-77.
- Cowan AK, Moore-Gordon CS, Bertling I, Wolstenholme BN** (1997) Metabolic control of avocado fruit growth. *Plant Physiol.* 114:511-518.
- De Vries S, Hoge H, Biseeing T** (1988) Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. *Plant Mol. Biol. Manual* B6: 64-71.
- Enjuto M, Balcells L, Campos N, Caelles C, Arró M, Boronat A** (1994) *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:927-31.
- Fraser P, Kiano J, Truesdale M, Schuch W, Bramley P** (1999) Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Mol. Biol.* 40:687-698.
- Fraser P, Truesdale M, Bird C, Schuch W, Bramley P** (1994) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. *Plant Physiol.* 105:405-413.

- Fray R, Grierson D** (1993) Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and suppression. *Plant Mol. Biol.* 22:589-602.
- Jain AK, Vicent RM, Nessler CL** (2000) Molecular characterization of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene from mulberry (*Morus alba* L.). *Plant Mol. Biol.* 42:559-569.
- Jelesko JG, Jenkins SM, Rodriguez-Concepción M, Grisse W** (1999) Regulation of tomato HMG1 during cell proliferation and growth. *Planta* 208:310-318.
- Karvouni Z, John I, Taylor J, Watson C, Turner A, Grierson D** (1995) Isolation and characterization of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase. *Plant Mol. Biol.* 27:1153-1162.
- Lancaster F, Lawrence J** (1996) High performance liquid chromatographic separation of carminic acid and bixin, and norbixin, and the determination of carminic acid in foods. *J. Chrom. A.* 732:394-398.
- Learned M, Coonolly E** (1997) Light modulates the spatial patterns of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Co A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 11:499-511.
- Learned M, Fink G** (1989) 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase from *Arabidopsis thaliana* is structurally distinct from the yeast and animal enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:2779-2783.
- Lichtenthaler H** (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:47-65.
- Lichtenthaler H, Shcwender J, Disch A, Rohmer M** (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplast proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* 400:271-274.
- Loguercio L, Scott H, Trolinder N, Wilkins T** (1999) HMG-CoA reductase gene family in cotton (*Gossypium hirsutum* L.): unique structural features and differential expression of *hmg2* potentially associated with synthesis of specific isoprenoids in developing embryos. *Plant Cell Physiol.* 4:750-761.
- López-Gómez R, Gómez-Lim MA** (1992) A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using mango mesocarp. *HortScience* 27:440-442.
- Luf W, Brandl E** (1988) Detection of the annatto dye norbixin/bixin in cheese using derivative spectroscopy and high performance liquid chromatography. *Z Lebensm. Unters Forsch* 4:327-32
- McKeown G, Mark E** (1962) Paper chromatography of bixin and related compounds. *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists* 45:761-766.
- Mercadante A, Steck A, Rodriguez-Amaya D, Pfander H, Britton G** (1996) Isolation of methyl 9'Z-*apo*-6'-lycopenoate from *Bixa orellana*. *Phytochemistry* 41:1201-1203.
- Moore KB, Oishi KK** (1993) Characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity during maize seed development, germination, and seedling emergence. *Plant Physiol.* 101:485-491.

- Narita J, Gruissem W** (1989) Tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening. *Plant Cell* 1:181-190.
- Nelson A, Doerner P, Zhu Q, Lamb C** (1994) Isolation of a monocot 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene that is elicitor inducible. *Plant Mol. Biol.* 25: 401-412.
- Park H, Denbow C, Cramer C** (1992) Structure and nucleotide sequence of tomato *hmg2* encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase. *Plant Mol. Biol.* 20:327-331.
- Ray J, Moreau P, Bird A, Grierson D, Maunder M, Truesdale M, Bramley P, Schuch W** (1992) Cloning and characterization of genes involved in phytoene synthesis from tomato. *Plant Mol. Biol.* 19:401-404.
- Re E, Jones D, Learned R** (1995) Co-expression of native and introduced genes reveals cryptic regulation of HMG CoA reductase expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 7:771-784.
- Rodríguez-Concepción M, Gruissem W** (1999) Arachidonic acid alters tomato HMG expression and fruit growth and induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent lycopene accumulation. *Plant Physiol.* 119:41-48.
- Römer S, Huguene P, Bouvier F, Camara B, Kuntz M** (1993) Expression of the genes encoding the early carotenoids biosynthetic enzymes in *Capsicum annum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1414-1421.
- Rouseff R** (1988) High performance liquid chromatographic separation and spectral characterization of the pigments in turmeric and annatto. *J. Food Sci.* 53:1823-1826.
- Schledz M, Al-babili S, Von Linting J, Haubruck H, Rabbani S, Kleinig I, Beyer P** (1996) Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering. *Plant J.* 10:781-792.
- Shewmaker C, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Yang D** (1999) Seed specific overexpression of phytoene synthase: Increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J.* 20:401-412.
- Schuler M, Zielinski R** (1989) RNA isolation from light- and dark-grown seedlings. In: *Methods in Plant Molecular Biology*. (M Shuler, R Zielinski, eds.) Academic Press, Inc. USA. pp:89-96.
- Tsung-Hesien Ch, Ming-Shi S, Wen-Ling H** (1987) Inhibition of somatic embryogenesis in cultured carrot cells by mevinolin. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 28:211-217.
- Vanin E** (1985) Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Ann. Rev. Genet.* 19:253-272.
- Wellburn A** (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144:307-313.

CAPÍTULO 5

PERSPECTIVAS

Introducción

Los resultados presentados durante este trabajo muestran avances con respecto al desarrollo de protocolos para estudiar a nivel molecular la biosíntesis de carotenoides en *Bixa orellana*.

El cumplimiento de los objetivos planteados durante este trabajo, tales como el aislamiento de ácidos nucleicos, el desarrollo de protocolos para el análisis de mensajeros, la caracterización de carotenoides para diversos tejidos de *B. orellana*, la obtención de secuencias parciales de genes de interés y el análisis de expresión de los mensajeros que codifican para la HMGR y PSY, nos permiten sugerir diversas líneas de estudio, las cuales se analizarán a continuación.

Función de la HMGR en *B. orellana*

Los resultados obtenidos durante este trabajo presentaron evidencia de que el gen *hmg* obtenido es regulado durante el crecimiento y desarrollo de diversos tejidos en *B. orellana*. Sin embargo, la evidencia de la presencia de al menos 4 copias del gen *hmg* observadas durante este trabajo, sugiere la existencia de otros isogenes que podrían tener otras funciones importantes dentro del metabolismo de *B. orellana*, tal como sucede en otras plantas analizadas (Bach, 1990), por lo anterior se propone, primero la clonación del gen *hmg* completo a partir del fragmento obtenido y la clonación y el análisis posterior de los otros isogenes presentes en esta planta.

Regulación de la PSY durante la acumulación de bixina

Los resultados obtenidos durante el análisis por northern blot del *psy*, sugieren una posible regulación de este gen durante la maduración del fruto y formación de semillas de forma similar a lo observado en otras plantas (Fraser *et al.*, 1994). En este punto se hace necesario el análisis bioquímico de la PSY, ya sea a nivel de su actividad enzimática y/o la presencia de la enzima para conocer de forma más específica su función durante la formación de carotenoides y bixina.

Clonación de la secuencia parcial del gen *DXS*

La importancia de la ruta del MEP en la síntesis de carotenoides ha sido demostrada recientemente (Lichtenthaler, 1999), por lo anterior la obtención de una sonda homóloga para el *DXS* es un paso importante para el estudio de la acumulación de carotenoides en *B. orellana*. La obtención de secuencias con función desconocida con oligonucleótidos para el *DXS* generados a partir de *R. capsulatus* demostró que estos no son útiles para la clonación de este gen en *B. orellana*. Sin embargo, la reciente clonación de diversos *DXS* de plantas facilitará la obtención de nuevos oligonucleótidos con degeneración a partir de su alineamiento (Lichtenthaler, 1999). De acuerdo a esto, se propuso el empleo de nuevos oligonucleótidos con degeneración para la obtención de fragmentos del gen *DXS*. De hecho,

utilizando esta estrategia se ha clonado recientemente un fragmento del gen *DXS* en nuestro grupo.

Las implicaciones de la utilización de la sonda homóloga del *DXS* durante la acumulación de pigmentos en *B. orellana*, aguardan por ser explorados. El análisis de expresión de este gen durante la formación de semillas con su consecuente acumulación de bixina y la obtención del gen completo enfocado a estudios de sobreexpresión en los cultivos *in vitro* para conocer su importancia durante la formación de carotenoides, son líneas de investigación útiles para un futuro inmediato.

Análisis de la síntesis de bixina

El desarrollo de los diversos cultivos *in vitro* durante este trabajo, así como la aplicación de las diversas metodologías propuestas en éstos, hace de los cultivos *in vitro* de *B. orellana* una herramienta poderosa para el estudio de la biosíntesis de carotenoides y de apocarotenoides. De esta forma, las líneas de callos obtenidas presentaron diferentes cantidades de carotenoides y particularmente su análisis por HPLC mostró un pico mayoritario a los 3.85 min que se presentó de forma inversa a la acumulación de bixina (5.95 min), por ejemplo, en los callos blancos (con poca bixina), se observa un gran pico a los 3.85 min mientras que en los callos café y en las semillas (donde la bixina se acumula) este pico disminuye.

En la literatura no existe ningún modelo propuesto acerca de la biosíntesis de apocarotenoides en *B. orellana*, el análisis de los diversos carotenoides en el extracto de anato de las semillas muestra diversos carotenoides que podrían tratarse de precursores de la bixina, productos de la degradación de la misma o de otros carotenoides convencionales (Mercadante *et al.*, 1997), este tipo de análisis en el extracto de anato no es recomendable porque la bixina se encuentra ya formada y sería difícil observar algún precursor presente. Para resolver este problema se propone el análisis de los tejidos donde la bixina comienza a acumularse, tales como las semillas inmaduras o los cultivos *in vitro* ya establecidos. De hecho, la identificación del carotenoide que resuelve a los 3.85 min en el HPLC puede presentar datos acerca de la naturaleza de los carotenoides precursores de la bixina.

BIBLIOGRAFIA

- Bach T, Weber T, Motel A** (1990) Some properties of enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in plants. In Recent Advances in Phytochemistry, (GHN Towers, HA Stafford, eds.) New York: Plenum Press. 24:1-82.
- Fraser P, Truesdale M, Bird C, Schuch W, Bramley P** (1994) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. *Plant Physiol.* 105:405-413.
- Lichtenthaler H** (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:47-65.
- Mercadante A, Steck A, Pfander H** (1997) Isolation and identification of new apocarotenoids from Annatto (*Bixa orellana*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 45:1000-1004.

