



**DOCTORADO EN CIENCIAS Y
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**Bases genético-moleculares para el
mejoramiento genético del cultivo de
achiote (*Bixa orellana*)
en Yucatán, México**

T e s i s

para obtener el grado académico de

D o c t o r e n C i e n c i a s

p r e s e n t a

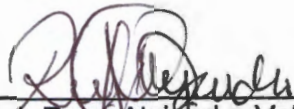
Ruby Alejandra Valdez Ojeda

Centro de Investigación Científica
de Yucatán, A. C.

Mérida, Yucatán, México, 2009

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán y que dicha información le pertenece en términos de la ley de propiedad industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.



Q. I. Ruby Alejandra Valdez Ojeda

CONTENIDO

Reconocimientos	i
Dedicatoria	iii
Índice de figuras	v
Índice de tablas	ix
Índice de abreviaturas	xi
Resumen	xiii
Abstract	xv
Introducción	1
Introducción general	1
Literatura citada	4
Capítulo 1. Introducción a las generalidades de <i>Bixa orellana</i> (L) para su mejoramiento genético	7
1.1 Breve historia del Achiote (<i>Bixa orellana</i> L)	7
1.2 Descripción botánica	8
1.3 Bixina	13
1.3.1 Extracción y caracterización de bixina	16
1.3.2 Biosíntesis de bixina	17
1.4 Distribución del cultivo	19
1.5 Importancia económica	20
1.5.1 Producción y comercialización mundial	20
1.6 Usos o aplicaciones del achiote	21
1.6.1 Uso industrial	21
1.7 Potenciales aplicaciones en medicina	22
1.8 Mejoramiento genético	23
1.8.1 Estudios morfológicos en <i>Bixa orellana</i>	24
1.8.2 Estudios básicos en <i>Bixa orellana</i>	27
1.8.2.1 Citogenética	27
1.8.2.2 Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	28
1.8.2.3 Contenido de ADN	29
1.8.3 Estudios genético-moleculares en <i>Bixa orellana</i>	30
1.8.3.1 Polimorfismo Amplificado de Secuencia	31
1.8.3.2 Sistema de entrecruzamiento	34
1.8.3.3 Mapas genéticos	36
Relacionada (SRAP)	
1.8.3.2 Sistema de entrecruzamiento	34
1.8.3.3 Mapas genéticos	36
Premisas a resolver	41
Objetivos	41
Objetivo general	41
Objetivos específicos	41
Literatura citada	42

Capítulo 2. Evaluación morfológica y análisis genético del achiote (<i>Bixa orellana</i> L.) por polimorfismo amplificado de secuencia relacionada y análisis de grupos	55
Resumen	55
Abstract	56
2.1 Introduction	57
2.2 Materials and methods	58
2.2.1 Sample collection	58
2.2.2 Morphological characterization	59
2.2.3 Molecular characterization	60
2.2.4 Analysis of morphological data	62
2.2.5 Analysis of genetic data	62
2.3 Results	63
2.3.1 Morphological analysis	63
2.3.2 Genetic analysis	66
2.4 Discussion	68
2.5 Conclusions	69
Acknowledgements	70
Literature cited	71
Capítulo 3. Tasas de entrecruzamiento en <i>Bixa orellana</i> L. mediante polimorfismo amplificado de secuencia relacionada (SRAP)	75
Resumen	75
Abstract	75
3.1 Introduction	76
3.2. Materials and methods	77
3.2.1 Plant material	77
3.2.2 DNA isolation and SRAP procedure	78
3.2.3 Data Analysis	79
3.3 Results	79
3.4 Discussion	82
3.5 Conclusions	83
Acknowledgements	84
Literature cited	84
Capítulo 4. Mapa genético preliminar de <i>Bixa orellana</i> (L) usando polimorfismo amplificado de secuencia relacionada (SRAP)	87
Resumen	87
Abstract	88
4.1 Introduction	89

4.2 Materials and methods	90
4.2.1 Plant material	90
4.2.2 DNA extraction and SRAP procedure	91
4.2.3 Linkage analysis	93
4.2.4 Genome length	94
4.3 Results and discussion	94
4.3.1 Linkage analysis	94
4.3.2 Genome length	98
4.4 Conclusions	99
Acknowledgements	100
Literature cited	100
Capítulo 5	105
Discusión general	105
Literatura citada	110
Conclusiones generales	115
Perspectivas	117

Reconocimientos

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular y en la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección de la Dra. Renata Rivera Madrid, a quien agradezco mucho haber dirigido mi tesis, así como su amistad y consejos académicos en contribución a mi formación profesional.

Agradezco al Dr. Carlos F. Quirós, Genetista de la Universidad de California en Davis, por darme la oportunidad de realizar una estancia de investigación en su laboratorio bajo su asesoría. Agradecida estoy por las facilidades brindadas para la realización de los estudios genéticos en su laboratorio, así como el apoyo técnico y personal de su grupo de investigación: Dr. Dan Qui y Maixia Hui.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada No. 185874 para la realización de estudios de posgrado (proyecto: P-46541-Z, "Bases Genético-Moleculares para el Mejoramiento de Achiote, *Bixa orellana*"). Así como por la beca mixta concedida para la estancia académica en la Universidad de California en Davis.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Rosa Ma. Escobedo, Dra. Patricia Colunga, Dra. Renata Rivera y Dr. Carlos Quirós, por sus valiosas aportaciones al desarrollo de la presente tesis.

A los miembros de mi comité predoctoral y de revisión de tesis: Dra. June Simpson, Dra. Renata Rivera, Dra. Rosa Ma. Escobedo, Dr. Carlos Quirós, Dr. Felipe Sánchez, Dr. Gregorio Godoy y Dr. José Luis Hernández, por sus indicaciones en la constitución de la presente tesis doctoral, así como por sus contribuciones a mi crecimiento profesional.

A los técnicos M. en C. Margarita Aguilar, Q.F.B. Patricia Flores, Julián Coello y Filogonio May, a quienes agradezco mucho su amistad, disponibilidad de tiempo, esfuerzo, compromiso y dedicación a cada momento durante todo el período de mis estudios de posgrado.

Al Dr. Jaime Martínez y Dr. Francisco Luna por su asistencia académica y computacional en el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Wolfgang Rohde por su accesibilidad en el uso del programa JoinMap para la generación del mapa de ligamiento.

Al grupo de la Dra. Patricia Colunga y Dr. Daniel Zizumbo por las facilidades técnicas para la realización de los últimos trabajos en el laboratorio con el uso del secuenciador LI-COR.

Al personal técnico del herbario Lilia Can y Silvia Hernández, por las facilidades brindadas en el uso de las instalaciones del herbario y prestación de documentación botánica.

Al personal de la biblioteca: Narce, Miriam, Ofir y Sergio por su amabilidad en el servicio de prestación de libros y solicitud de documentos. Muchas gracias.

Al personal de posgrado: Landy, Yoly y Alejandra, por su cortesía y amabilidad en el servicio académico del departamento de posgrado. Muchísimas gracias.

Al Ing. Fernando Contreras Martín y su grupo de trabajo, por su asistencia en la preparación de la tierra para las plantas que cuidadosamente atendieron en el invernadero. Muchas gracias.

A todos los compañeros del laboratorio de la Dra Renata: Ester, Geovana, Norka, Norma, Carmen, y a todos los que voluntaria o involuntariamente contribuyeron al desarrollo del presente trabajo. Muchas gracias.

Dedicatoria

A Jesús y María por nunca dejarme sola en este camino que juntos hemos trazamos día a día.

A mi esposo por su amor y soporte en este que ahora es un gran sueño mutuo hecho realidad. Por su apoyo y contribución al desarrollo de la tesis y por los sufrimientos y triunfos compartidos.

A mis padres y hermanos por ser mi mayor motivo de superación personal y profesional. Por sus oraciones y consejos en este caminar que a penas comienza.

Índice de figuras

Figura 1.1 Indios visibles en la frontera del estado de Acre (Brasil) (Miranda, 2004).	8
Figura 1.2 Planta de achiote (Yaxcabá, Yucatán, México) (Valdez-Ojeda, 2005).	9
Figura 1.3 Diferentes tonalidades de la flor (rosa (a), blanco (b) y rosa fucsia (c)) y de la cápsula de <i>Bixa orellana</i> (verde (d), rojo (e) y amarillo (f)) (Valdez-Ojeda, 2006).	11
Figura 1.4 Esquema de la antera de <i>B. orellana</i> . A. Vista ventral de la antera; B. Vista lateral de la antera, C. Plano vertical de la antera, D. Transecciones de antera en diferentes niveles. Los sacos de polen (lóbulos de polen) de una teca son mostrados en negro sólido, E. Dehiscencia de la antera, F. Antera dehiscente vista desde arriba (Venkatesh, 1956).	12
Figura 1.5 Dehiscencia del fruto o cápsula de <i>Bixa orellana</i> (Valdez-Ojeda, 2005).	13
Figura 1.6 Corte longitudinal de las semillas de <i>Bixa orellana</i> (Bittencourt et al., 2005.)	14
Figura 1.7 Fórmula estructural de bixina (Bouvier et al., 2003).	15
Figura 1.8 Ruta propuesta para la biosíntesis de bixina Las letras BoLCD, BoBADH, BonBMT representan las enzimas dioxigenasa, aldehído deshidrogenasa y carboxil metiltransferasa, respectivamente (Bouvier et al., 2003).	19
Figure 2.1 Annatto accession collection sites in Yucatan state, Mexico.	59

Figure 2.2 Differences in capsule size between clustered groups: (a) average length, (cm) ($F_{[2, 86]}=21.85$, $P < 0.000$; Tukey HSD at 5%); (b) average width, (cm) ($F_{[2, 86]}=7.56$, $P < 0.001$; Tukey HSD at 5%); and (c) length/width ratio, (cm) ($F_{[2, 86]}=59.39$, $P < 0.000$, Tukey HSD at 5%).

64

Figure 2.3 Differences in qualitative morphological features between clustered groups: (a) capsule spine length (Fisher's Exact Test =21.63, $P < 0.001$); (b) capsule apex shape (Fisher's Exact Test =25.66, $P < 0.000$); (c) capsule dehiscence (Pearson's Chi-Square =5.78, $P < 0.058$); (d) flower color (Fisher's Exact Test =77.66, $P < 0.000$); and (e) capsule color (Fisher's Exact Test =80.57, $P < 0.000$).

65

Figure 2.4 Dendrogram of annatto collection sites based on UPGMA cluster analysis of 58 sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular markers in the study. The resulting clusters are labeled Cluster I and II. The letter "C" indicates an individual collected at Cooperativa and "Y" one collected at Yaxcaba. CTRL indicates the positive control (pink flower, high bixin content, red and dehiscent capsule). The numbers at the nodes indicate the percentage bootstrap values.

67

Figure 3.1 SRAP fragments generated with primer combinations SA-12 and EM-8. The families 1, 2 and 3 are indicated. The rows indicate the markers detected. Size standard (in base pairs) is shown on the left.

80

Figure 4.1 Morphological traits of the parental lines selected for crossing: A. male parent with pink flowers, higher content of bixin (>2.7%), red pods with a few thorns and dehiscent. B. female parent, with white flowers, lower content of bixin (<2.7%), green pods with many thorns and indehiscent.

91

Figura 4.2. Fragment of TIFF image with the SRAP marker combination Dc1 and Odd23. Lanes 1 and 2 contain DNA from 'male parent' and 'female', respectively. Lanes 3-47 contain DNA from the segregants F1. The fragments present in a segregant with respect to the absence or presence in the parents were registered for their polymorphism. 95

Figure 4.3 Genetic linkage map of the F1 segregant population ('male parent', x 'female parent'). The map was estimated by 381.9 cM Haldane. 4 linkage groups were generated with LOD ≥ 3.0 and $\theta \leq 0.4$. 97

Índice de tablas

Table 2.1 SRAP primers used to develop the polymorphic markers used in the study.	61
Table 2.2 Mean bixin content (\pm standard error) in morphological groups produced in the cluster analysis by site.	66
Table 3.1. Outcrossing rates (t_m), mean of singlelocus (t_s) and Wright's fixation index (F).	81
Table 4.1 Sequences of SRAP primers used in this study.	92
Table 4.2 Marker number, locus, linkage group and cM position.	97

Index de tablas

87	Table 2.1. SRAP primers used to develop the phylogenetic markers used in this study.
88	Table 2.2. Mean plasmid content (\pm standard error) in morphological groups produced in the cluster analysis by
89	Table 2.3. Outcrossing rates (r_{ij}), mean of single locus (r_j) and Wright's fixation index (F_i).
92	Table 4.1. Sequences of SRAP primers used in this study.
97	Table 4.2. Marker number, locus, linkage group and cM.

Índice de abreviaturas

AFLP	Polimorfismo de Longitud Amplificado
EDTA	Etilendiamino tetracético
Abs	Absorbancia
TLC	Cromatografía en Capa Fina
dNTP's	Desoxinucleósidos trifosfatos
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
kb	Kilobase
msnm	Metros sobre el nivel del mar
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RFLP	Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SRAP	Polimorfismo de Amplificado de Secuencia Relacionada
SSR	Polimorfismos de Secuencias Simples Repetidas
RT-PCR	Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa
cDNA	ADN complementario
mRNA	RNA mensajero

Resumen

Bixa orellana L. es una planta hermafrodita con número cromosómico $2n = 14$. Esta especie diploide se caracteriza por presentar gran heterogeneidad en sus formas botánicas, así como por sintetizar bixina, un colorante con propiedades terapéuticas y antioxidantes utilizada en la industria alimentaria, farmacéutica y de cosméticos. Uno de los principales retos a vencer, es la variación contrastante en los rendimientos y en la calidad de sus pigmentos. Este estudio desarrolló las bases moleculares para el mejoramiento genético de *B. orellana*. Ochenta y siete muestras colectadas de dos regiones agrícolas del sur de México fueron caracterizadas morfológicamente y analizadas genéticamente por vez primera mediante el polimorfismo amplificado de secuencia relacionado (SRAP). Los resultados indicaron que padres con flores púrpuras cápsulas indehiscentes son parentales potenciales para mejoramiento genético de achiote con el objetivo de incrementar el contenido de bixina. El análisis genético indicó una alta variación, aunque el dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Nei y Li mostró su dispersión de acuerdo al sitio de colecta. El polimorfismo genético detectado mediante SRAP se empleó para estimar la tasa de entrecruzamiento en *B. orellana* en una población de polinización abierta con 11 familias de 10 individuos cada una. Los marcadores SRAP indicaron una tasa de entrecruzamiento (t_m) de 0.748. El índice de fijación de Wright (F), indicó alta homocigosidad en la progenie evaluada con reproducción azarosa, debido probablemente a la baja variabilidad genética en la población. El conocimiento adquirido con los estudios realizados condujo a la utilización de marcadores SRAP para construir preliminarmente el primer mapa genético de una población F1 segregante de la cruce entre parentales que presentan características contrastantes en función al contenido de bixina e indehiscencia de la cápsula. Veintiún pares de cebadores polimórficos SRAP fueron utilizados para detectar 63 marcadores en la población F1 de 150 semillas. El análisis

indicó que treinta y tres alelos segregaron Mendelianamente 1:1 ($P \geq 0.05$), los cuales al someterse al programa JoinMap, formaron cuatro grupos de ligamiento (GL) con un valor LOD = 3.0. Los GL formados por 2 y 9 marcadores abarcan 381.9 cM del genoma de *B. orellana*. La incorporación de un mayor número de loci detectados permitirá estudiar los loci cuyos alelos segregan en proporción 3:1 en la población F1 estudiada. Este estudio demuestra que el marcador molecular SRAP es un sistema de marcación efectivo en la construcción de un mapa genético preliminar de *B. orellana* debido que con únicamente 35 loci que segregaron genotípicamente 1:1 fueron exitosamente mapeados 15 loci en 4 grupos de ligamiento de los 7 esperados. Este estudio en su conjunto, se ha enfocado en generar algunas bases genético-moleculares para el mejoramiento genético del cultivo de achiote para la selección del material élite.

Abstract

Bixa orellana L. is a hermaphrodite plant with chromosome number $2n = 14$. This diploid species is characterized by great heterogeneity in its botanical forms, as well as the synthesis of bixin, a colorant with therapeutic and antioxidant properties used in the food, pharmaceuticals and cosmetics industries. One of the main challenges to overcome is the contrasting variation in yields and pigment quality. This study developed the molecular basis for genetic improvement of *B. orellana*. Eighty-seven samples collected from two agricultural regions of southern México were characterized morphologically and genetically analyzed for the first time by sequence related amplified polymorphism (SRAP). Our results indicated that parents with purple flowers and indehiscent capsules are potential parents for genetic improvement of annatto with the aim of increasing the content of bixin. The genetic analysis indicated high variation, although the dendrogram based on the similarity coefficient of Nei and Li showed clustering according to the collection site. The genetic polymorphism detected by SRAP was used to estimate outcrossing rates in an open-pollinated population with 11 open-pollinated progeny arrays of 10 individuals. SRAP data indicate a multilocus outcrossing rate (t_m) of 0.748. Wright's fixation index (F), indicated high homozygosity in the progeny evaluated with random mating, probably due to the low genetic variability in the population. The knowledge gained from the studies led to the use of SRAP markers to construct the first preliminary genetic map of a segregating F1 population of crosses between parents with contrasting traits in bixin content and indehiscent capsule. Twenty-one polymorphic SRAP primer pairs were used to detect 63 markers in an F1 population of 150 seeds. The analysis indicated that thirty-three Mendelian alleles segregated 1:1 ($P \geq 0.05$), which using the program JoinMap formed four linkage groups (LG) with a LOD = 3.0. The LG were formed by 2 and 9 markers covering 381.9cM of the genome of *B. orellana*. The incorporation of more loci will determine the loci

whose alleles segregate in a 3:1 ratio in the F1 population. This study demonstrates that SRAP is an effective marker system for the construction of a preliminary genetic map of *B. orellana* because with only 35 loci that segregated 1:1 genotypically 15 loci were successfully mapped on 4 of 7 expected linkage groups. This study as a whole has focused in generating some genetic-molecular basis for the genetic improvement of the culture of annatto for the selection of the material elite.

INTRODUCCIÓN

Introducción general

Bixa orellana L. es una planta tropical con número cromosómico $2n = 14$ (De Almeida *et al.*, 2006). Esta especie se caracteriza por presentar gran heterogeneidad en sus formas botánicas, así como por sintetizar bixina, pigmento principalmente acumulado en la cubierta resinosa de las semillas maduras (Arce, 1999). Este pigmento es de gran demanda a nivel mundial por su uso como colorante en alimentos procesados, así como por su contribución a la salud humana y animal (Russell *et al.*, 2005; McGonigle & McCracken, 2002; Rojas *et al.*, 2006).

Lo anterior ha motivado el desarrollo de estrategias para obtener el mayor aprovechamiento de los metabolitos que esta planta sintetiza, tales como la inducción de poliploidía (Portela de Carvahlo *et al.*, 2005), la propagación clonal *in vitro* de plantas élite (Sharon & D'Souza, 2000), la regeneración de cultivos a partir de explantes de hipocotilos (Parimalan *et al.*, 2007), el sistema de polinización artificial (Rivera-Madrid *et al.*, 2006), así como el aislamiento, regulación y expresión de algunos genes implicados en la biosíntesis de carotenoides y bixina (Narváez *et al.*, 2001a; 2001b; Rodríguez-Ávila *et al.*, sometido), entre otros. A pesar de la importancia del cultivo de achiote, existe muy poca información al respecto, pero que sienta un precedente en el cultivo del achiote, condensado en el Capítulo 1.

Uno de los principales retos a vencer es la variación contrastante en los rendimientos y en la calidad de sus pigmentos. Por lo que el presente trabajo se ha enfocado en generar algunas bases genético-moleculares para el mejoramiento genético del cultivo de achiote para la selección del material élite. Un primer paso fue realizar la clasificación de los distintos cultivares de acuerdo al contenido de bixina y las características morfológicas; siendo que tal investigación facilitaría la rápida y adecuada selección de los genotipos

parentales para su mejoramiento genético. En este sentido, el Capítulo 2, hace referencia a los estudios enfocados a la detección de caracteres asociados a la producción de bixina, a través de la identificación de las características que favorecen la obtención de altos contenidos de bixina, como la indehiscencia de la cápsula y el color de la flor, entre otros. El objetivo de este estudio fue analizar la variación morfológica en *B. orellana* y por vez primera, analizar la variación genética usando marcadores moleculares SRAP (Li & Quiros, 2001). De esta manera, materiales con alto contenido de bixina y características agronómicamente importantes que favorecen el rendimiento de bixina fueron evaluados tales como la indehiscencia de la cápsula y el color de la flor, entre otros. Las características agronómicas fueron comparadas con la producción de bixina y los individuos fueron analizados genéticamente para seleccionar el germoplasma más apropiado para el mejoramiento genético de achiote. Los resultados obtenidos, representan un importante avance hacia el mejoramiento genético más efectivo del achiote, debido a que las cruzas entre los diferentes grupos morfológicos y/o genéticos formados mediante este estudio, tienen el potencial para producir una recombinación de caracteres deseados en la descendencia híbrida (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008).

La implementación de un programa de mejoramiento genético, requiere del conocimiento del sistema reproductivo del achiote. Actualmente, la información concerniente al sistema de apareamiento en *B. orellana* está siendo todavía objeto de discusión ante la inexistencia de un estudio que lo evalúe. Estudios de polinización artificial de *B. orellana*, sugieren que el entrecruzamiento y autocruzamiento ocurren en achiote (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Sin embargo, con el uso de los marcadores moleculares se pueden obtener apropiadas estimaciones cuantitativas de los parámetros del sistema reproductivo (Shaw & Allard, 1982). Los marcadores moleculares no han sido utilizados para analizar el sistema reproductivo en *B. orellana*. El marcador molecular SRAP, es altamente polimórfico en *B. orellana* (Valdez-Ojeda *et al.*,

2008), a pesar de que su carácter es dominante. Al respecto Ritland & Jain (1981) demostraron por estudios de simulación, que esta limitación puede ser resuelta mediante la estimación multilocus usando un gran número de marcadores dominantes con frecuencias genéticas intermedias y muchos loci. En este sentido, el Capítulo 3, aborda, la estimación de las tasas de entrecruzamiento en una población de polinización abierta de *B. orellana* mediante marcadores moleculares SRAP. El objetivo de este estudio fue estimar las frecuencias relativas de entrecruzamiento versus autocruzamiento en una población de *B. orellana* en Yucatán, México mediante polimorfismo amplificado de secuencia relacionada (SRAP). Los resultados obtenidos, demuestran que el entrecruzamiento no es el único sistema reproductivo en *B. orellana*, y que éste parece regirse en función a las características morfológicas de las variantes de esta especie. Además, de que el marcador molecular SRAP, demostró detectar el polimorfismo en esta especie y ser adecuado para la evaluación del sistema reproductivo de esta especie.

Los marcadores moleculares SRAP también fueron utilizados para la generación del primer mapa genético, cuya información es utilizada en programas de mejoramiento para la rápida localización de genes de interés, tales como los involucrados en la biosíntesis de bixina y la dehiscencia de la cápsula, para su introgresión en el mejoramiento asistido con marcadores (MAS). Para generar un mapa genético, se parte por lo general de una población segregante F_2 . Sin embargo, el ciclo de floración y fructificación de *B. orellana*, ocurre una vez al año, tiempo utilizado para realizar cruza controladas. Por lo que el período para obtener una población F_2 , pudiera tomar entre 3 y 5 años. Ante esta problemática y los estudios previos realizados y citados en los Capítulos 2 y 3, se realizó la identificación de los caracteres asociados al contenido de bixina, para seleccionar a los parentales potenciales para el mejoramiento genético de *B. orellana*. Basados en esta información, el Capítulo 4, implica la cruce de parentales diploides con características fenotípicas extremas en el

contenido de bixina, dehiscencia y espinosidad de las cápsulas, así como el color de la flor, haciendo uso de un sistema de polinización artificial de *B. orellana* para obtener una población F1 segregante y detectar marcadores moleculares SRAP en parentales y progenie que permitan la generación preliminar de un mapa genético de *B. orellana*. De esta manera, el objetivo de este estudio se basó en el registro de los marcadores SRAP para generar el mapa genético, basado en los grupos de ligamiento genético en base a la frecuencia de recombinación de las características segregantes. Este estudio demuestra que el marcador molecular SRAP es un sistema de marcación efectivo en la generación de un mapa genético preliminar de *B. orellana*.

Los estudios desarrollados en este trabajo representan nuevos conocimientos sobre esta especie para contribuir en el desarrollo de herramientas que permitan una rápida y apropiada selección de germoplasma de partida para el mejoramiento genético de *B. orellana*. Lo anterior, deriva en discusiones y conclusiones, incluidos en el Capítulo 5. Las perspectivas a corto y a largo plazo de los estudios realizados mediante esta investigación, se citan en el Capítulo 6.

LITERATURA CITADA

- Arce, J.** (1999). *El achiote Bixa orellana L. cultivo promisorio para el trópico*. Earth. Costa Rica. 1-36 pp.
- De Almeida, P. M., C. R. Carvalho y W. R. Clarindo** (2006). *Classical and Molecular Cytogenetic Tools to Resolve the Bixa Karyotypes*. Cytologia, 71(4), 391–398.
- Júnior, A. C. T. S., L. M. B. O. Asad, E. B. De Oliveira, K. Kovary, R. A. Nasser y I. Felzenszwalb** (2005). *Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress*. Genetics and Molecular Research, 4(1), 94-99.
- Li, G. y C. F. Quiros** (2001). *Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and*

- gene tagging in Brassica*. Theoretical and Applied Genetic, 103, 455–461.
- McGonigle, K. E. M. y K. J. McCracken** (2002). *Study on the effects of annatto (Bixa orellana) and Yucca Schidegera on cholesterol content and yolk colour*. British Poultry Science, 43 (S1), 41-42.
- Narváez J. A., P. Flores-Pérez, V. Herrera-Valencia, F. Castillo, R. Ku-Cauich, B. B. Canto-Canché, N. Santana Buzzy y R. Rivera-Madrid** (2001a). *Development of Molecular Techniques for Studying the Metabolism of Carotenoids in Bixa orellana L.* Hortscience, 36(5), 982–986.
- Narváez J. A., B. B. Canto-Canché, P. Flores-Pérez y R. Rivera-Madrid** (2001b). *Differential expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) during flower and fruit development of Bixa orellana*. Journal of Plant Physiology, 158, 1471–1477.
- Parimalan, R., P. Giridhar, B. G. Harischandra y G. A. Ravishankar** (2007). *Organogenesis from cotyledon and hypocotyl-derived explants of japhara (Bixa orellana L.)*. Acta Botánica Croatica, 66(2), 153–160.
- Portela de Carvalho, J. F. R., C. R. De Carvalho y O. W. Campos** (2005). *In vitro induction of polyploidy in annatto (Bixa orellana)*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 80, 69–75.
- Ritland, K. y S. Jain** (1981). *A Model for the Estimation of Outcrossing Rate and Gene Frequencies Using n Independent Loci*. Heredity, 47, 35-52.
- Rivera-Madrid, R., R. M. Escobedo-GM, E. Balam-Galera, M. Vera-Ku y H. Harries** (2006). *Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (Bixa orellana L.)*. Scientia Horticulturae, 109, 165–172.
- Rojas, J. J., V. J. Ochoa, S. A. Ocampo y J. F. Muñoz** (2006). *Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial*

- infections*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 6, 1–6.
- Russell, K. R. M., E. Y. St. A. Morrison y D. Ragoobirsingh** (2005). *The Effect of Annatto on Insulin Binding Properties in the Dog*. Phytotherapy Research, 19, 433–436.
- Shaw, D. V. y R. W. Allard** (1982). *Estimation of outcrossing rates in Douglas-fir using isozyme markers*. Theoretical and Applied Genetic, 62, 113-120.
- Sharon, M. y M. C. D'Souza** (2000). *In vitro clonal propagation of annatto (Bixa orellana L.)*. Current Science, 78(12), 1532-1535.
- Valdez-Ojeda, R., J. L. Hernández-Stefanoni, M. Aguilar-Espinosa, R. Rivera-Madrid, R. Ortiz y C. F. Quiros** (2008). *Assessing Morphological and Genetic Variation in Annatto (Bixa orellana L.) by Sequence-related Amplified Polymorphism and Cluster Analysis*. Hortscience, 43, 2013-2017.

Capítulo 1

Introducción a las generalidades de *Bixa orellana* (L) para su mejoramiento genético

1.1 Breve historia del Achiote (*Bixa orellana* L)

El nombre achiote se deriva del náhuatl “achiotl”; “bixa” proviene del taino “bixa” que los indígenas pronunciaban “bisha” y *orellana*, en honor a Francisco de Orellana el conquistador que exploró el río Amazonas en 1541 y la dió a conocer a los españoles (Patiño, 1964; Pittier, 1978).

Bixa orellana es nativa del Acre al sudoeste de la cuenca Amazónica donde ocurrió su domesticación a partir de *Bixa excelsa*, durante el paleolítico, según Smith (2005). Sin embargo de acuerdo a Córdoba (1987), el achiote se originó en las Antillas menores (extenso grupo de islas ubicadas en la parte oriental del océano Atlántico) entre las que se citan: Guadalupe, Trinidad y Martinica.

Los registros arqueológicos de *B. orellana* en Colombia indican su presencia desde el período Llama (800-100 a. C.) y el período Sonso (siglo V a XVI d. C.) (Morcote-Ríos, 2006). En México, su presencia se registra desde la época precolombina en 1519 cuando Hernán Cortes llegó a México (Schmidt-Hebbel, 1980). Su uso se constata en la elaboración de manuscritos mexicanos en el siglo XVI, así como para la preparación de bebidas en la celebración de ceremonias (Donkin, 1974). El achiote es utilizado actualmente por grupos nativos de la región amazónica como la Matsés, la Kuarup y los indios invisibles (Fig. 1.1).



Figura 1.1 Indios invisibles en la frontera del estado de Acre (Brasil) (Miranda, 2004).

1.2 Descripción botánica

Taxonómicamente *B. orellana*, descrito por Carl Linnaeus en 1753 pertenece al reino vegetal y, se encuentra incluido en la división *spermatophyta*, subdivisión *angiospermae*, clase *dicotiledoneae*, subclase *dalipetale*, orden *varietales*, familia *bixaceae* y género *bixa*. Al interior de *Bixa orellana* se conocen dos variedades taxonómicas: *leiocarpa* (Kuntze) y *urucurana* (Willd) (Poppendieck, 2001).

Bixa orellana, se describe botánicamente como un árbol perennifolio de rápido crecimiento. La descripción morfológica de esta especie, y particularmente de la inflorescencia y de su vascularización fueron desarrolladas por Rivera y Flores (1988). Mientras que Ronse (1989) se enfocó en la descripción de su desarrollo floral, haciendo un especial énfasis en el androceo (Venkatesh, 1956).

Los resultados de los estudios de éstos y otros autores, nos permiten saber hoy día que el crecimiento de la planta es hacia arriba (ortotropismo) y no hacia los lados (Arce, 1999). La

forma de la copa del árbol es piramidal, redondeada o irregular (Rivera & Flores, 1988). La raíz principal es pivotante, con numerosas raíces secundarias y terciarias y de cuarto orden (Arce, 1999). El tronco de ramificación dicotómica desde la base del tronco, es recto de forma cilíndrica, con diámetro de 20-30cm. La corteza del tallo es lisa o poco fisurada de color pardo-rojizo, pardo-oscuro, pardo-verdoso o pardo-grisáceo, con pocas o muchas lenticelas de color pardo claro o amarillento (Rivera & Flores, 1988). Las ramas son delgadas tendiendo a leñosas. La corteza externa de las ramas es de dos colores verde o morada, y fisurada en largas tiras. La corteza interna es amarillo-naranja, con savia anaranjada ligeramente amarga (Hernández *et al.*, 1988; Arce, 1990; Ramos-Solórzano, 1991) (Fig. 1.2).



Figura 1.2 Planta de achiote (Yaxcabá, Yucatán, México) (Valdez-Ojeda, 2005).

Las hojas miden entre 8-20cm por 4-15cm, son simples, dorsiventrales, de textura cartácea, de color verde oscuro y forma variable (deltoide, cordiforme, acorazonadas, ovales o lanceoladas), lámina simétrica o asimétrica y pubescentes, lisas en los bordes y glabras en ambas caras con ápice

acuminado (Poveda, 1983; Rivera & Flores, 1988), presentan pecíolos largos y delgados (4-6cm) con disposición alterna. El haz es de color cobrizo y el envés es de color plateado, pero cuando maduran se tornan coriáceas y ásperas. Algunas variedades presentan hojas jóvenes pardo rojizas (León, 1987; Hernández *et al.*, 1988).

Los ápices vegetativos se transforman en ápices florales terminales, tras el ensanchamiento y alargamiento del ápice (Rivera & Flores, 1988). Las inflorescencias están dispuestas en panículas monocasias. Las flores están agrupadas en pequeñas panículas con un eje central redondeado por cinco a seis ramas laterales, cada rama usualmente contiene tres flores (Ronse, 1989). Los sépalos surgen rápidamente en secuencia espiral. El desarrollo del cáliz es de acuerdo a las manecillas del reloj, pero la formación del botón es contraria (Rivera & Flores, 1988; Ronse, 1989). El crecimiento del cáliz es continuo y los sépalos rápidamente encierran el ápice floral. El surgimiento de la corola ocurre en dos periodos; tres pétalos primordios aparecen en el lado adaxial del ápice floral seguido por dos pétalos primordiales en el lado abaxial (Ronse, 1989). La corola está formada por cinco pétalos (en ocasiones, un sexto pétalo surge entre dos pétalos de mayor tamaño), en general miden 1-2cm de largo, son de forma redondeada u ovalada y de colores diversos (rosado, púrpura o blanco). Las flores son hermafroditas, regulares, compuestas, actinomorfas y vistosas (Hernández *et al.*, 1988) (Figura 1.3; a, b y c). Existe una notoria desuniformidad en la maduración de sus flores, por lo que se pueden observar en cada panícula: primordios florales, flores maduras y frutos en diferentes etapas de maduración (Rivera & Flores, 1988).



Figura 1.3 Diferentes tonalidades de la flor (rosa (a), blanco (b) y rosa fúscia (c)) y de la cápsula de *Bixa orellana* (verde (d), rojo (e) y amarillo (f)) (Valdez-Ojeda, 2006).

El androceo es polistémono con un número variable de estambres, aún en flores de un mismo individuo (Rivera & Flores, 1988). Los estambres son numerosos (300-400), con pedúnculos cortos y dispuestos alrededor del pistilo, pero indefinidos, libres en la base, de filamentos filiformes, de color blanco, amarillo o violeta. Las anteras son bitecas de dehiscencia apical (morfológicamente lateral) y porocida, con ocho sacos polínicos que producen abundante polen. Los grupos de polen son tectados, tricolpados, triaperturados

(triporados) y redondeados (Fig. 1.4) (Venkatesh, 1956; Ronse, 1989; Rivera & Flores, 1988).

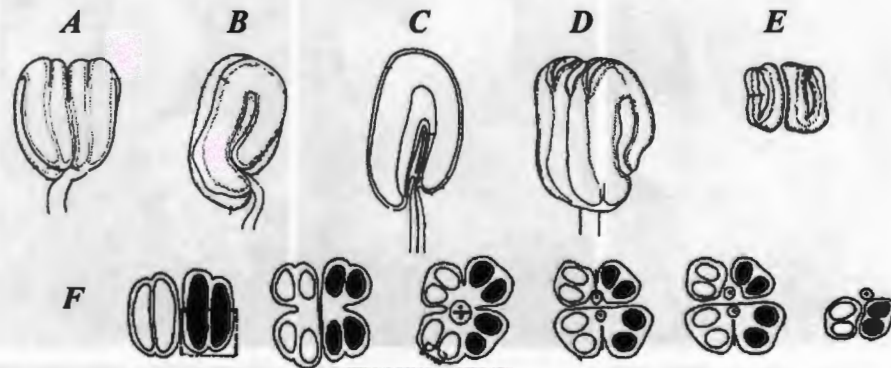


Figura 1.4 Esquema de la antera de *B. orellana*. **A.** Vista ventral de la antera; **B.** Vista lateral de la antera, **C.** Plano vertical de la antera, **D.** Transecciones de antera en diferentes niveles. Los sacos de polen (lóbulos de polen) de una teca son mostrados en negro sólido, **E.** Dehiscencia de la antera, **F.** Antera dehiscente vista desde arriba (Venkatesh, 1956).

El gineceo está formado por un ovario globoso elevado por un ginóforo que se desarrolla en etapas ontogénicas tardías. El estilo es filamentososo, es relativamente largo, dorsiventralmente aplastado, de forma casi espatulada y se expande hacia el estigma. El estigma es bilabiado, liso en la superficie externa; el canal estilar está cubierto por numerosas protuberancias papilares. En la pared estilar se observan canales secretores de látex y mucílago (Rivera & Flores, 1988). El fruto o cápsula mide 3-5cm por 3-4.5cm de diámetro, es ovoide-alargada u ovoide-globosa (Figura 1.3; d, e y f). Esta cápsula dehiscente o indehiscente (en algunos individuos), se caracteriza por la ausencia o presencia, en su superficie externa, de espínulas de longitud y densidades variables suaves en inmadurez y rígidas en su madurez (Figura 1.5) (Arce, 1999).



Figura 1.5 Dehiscencia del fruto o cápsula de *Bixa orellana* (Valdez-Ojeda, 2005).

En el interior de la cápsula, se encuentran dos valvas (en algunos casos hasta tres) con paredes delgadas y una placenta que se prolonga en una delgada membrana amarillo-verdoso, que en la mayoría de las cápsulas se encuentra adherida a la pared, a cuyos costados se albergan las semillas sostenidas por un pedúnculo amarillento (Hernández *et al.*, 1988). En cada cápsula se cuentan 15-75 semillas, las cuales son cotiledones planos casi triangulares o piramidales algo comprimidas, pequeñas de 5-6mm por 4-5mm, de color rojo. El arilo de las semillas constituye una testa pulposa de color rojo amarillento o anaranjado brillante, cuyo principal diapocarotenoide de alto valor comercial se denomina bixina (Pérez & Becerra, 2003).

1.3 Bixina

Mundialmente, es el segundo colorante natural de mayor importancia económica, empleado en sustitución de tartrazina, un colorante sintético que se ha prohibido en muchos países (JECFA, 2003), debido a que como muchos de su tipo liberan

moléculas que son alergénicas, carcinogénicas y por consiguiente dañan a la salud humana (Siva, 2007).

Bixina es un compuesto de consumo humano seguro, ha sido utilizada como colorante alimentario en America Latina por muchos siglos. No posee ninguna genotoxicidad, toxicidad crónica, toxicidad reproductiva o carcinogénica. Por lo que es uno de los colorantes permitidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Bittencourt *et al.*, 2005), aceptado y clasificado como aditivo de color por la Administración de Alimentos Medicamentos y Cosméticos (FDA&C) (JECFA, 2003).

De acuerdo al análisis de localización espacial del colorante en semillas seccionadas, mediante "Time-of-flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS)", donde el arilo y el endospermo fueron analizados, la bixina se encuentra en la cubierta externa de las semillas de *B. orellana* (Fig. 1.6). Según Mercadante *et al.* (1996), el contenido de bixina representa 2-6% por peso de semilla, y 70-80% del contenido total de pigmentos en cada semilla.



Figura 1.6 Corte longitudinal de las semillas de *Bixa orellana* (Bittencourt *et al.*, 2005.)

La caracterización de bixina, mediante “Time-of-flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS)”, es novedosa, debido a que esta técnica, permite la medición directa en la semilla, a través de la toma de medidas preventivas como la protección de la luz, el control de temperatura y la atmósfera inerte; para determinar los constituyentes de las semillas de *B. orellana*, su extracto y sus productos de degradación. De esta manera, utilizando como muestras semillas y extracto orgánico obtenido a partir de las mismas, se identificó al principal pigmento del achiote, bixina, un ácido carboxílico y un monometil éster como grupo terminal, $C_{25}H_{30}O_4$ (Fig. 1.7) (Bittencourt *et al.*, 2005).

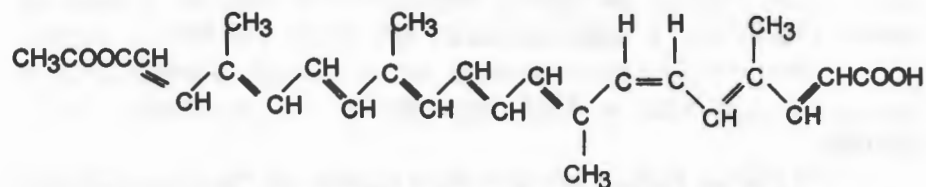


Figura 1.7 Fórmula estructural de bixina (Bouvier *et al.*, 2003).

El principal pigmento es, específicamente, *cis*-bixina aunque también están presentes: *trans*-bixina, *cis*-norbixina y *trans*-norbixina. La norbixina u “orellina” representa menos del 2.5%, es un pigmento de color amarillo e hidrosoluble (Johnson & Peterson, 1974). Otros componentes tales como β -caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina y metil-bixina (Tirimana, 1981; Mercadante *et al.*, 1997), terpenos (*all-E*-geranilgeraniol, farnesil-acetona, geranil-geranil, octadecanoato, geranil-geranil formato, ξ -tocotrienol) y otros apocarotenoides (metil 9'Z-apo-6'-oato, metil (9Z)-apo-8'-licopenoato y (*all-E*)-apo-8'-licopenoato) también se encuentran presentes (Jondiko y Pattenden, 1989; Mercadante *et al.*, 1996).

La bixina se caracteriza por ser una sustancia ligeramente cristalina de color rojo oscuro; soluble en aceites, grasas, cloroformo, piridina, ácido acético glacial y propilenglicol; estable en presencia de bajas concentraciones

de oxígeno y antioxidantes adicionados; resistente a los ácidos y álcalis, por lo que no es afectada por metales como hierro, aluminio y zinc (De Oliveira *et al.*, 2004).

1.3.1 Extracción y caracterización de bixina

La utilidad e inocuidad de bixina ha motivado el desarrollo de investigaciones enfocadas a la identificación del proceso de extracción que permita el máximo aprovechamiento de este pigmento. En este sentido, muchos métodos han sido descritos e incluso patentados para la extracción de bixina a partir de las semillas. Saraswathy *et al.* (2004) evaluaron 23 métodos de extracción de los cuales los que permitieron la obtención del mayor rendimiento de bixina implicaron el uso de aceite de castor (13.25%), y calentamiento en agua (13.09%), siendo este último método ampliamente adoptado en la India y cuya aplicación provoca la fácil separación del pigmento de la semilla.

La bixina puede ser extraída (como se ha mencionado) de las semillas del achiote mediante solventes orgánicos, álcalis o aceites. Sin embargo, durante el almacenamiento, considerables pérdidas en el contenido de bixina, han sido reportadas en los extractos dependiendo de las condiciones de almacenaje. Balaswamy *et al.* (2006) evaluaron la pérdida de la bixina almacenada en forma de polvo u oleorresina, bajo tres diferentes condiciones de almacenamiento: frío y oscuridad, temperatura ambiente y oscuridad, temperatura ambiente y luz difusa. Las pérdidas cuantificadas por espectrofotometría, indicaron que éstas son elevadas en el caso del colorante en polvo en comparación con la oleorresina bajo todas las condiciones de almacenamiento evaluadas. La velocidad de degradación de la bixina resultó mucho más bajo en oleorresina en comparación con el colorante en polvo.

1.3.2 Biosíntesis de bixina

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides que tiene funciones biológicas claves en organismos superiores (Bouvier *et al.*, 2003). La ruptura oxidativa de carotenos deriva en varios fragmentos clasificados como apocarotenoides (Zaldívar-Cruz & Godoy, 2003). El apocaroteno más conocido producido a partir del β -caroteno y otros carotenoides es la vitamina A. Entre los productos catabólicos más importantes de los carotenoides, llamados diapocarotenoides, se cuentan la bixina y el azafrán, colorante principal del azafrán (Velíšek *et al.*, 2007). Los apo o diapocarotenoides actúan como señales visuales o volátiles para atraer agentes polinizadores y dispersores de semillas. Son compuestos formados por la remoción de fragmentos del esqueleto (usualmente por ruptura oxidativa) a partir de carotenoides (Bouvier *et al.*, 2005).

Jako *et al.* (2002) hipotetizaron de acuerdo a la abundancia y tipo de EST's que existían un número de genes estructurales involucrados en la biosíntesis de bixina comenzando por el principal carotenoide de la ruta, el licopeno, y que esos genes deberían ser similares a los que codifican para dioxigenasas, aldehído oxidasas, aldehído deshidrogenasas o metiltransferasas. Basado en lo anterior, generaron EST's (Expressed Sequence Tag) a partir de una biblioteca de ADNc obtenida de la cubierta de semillas, para analizar la expresión de genes durante el desarrollo de las semillas e identificar los genes de la biosíntesis de bixina. El análisis de los EST's permitió la identificación de varios de estos genes, correspondientes a muchas de las enzimas de la ruta biosintética de carotenoides incluyendo 1-dioxi-D-xilulosa-5-fosfato de la ruta plastidial-MEP (ruta de MEP-Piruvato), proteínas de la caja MADS (enzimas involucradas en la dehiscencia o indehiscencia del fruto), así como un número de genes que codifican para dioxigenasas, aldehído deshidrogenasas y carboxil metiltransferasas fueron también identificados, siendo éstos últimos genes de relevancia.

Aparentemente, en analogía con la síntesis del ácido abscísico (ABA), en la ruta de síntesis de bixina está implicada una dioxigenasa cuya acción enzimática actúa sobre el licopeno derivando en grupos de aldehídos, los cuales son oxidados a su vez en carboxilos debido a la acción de una aldehído deshidrogenasa, siendo uno de ellos metilado probablemente por una carboxil metiltransferasa (Jako *et al.*, 2002).

Jako *et al.* (2002) mencionaron que la expresión funcional de las clonas de ADNc deberían ser evaluadas en un huésped heterólogo. Bajo estas premisas, un estudio usando técnicas moleculares y un sistema de complementación en *Escherichia coli*, fue desarrollado por Bouvier *et al.* (2003), donde los probables genes involucrados en la biosíntesis de bixina fueron clonados y funcionalmente caracterizados en un cepa de *E. coli* productora de licopeno. La identificación del primer gen que gobierna la síntesis de bixina, se realizó mediante la síntesis de cDNA por RT-PCR utilizando el mRNA aislado de semillas maduras de *B. orellana* y cebadores diseñados a partir de las secuencias heterólogas de *CsZCD* (dioxigenasa de zeaxantina de *Crocus sativus*). Una secuencia de dioxigenasa se aisló a partir de una biblioteca de cDNA. La dioxigenasa (*BoLCD*) fue específica del licopeno, pues no mostró actividad catalítica en β -caroteno o zeaxantina. Por lo tanto, *BoLCD* aparentemente no es un sustrato promiscuo, como por ejemplo, *CCD1* (carotenoide dioxigenasa) de *Arabidopsis*. Esto sugirió que el paso inicial de la biosíntesis de bixina involucraría la conversión del licopeno en un grupo de aldehído, sin embargo subsecuentes reacciones involucran la acción de una aldehído deshidrogenasa y una carboxil metiltransferasa. Los genes aldehído deshidrogenasa (*BoBADH*) y carboxil metiltransferasa (*BonBMT*), que median la acumulación del apocarotenoide bixina, fueron clonados de *B. orellana* usando oligonucleótidos derivados de otras secuencias de plantas por RT-PCR. Los productos de PCR fueron usados para aislar dichos genes a partir de una biblioteca de cDNA. Usando los productos de los tres genes y co-transformando una cepa de *Escherichia coli* productora de

licopeno se pudo obtener la bixina, acumulándose en niveles moderados en un huésped heterólogo demostrando así la función de estos genes en la producción del pigmento (Fig. 1.8).

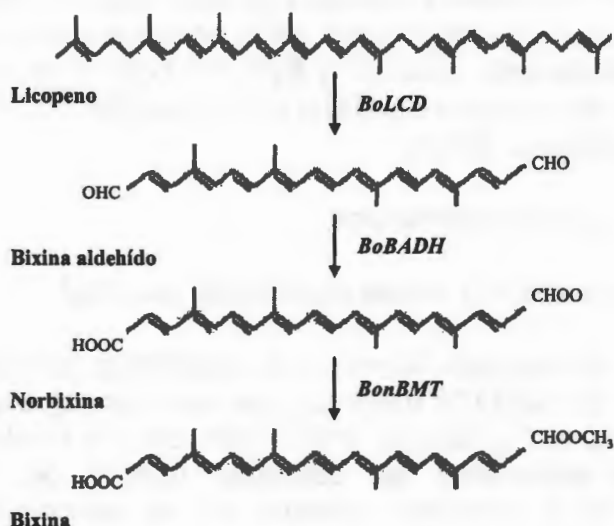


Figura 1.8 Ruta propuesta para la biosíntesis de bixina. Las letras *BoLCD*, *BoBADH*, *BonBMT* representan las enzimas dioxigenasa, aldehído deshidrogenasa y carboxil metiltransferasa, respectivamente (Bouvier et al., 2003).

1.4 Distribución del cultivo

El cultivo del achiote se extiende desde los trópicos de África y Asia, hasta las regiones cálidas de países como India, Filipinas, Hawaii, Kenya, Tanzania, Malawi, Sri-Lanka y Angola. La mayor producción se concentra en el Caribe y América Latina: Perú, Colombia, Brasil, Venezuela, Guyana Francesa, Jamaica, República Dominicana, Haití, Puerto Rico, México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá (CONAFOR, 2003; Ingram, 1969). En México, los principales estados que cultivan el achiote son: Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Veracruz y Yucatán.

En cada sitio en donde se cultiva *B. orellana*, el rendimiento promedio de una plantación depende del suelo y de la edad de la planta, entre otras variables (como la cantidad de árboles sembrados por hectárea). El número de plantas sembradas/ha varía entre 1000-2500 plantas y en promedio se obtienen 1000 kg/ha de frutos secos, o hasta 2000 en condiciones óptimas. La semilla representa entre 50 y 60% del peso total, es decir, en promedio se obtienen de 500 a 600 kg/ha (Díaz & Oyola, 2002; Perez & Becerra, 2003).

1.5 Importancia económica

1.5.1 Producción y comercialización mundial

En 1996 el mercado europeo de colorantes naturales estaba estimado en US\$178 millones y se estimaba que para el año 2000 el consumo llegaría a 5,700ton (Díaz & Oyola, 2002). El potencial económico del colorante natural del achiote es elevado si el mercado previsto es de exportación. En el mercado mundial, el achiote, se comercializa en semilla, aunque desde 1980 aproximadamente, está creciendo el mercado de extractos con valor agregado, estos últimos en varias formas y procesamientos difiriendo en concentración de pigmentos (Bernal & Correa, 1989).

El uso industrial y la amplia distribución de *B. orellana* ha impulsado a diversos países a la tarea de producir, y en el mejor de los casos a exportar a otras regiones del mundo (Hernández *et al.*, 1988). Mundialmente, la producción promedio anual de semillas de achiote es aproximadamente de 10⁴ ton, de las cuales 60% provienen de América Latina, 27% de África y 12% de Asia (Bittencourt *et al.*, 2005). Los precios de semilla de achiote dependen de la producción y variaron entre 1985 y 1995, desde \$22,000.00 M.N. hasta \$6,600.00 M.N por tonelada. Cabe señalar que los precios son proporcionales al contenido de bixina, que en cualquier caso deben de ser superiores al 2.7% (Giuliano *et al.*, 2003).

El cultivo y manejo a nivel comercial del achiote es practicado principalmente en Perú y Costa Rica. Entre otros países productores se encuentran India, Panamá, Ecuador y Japón (Bernal & Correa, 1989). Los principales importadores de achiote son Estados Unidos, Europa Occidental y Japón, y el principal exportador es Perú (Díaz & Oyola, 2002). En este mismo sentido, la producción comercial del cultivo de achiote en México ha sido escasa teniendo que recurrir a importaciones crecientes provenientes de Brasil, Colombia y Perú, aún a pesar de su distribución en el país. De acuerdo al censo de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, en México *B. orellana* presenta una distribución preferencial en el sureste del país, siendo los principales estados que se dedican a la producción de semilla: Campeche (515 ton.), Quintana Roo (721 ton.), Tabasco (35 ton.) y Yucatán (147 ton.) (Pérez & Becerra, 2003).

1.6 Usos y aplicaciones del achiote

1.6.1 Uso industrial

Bixa orellana, presenta cada vez más aplicaciones en la elaboración de diversos productos. En la industria alimentaria, se ha utilizado en gran medida, siendo sus principal empleos en: la coloración de productos lácteos, margarinas, mantequillas, carnes, chocolates, palomitas de maíz, grasas, aceites, bocadillos, helados, aderezos, caramelos, yogurt, bebidas, fideos y derivados del pescado. Del mismo modo ha sido empleado tradicionalmente en la pigmentación de diversos platillos en países de América Latina (Ramos-Solórzano, 1991; Mercadante *et al.*, 1997). Especialmente a nivel nacional en la región de Yucatán, el uso de las semillas de achiote junto con otras especias es empleado para la preparación de muchos platillos regionales.

En la industria farmacéutica, la bixina posee especial importancia como protector solar y repelente de insectos (Ramos-Solórzano, 1991; Godoy, 2000), hecho por el cual se

investigan actualmente los aceites esenciales extraídos de las semillas. En menor proporción, se ha incluido en la manufactura de productos de diversa índole, como son: ceras, maderas, marfiles, pieles, lacas, jabones, textiles, cosméticos, labiales, sombras, barniz de uñas y derivados (Poveda, 1983). Las aplicaciones o usos industriales de *B. orellana*, radican en sus diversas propiedades.

1.7 Potenciales aplicaciones en medicina

Bixa orellana, presenta un sin número de beneficios a la salud humana, además de los nutrientes contenidos en la semilla (Devia & Saldarriaga, 2003). Diversos estudios comprueban el potencial antigénico y antimutagénico que presenta la norbixina, caroteno producido y almacenado en la cubierta de la semilla, contra el estrés oxidativo. El extracto de norbixina reduce diez veces el daño provocado a células de *Escherichia coli* expuestas a la radiación UV aportando propiedades en el combate contra el cáncer (Júnior *et al.*, 2005). Adicionalmente, a las propiedades antioxidantes que presenta la norbixina, estudios en conejos demuestran el poder que tienen en la reducción de lípidos: bixina, norbixina y queratina, así como los flavonoides (7-glicosilapigenina, 7-bisulfato-apigenina, 7-glicosil-luteolina, 7-bisulfato-luteolina) aislados a partir de semillas de *B. orellana* (Lima *et al.*, 2001). Lo anterior se evaluó tras la inducción hiperlipidemia en conejos y posterior reducción del contenido de lípidos, debido a la administración efectuada de 0.01 mol/kg de las sustancias evaluadas.

El efecto inhibitorio ante el veneno por mordeduras de serpientes (*Lachesis muta*, *Crotalus durissus cumanensis*, y *Micrurus mipartitus*), representa otro beneficio medicinal que brinda *B. orellana*, cuyos extractos etanólicos obtenidos a partir de hojas y ramas, fueron preincubados con el veneno de cada serpiente e inyectados vía peritoneal en ratones. El estudio demostró la neutralización del efecto tóxico del veneno por los extractos (Núñez *et al.*, 2004).

El poder antiglicémico que presenta *B. orellana*, también ha sido analizado en especies caninas mediante la aplicación de extractos de aceite soluble de semillas secas obtenido de su purificación a través de HPLC y TLC. La reducción de la cantidad de glucosa en la sangre, el incremento en la concentración de insulina en el plasma, así como la unión de insulina al ligando receptor, fueron constatadas en los estudios al realizar la prueba oral de tolerancia a glucosa (OGTT) (Russell *et al.*, 2005).

Así como los extractos de *B. orellana* reducen la concentración de glucosa, también se ha demostrado la reducción de los niveles de colesterol en el plasma, tras la ingesta del colorante en aves de corral, en donde los huevos mostraron la reducción de los niveles de colesterol, incrementando el contenido de tocoferoles los cuales a su vez, regulan de manera negativa el gen HMGCoA involucrado en la síntesis de colesterol (McGonigle & McCracken, 2002).

1.8 Mejoramiento genético

Los seres humanos desde hace más de 10,000 años han modificado las características de plantas y animales, dando lugar a cientos de miles de razas domesticadas que hoy día, constituyen la base del suministro mundial de alimentos. El proceso de domesticación, deliberada o conscientemente, cambia dramáticamente el rendimiento y la arquitectura genética de la especie ancestral, a través del proceso de hibridación y selección como había descrito Charles Darwin en 1859 (McCouch, 2004).

Basado en estos principios, surge el mejoramiento de plantas, como una disciplina científica desde principios de este siglo (Shewry & Lazzeri, 1996), donde el trabajo del mejorador de plantas es la creación de una variedad mejorada (McCouch, 2004). Esto se logra mediante la selección de individuos de acuerdo al interés buscado entre una gama de genotipos existentes, para realizar su hibridación, o bien la realización de un intercambio eficiente, sustitución o recombinación de su

material genético, para obtener individuos de un sistema biológico vigorosa y productivamente, con nuevos arreglos de genes que confieren características superiores a cualquiera de los padres en el contexto de un entorno agrícola (McCouch, 2004; Shewry & Lazzeri, 1996).

El mejoramiento se lleva a cabo en función a objetivos planteados, los cuales giran en torno a la viabilidad biológica, demanda de consumo, y la economía de producción (McCouch, 2004). El proceso de mejoramiento de plantas es teóricamente simple y se podría reducir a dos pasos fundamentales:

1. Generar una población de mejoramiento (breeding population), altamente variable en sus características agrícolamente importantes. Esto se lleva a cabo identificando padres que poseen características complementarias, para después realizar la polinización cruzada de éstos. La cruce es el mecanismo por el que los genes son intercambiados entre los padres, así las características diferenciales de los parentales se reasocian o segregan en combinaciones potencialmente nuevas y mejoradas en la descendencia (Manshardt, 2004; Sleper & Poehlman, 2006).
2. Seleccionar e identificar entre la progenie segregante los individuos que combinan las mejores características de los padres.

La identificación de los parentales se realiza de acuerdo a sus características morfológicas. Esto se lleva a cabo identificando las características que poseen los parentales que se complementan con el otro parental, esto es, las cualidades de un parental tienen la capacidad de superar las deficiencias del otro y por la polinización cruzada los parentales inician su recombinación (Manshardt, 2004).

1.8.1 Estudios morfológicos en *Bixa orellana*

Las características morfológicas, estiman la variabilidad que se expresa en características visibles y que conforman el fenotipo

del germoplasma de partida. El desarrollo de este tipo de estudios se realiza empleando descriptores morfológicos, los cuales se definen como una característica o atributo cuya expresión es fácil de identificar, medir, registrar o evaluar y que hace referencia a la forma y estructura de una población (Hidalgo, 2003).

Las características morfoagronómicas, particularmente, corresponden a los caracteres morfológicos (cualitativos o cuantitativos) que son relevantes en la utilización de las especies cultivadas, para identificar las necesidades agronómicas, de mejoramiento genético, de mercadeo y consumo. Entre éstos caracteres se encuentran la forma de las hojas; pigmentaciones en raíz, tallo, hojas y flores; color, forma y brillo en semillas; tamaño, forma y color de cápsulas; arquitectura de planta expresada en hábitos de crecimiento y tipos de ramificación; así como descriptores relacionados con componentes de rendimiento, para proporcionar a los fitomejoradores indicación del potencial de este carácter. En su gran mayoría, estos descriptores tienen aceptable heredabilidad (Hidalgo, 2003).

Arce (1999) identificó algunas características morfoagronómicas en *B. orellana*, dentro de las cuales se citan: color de la flor, tamaño (longitud y ancho), espinosidad y color de la cápsula, número promedio de semillas por cápsula, contenido de bixina, dehiscencia o indehiscencia, así como disposición de las cápsulas en la planta y tamaño de la misma.

Estos descriptores se han empleado para desarrollar diversos estudios, tal como el desarrollado por Medina *et al.* (2001a), a partir de cápsulas de achiote (*Bixa orellana* L.) en una población de 32 accesiones procedente de cinco regiones de Venezuela y de Brasil. El análisis estadístico realizado en las variables de fruto evaluadas indicó que las accesiones se separaron en función al tamaño de cápsula, espinosidad y tamaño de semilla. Por otra parte, se asociaron las variables espinosidad, longitud de espinas, dehiscencia y forma de ápice; y de manera proporcional las variables tamaño de cápsula y

semilla y las cápsulas dehiscentes con semillas de color marrón.

Mazzani *et al.* (2002) utilizaron los mismos descriptores y algunos otros descritos por ellos mismos respecto a la morfología de la cápsula, en una colección de ocho introducciones recolectadas en comunidades locales e indígenas de Venezuela. Los estudios realizados mostraron interesantes resultados que versan en que la enfermedad del *mildiu polvoriento* afecta de manera negativa el rendimiento estimado, debido a que los individuos con ramificación más densa (muchas ramas principales, secundarias y terciarias) presentan un mayor ataque de este patógeno. Por otra parte, los frutos con ápice puntiagudo presentaron menor dehiscencia que los de ápice apiculado y los frutos con menor indehiscencia mostraron una mayor densidad de espinas. A mayores dimensiones del fruto, menor es el número de cápsulas presentes en la panícula. Los análisis realizados revelan el valor de esos recursos para ser usados como fuente de germoplasma para trabajos de mejoramiento y otros en esta especie, debido a la morfología contrastante encontrada.

Sin embargo, limitado esfuerzo se ha hecho en el pasado para clasificar a los cultivares en base al contenido de bixina y características morfológicas. Los individuos de *B. orellana* deben evaluarse en función al rendimiento (contenido de bixina > 2.7%) e indehiscencia de la cápsula, debido a que la exposición directa del arilo de las semillas a la radiación solar, disminuye el contenido de bixina (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Esta investigación facilitaría la rápida y adecuada selección de genotipos parentales para su futuro mejoramiento genético. En este sentido, Rivera-Madrid *et al.* (2006) desarrollaron un método de polinización artificial en *B. orellana*, para realizar la cruce de los parentales seleccionados, manipulando procesos como la polinización y la interacción polen-pistilo.

1.8.2 Estudios básicos en *Bixa orellana*

1.8.2.1 Citogenética

El conocimiento de aspectos citogenéticos básicos como el número básico esporofítico y gametofítico, cariotipo, anomalías en mitosis y meiosis, y el desarrollo de biotecnologías modernas como la manipulación de protoplastos, células y tejidos *in vitro*, y la manipulación directa del material hereditario (ADN); ofrecen al mejorador herramientas adicionales, para lograr la obtención de líneas homocigotas, producción de semilla híbrida, creación y mantenimiento de nuevas combinaciones de genes, entre otros (Camadro, 2003; Jauhar, 2001).

El desarrollo de estos estudios citogenéticos, es especialmente útil en programas de mejoramiento, donde se persigue la producción de plantas haploides mediante la inducción de embriogénesis a partir de microsporas (Michelangeli *et al.*, 2002). En este sentido, Michelangeli *et al.* (2002), determinaron mediante el estudio de los eventos citogenéticos básicos en *B. orellana*, en el momento de mayor división meiótica, que el número cromosómico haploide a partir de células madre de las microsporas en metafase I, es de $n=8$ cromosomas. Años posteriores y contraponiendo el reporte de Michelangeli *et al.* (2002), De Almeida *et al.* (2006), realizaron estudios citogenéticos en *B. arborea* y *B. orellana*, a través de los cuales demostraron en cromosomas prometafásicos y metafásicos, que citogenéticamente estas especies son similares a pesar de sus características morfológicas contrastantes. Los análisis citogenéticos, de las dos especies presentaron $2n=2x=14$, siendo 5 metacéntricos (1, 2, 3, 4 y 6) y 2 pares de cromosomas sub-metacéntricos (5 y 7). Las diferencias en el número cromosómico, se deben probablemente a la posible ruptura en su constricción secundaria del cromosoma 1, resultando en dos fragmentos, durante las preparaciones, hecho que podría derivar en mediciones erróneas (Morawetz, 1986).

Recientemente Martín-Rodríguez (2007), (estudiante del CICY, de nuestro grupo de investigación) estableció las condiciones metodológicas para analizar el cariotipo de los genotipos de *B. orellana* con el fin de contar con un método que permita desarrollar estudios citogenéticos más extensos en diferentes genotipos e investigar la posible variación en el número cromosómico del achiote, de acuerdo a los reportes de Michelangeli *et al.* (2002) y De Almeida *et al.* (2006).

1.8.2.2 Cultivo de tejidos *in vitro*

La regeneración *in vitro* de *B. orellana* puede ser usada para la producción de genotipos productivos y de alto rendimiento y poder acelerar programas de mejoramiento (Parimalan *et al.*, 2007). En este sentido, D'Souza & Sharon (2000), multiplicaron directamente explantes meristemáticos de brotes apicales y nodos de plántulas germinadas *in vitro*, para la obtención de plantas completas, consiguiendo así la propagación clonal *in vitro* de *B. orellana*. Basado igualmente en la organogénesis directa, Parimalan *et al.* (2007), desarrollaron un protocolo con significativa respuesta a la organogénesis a partir de hipocotilos de raíz, segmentos de hipocotilos y tejido cotiledonario de *B. orellana*, obteniendo plantas completas al final del cultivo *in vitro* de los explantes.

Por otra parte, la embriogénesis directa reduce el tiempo requerido para la propagación de la planta, que puede ser benéfica para minimizar los cambios genéticos inducidos en el cultivo. Adicionalmente, el proceso de embriogénesis somática ofrece un medio para propagar un gran número de clonas élites (Paiva Neto *et al.*, 2003). En este sentido, Paiva Neto *et al.* (2003), realizaron la inducción de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros de achiote. A pesar de que un alto número de embriones somáticos fallaron en desarrollar plantas saludables; el protocolo desarrollado representa un avance benéfico para la propagación en masa de clonas elite seleccionadas. El establecimiento de diversas metodologías de embriogénesis u organogénesis, es necesario

para la transferencia de un gen o genes por ingeniería genética, selección y regeneración de plantas transformadas. Basándose en estos estudios, Zaldívar-Cruz *et al.* (2003) transformaron transitoriamente segmentos de hipocotilos de dos variedades de *B. orellana* mediante *Agrobacterium tumefaciens*, para la introducción de nuevas características.

1.8.2.3 Contenido de ADN

El conocimiento del contenido de ADN nuclear es necesario para los estudios moleculares que impliquen el análisis o modificación del material genético con fines de mejoramiento genético. El contenido de ADN nuclear afecta un amplio rango de características, incluyendo tasa de división celular, sensibilidad a la radiación, comportamiento ecológico en comunidades de plantas y medio óptimo para cultivos (Bennett & Smith, 1976; Bennett & Leitch, 1995).

Las angiospermas poseen el menor contenido de ADN nuclear. El de *B. orellana*, es uno de los de menor cantidad entre las angiospermas evaluadas por Fay *et al.* (2005) (1C = 0.20pg) (1C = approx. 0.1 a 127.4pg [1pg = 980Mb]; 1C es la cantidad de DNA en el núcleo gamético no replicado de un organismo). Estimaciones adecuadas de tamaños de genoma nuclear y niveles de ploidía son necesarias, para el mapeo de genomas de plantas y para desarrollar estrategias para el mejoramiento genético (Arumuganathan & Earle, 1991).

En este sentido, Portela de Carvahlo *et al.* (2005a) indujeron *in vitro* la poliploidía en achiote, para duplicar el complemento de cromosomas en cruzas híbridas interespecíficas empleando segmentos de hipocotilos y nodos cotiledonarios de plántulas de achiote crecidas *in vitro*. Poliploidía ha sido considerada de manera especial en la disciplina del mejoramiento genético, por conceptos tales como: "buffering" del genoma, incremento de la diversidad alélicas, incremento de heterocigosidad, y la oportunidad de nueva variación genotípica a partir de la duplicación de genes adquiriendo una nueva función (Stebbins, 1950).

1.8.3 Estudios genético-moleculares en *Bixa orellana*

Desde hace varios años, el grupo de la Dra. Rivera en UBBMP-CICY, ha desarrollado estrategias para el mejoramiento genético del achiote, y así obtener el mayor aprovechamiento de los metabolitos que esta planta sintetiza, debido a que la variación contrastante en los rendimientos y en la calidad sus pigmentos ha sido uno de los principales retos a vencer (Michelangeli *et al.*, 2002; Rivera-Madrid *et al.*, 2006).

El advenimiento de los marcadores moleculares, ha hecho posible la exploración molecular de las poblaciones de la cual se seleccionarán los parentales. Seleccionando parentales genéticamente similares, se restringe la cantidad de variación que será evaluada en la descendencia. Por otro lado, cruzando padres divergentes genéticamente, el rango de variación fenotípica sería mucho más extensivo e interesante, con muchos individuos que pudieran no esperarse basados en los atributos de los padres (McCouch, 2004; Manshardt, 2004).

Sin embargo, aún no se ha desarrollado en *B. orellana* el análisis genético-molecular mediante técnicas de marcaje, basado en el uso de secuencias nucleotídicas y ADN, cuya variación (polimorfismo) (Ford-Lloyd & Painting, 1996; Karp & Edwards, 1997), es utilizada en el mejoramiento convencional, para facilitar la selección de los parentales genéticamente diferentes (Rodríguez & Arencibia, 2002), debido a que permite establecer diferencias o similitudes entre individuos de una misma especie, en función a la identificación de productos y/o composición genómica (Hidalgo, 2003). También se emplea para evaluar la diversidad genética, identificar duplicados en las colecciones (Pérez-Vega, 1993), estimar la tasa de entrecruzamiento, generar mapas genéticos (Weising & Kahl 1997) de parentales y progenie segregante de la cruce, e identificar los loci de características cuantitativas (QTL) y asistir en el mejoramiento genético (MAS) (Rodríguez & Arencibia, 2002).

En este sentido únicamente se han desarrollado estudios empleando isoenzimas, como el llevado a cabo por

Medina *et al.* (2001b), a través del cual identificaron y determinaron la variabilidad genética existente en una población de genotipos de *B. orellana* colectados en cinco regiones de cultivo localizadas en Venezuela y Brasil. Los estudios realizados a través de la comparación simultánea de patrones electroforéticos de proteínas hidrosolubles e isoenzimas específicas (α -esterasa, β -esterasa y peroxidasa) permitieron la caracterización de 34 de los 36 genotipos. Los patrones obtenidos manifestaron un alto grado de polimorfismo, reflejo de la heterogeneidad existente en la población estudiada.

Portela de Carvahlo *et al.* (2005b) desarrollaron estudios para determinar la variabilidad isoenzimática en accesiones de un germoplasma de Brasil. El porcentaje de loci polimórficos ($P = 21.05$), fue bajo comparado con otras especies tropicales, sin embargo, las distancias genéticas de Nei empleadas para la construcción del dendograma claramente separaron a las accesiones de acuerdo a su ubicación geográfica.

1.8.3.1 Polimorfismo Amplificado de Secuencia Relacionada (SRAP)

Debido a la amplia gama de marcadores moleculares es necesario elegir el sistema indicado en base a sus propiedades, entre las cuales se encuentran: la reproducibilidad, facilidad y rapidez en su ejecución, la capacidad para detectar bandas polimórficas; el carácter dominante y codominante; el número de alelos que pueden ser detectados y la distribución uniforme en todo el genoma (exceptuando aquellos cuya exploración involucra un locus específico), lo cual lo constituye el número de marcadores que pueden ser generados en una simple reacción (Ford-Lloyd & Painting, 1996; Rodríguez & Arencibia, 2002).

Los marcadores SRAP constituyen un sistema de marcación molecular fundamentado en la detección de marcos de lectura abierta (ORF) a partir de la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), empleando dos

cebadores específicos. Los cebadores son de 17 a 18 nucleótidos de largo y constan de los siguientes elementos: una secuencia centro de 13 a 14 bases, donde las primeras 10 ó 11 bases que inician en la terminación 5', son secuencias de constitución no específica, seguido de la secuencia CCGG en el cebador en-sentido y AATT en el cebador anti-sentido. Las secuencias CCGG y AATT de los cebadores han sido halladas con frecuencia en regiones de exones, intrones y promotores. Por tanto, los fragmentos de ADN amplificados durante la PCR, corresponden a menudo a secuencias codificantes. Por otra parte, los primeros ciclos de la PCR se realizan a temperaturas de alineamiento bajas (35°C), permitiendo que gran número de fragmentos de ADN puedan ser amplificados y asegurados de manera específica y reproducible en los posteriores ciclos en donde la temperatura de alineamiento se incrementa a 50°C (Li & Quiros, 2001).

Debido a lo anterior, los marcadores SRAP detectan fragmentos de ADN con alta resolución, polimorfismo y reproducibilidad así como elevado número de marcadores dominantes (80%). La fácil selección, simplicidad y fidelidad del sistema, favorece la amplificación y el subsecuente aislamiento de secuencias codificantes (Li & Quiros, 2001).

Las características mencionadas han sido determinantes para utilizar el sistema SRAP en análisis taxonómicos y genotípicos, así como para generar mapas genéticos, analizar varios aspectos de la biología poblacional (paternidad, flujo de genes) y mejoramiento de plantas (determinación de híbridos) en donde el empleo de marcadores que proporcionan alto contenido de información (polimorfismo genético) es importante (Li & Quiros, 2001).

El marcador molecular SRAP ha sido utilizado en estudios de caracterización y diversidad genética. Mengyao *et al.* (2008), emplearon dos sistemas de marcaje (SRAP y SSR) para evaluar la diversidad molecular en 19 cepas del hongo *Auricularia polytricha*. Un total de 202 (99.0%) y 459 (95.9%) de bandas polimórficas fueron detectadas mediante las combinaciones de 13 y 14 combinaciones de cebadores SSR y

SRAP, respectivamente. Los resultados demostraron que el marcador molecular SRAP es más eficiente y superior a SSR, aunque ambos métodos resultaron útiles en la discriminación entre las cepas de *A. polytricha*.

El polimorfismo de Radix *Plygoni Multiflori* in Chongqing, también fue detectado por medio del marcador molecular SRAP, a través del cual evaluaron la divergencia entre 16 poblaciones. Las 104 combinaciones de cebadores SRAP detectaron 250 bandas polimórficas. Los resultados del estudio demostraron la potencial aplicación de SRAP para la identificación genética de Radix *Plygoni Multiflori* (Cheng *et al.*, 2007).

Shu-Jing *et al.* (2006) emplearon el marcador molecular SRAP para analizar la diversidad molecular de una colección de 31 accesiones de morfotipos representativos y tipos no clasificados de cepas de *Ganoderma*, y de esta manera eliminar la confusión en la taxonomía de este hongo. Los resultados experimentales mostraron que 85 bandas polimórficas fueron detectadas usando seis combinaciones de cebadores. El análisis de cluster exitosamente categorizó las 31 cepas en cinco grupos. Los resultados revelaron la diversidad genética de las cepas y agrupación de acuerdo a los ambientes geográficos. De esta manera, el marcador SRAP puede ser utilizado en estudios taxonómicos de hongos.

En la utilización de SRAP ISSR, RAPD y SSR en *Buchloe dactyloides*, Budak *et al.* (2004) demuestran que el marcador molecular SRAP detectó, a diferencia de las otras técnicas de marcaje, el mayor número de bandas polimórficas, así como la mayor discriminación de fragmentos, además de que el carácter dominante de este marcador, favorece su elección en estudios de segregación y mapeo genético de esta especie.

El empleo de SRAP se ha desarrollado en un sin número de estudios científicos para la construcción de mapas genéticos en diferentes especies tales como algodón (Lin *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2007), *Cucumber* sp. (Wang *et al.*, 2005), *Brassica* sp. (Li & Quiros 2001; Chen *et al.* 2006; Chen *et al.*,

2007; Gao *et al.*, 2007; Okazaki *et al.*, 2007; Meng-yang *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007), caña de azúcar (Alwala *et al.*, 2007) y trigo (Li *et al.*, 2007), así como en el alineamiento gen a gen entre los genomas de *Arabidopsis* y *Brassica* (Li *et al.*, 2003).

Okasaki *et al.* (2007), Li *et al.* (2007), Gao *et al.* (2007), Lin *et al.* (2005), Chen *et al.* (2007), reportan que en la utilización de diferentes sistemas moleculares tales como RFLP, AFLP, SSR y SRAP, el marcador molecular SRAP detectó más del 50% del total de fragmentos polimórficos detectados en especies tales como algodón y *Brassica oleracea*, lo cual indica que pese a su carácter dominante, el marcador SRAP es eficiente para explorar el genoma, así como para detectar el polimorfismo genético, característica importante en la selección del marcador molecular a utilizar para la construcción del mapa genético.

Por otra parte, Valdez-Ojeda (2004) estandarizó las condiciones metodológicas necesarias para el desarrollo del sistema SRAP en *B. orellana*, que incluyó la selección de un método de extracción de ADN libre de polisacáridos, polifenoles y otros contaminantes, así como, la evaluación preliminar del polimorfismo en *B. orellana* mediante estos marcadores, facilitando así su empleo en estudios genético-moleculares para el mejoramiento genético de esta especie.

1.8.3.2 Sistemas de entrecruzamiento

El sistema de entrecruzamiento de las angiospermas, determina las vías por las cuales se producirán los cigotos: geitonogamia y/o xenogamia (Barret, 2003). En las especies que se polinizan por geitonogamia o autofertilización, el gameto masculino poliniza al gameto femenino de la misma flor, presentando menor diversidad genética y heterocigosidad entre las poblaciones. En las especies polinizadas por xenogamia o polinización cruzada, el gameto masculino de una flor poliniza al gameto femenino de otra flor, manifestando mayor diferenciación genética dentro de las poblaciones (Williams *et al.*, 2001).

Rodríguez & Enríquez (1983) mencionan que *B. orellana* se reproduce por polinización cruzada. Portela de Carvahlo *et al.* (2005b) al igual, sugiere que de acuerdo al índice de heterocigosidad encontrada en los loci polimórficos (Het = 0.28) esta especie es de polinización abierta donde los principales polinizadores son insectos, tales como las abejas Apidae-Melipona y las hormigas (Bentley, 1977).

Estudios desarrollados en la polinización artificial por Rivera-Madrid *et al.* (2006), demuestran que los granos del polen son liberados de la antera, antes de la receptividad del estigma, lo cual puede influir en el entrecruzamiento. Además, la realización de la autopolinización artificial, resultó en un 31.4% de los frutos formados, mientras que mediante la polinización cruzada en un 51.7%. Lo cual sugiere que *B. orellana*, se poliniza por los dos tipos de polinización. Cabe señalar que de acuerdo a los estudios de Rivera-Madrid *et al.* (2006) existe una diferenciación en el éxito de la polinización artificial basada en las variantes (flor color púrpura x flor color blanca).

Al respecto, Sleper & Poehlman (2006), señalan que muchos cultivos de especies que se reproducen por medios sexuales, pueden ser agrupados normalmente como: autopolinización o polinización cruzada. Estos grupos no son exclusivos, por el contrario, la polinización cruzada usualmente ocurre en cultivos normalmente clasificados como de autopolinización, y la autopolinización usualmente ocurre dentro de cultivos normalmente de polinización cruzada. Por lo que *B. orellana* puede ser catalogada como de polinización cruzada pero también puede ocurrir autopolinización. En este sentido, la realización de estudios moleculares permitirían determinar el porcentaje de ambos tipos de polinización en *B. orellana*, para lo cual se requiere la aplicación de marcadores moleculares, tal como se ha realizado en especies como *Moringa oleifera* (Muluvi *et al.*, 2004), *Eucalyptus urophylla* (Gaiotto *et al.*, 1997) y *Myracrodruon urundeuva* (Ferrer *et al.*, 2004), con el objetivo de entender los mecanismos hereditarios en la especie y diseñar los procedimientos de mejoramiento

para el cultivo de una especie en particular (Sleper & Poehlman, 2006).

1.8.3.3 Mapas genéticos

En el mejoramiento de plantas, el objetivo del cruzamiento de cultivares, es combinar, en un solo genotipo (probablemente no presente en la naturaleza), una serie de genes de caracteres deseables que poseen los parentales (Sleper & Poehlman, 2006). Los genes de los parentales segregan (marcadores o loci) mediante la recombinación de los cromosomas durante la meiosis (Paterson, 1996 citado por Semagn *et al.*, 2006; Coto & Cornide, 2002). Por tanto, la meiosis es importante para el mejorador porque (1) permite el mantenimiento del número de cromosomas, y (2) la recombinación y segregación de alelos contrastantes, en la siguiente generación (Sleper & Poehlman, 2005).

En la fase meiótica denominada Profase I, ocurre la *recombinación genética*. Durante la primera etapa meiótica, denominada leptoteno, el ADN duplicado en la fase S previa, en forma de cromátina se empaqueta y se condensa, haciéndose visible cada cromosoma con dos cromátidas hermanas idénticas unidas por un centrómero. Durante la segunda etapa de la profase I, en cigoteno, el par de cromosomas homólogos se alinea, y una de las cromátidas de cada par de homólogo, se atraen entre sí para iniciar el proceso de sinapsis entre cromátidas no-hermanas, formando un complejo sinaptonémico y con ello el intercambio o la recombinación de genes (Strickberger, 1978). Posterior a una sucesión de divisiones nucleares, los pares se mueven a un polo y el homólogo al polo opuesto, rompiéndose para formar gametos con una nueva recombinación de genes que difieren de cualquiera de los parentales (Semagn *et al.*, 2006). Por tanto, en el proceso meiótico, ocurre la reducción del número de cromosomas del número diploide ($2n$) de la célula madre megaspora, al número haploide (n) de las esporas (gametos) (Sleper & Poehlman, 2005).

El intercambio de segmentos cromosómicos, en un evento de entrecruzamiento, ocurre únicamente entre dos de las cuatro cromátidas de los cromosomas apareados. Las otras dos cromátidas se transmiten intactas a las células hijas. De esta manera, los valores de entrecruzamiento o recombinación nunca excederán del 50% (Sleper & Poehlman, 2005). Debido a que dos de las cromátidas no-hermanas, participan en el entrecruzamiento y las otras dos cromátidas no, se producen dos tipos de gametos: 1) si el entrecruzamiento no ocurre, los productos son gametos parentales y 2) si el entrecruzamiento ocurre, los productos son gametos recombinantes (Semagn *et al.*, 2006).

Cabe señalar, que cada cromosoma es un agregado de muchos genes, que tienden a ser heredados como un grupo, cuando los cromosomas son distribuidos a los gametos. La tendencia de los genes a ser heredados en grupo es conocido como *grupo de ligamiento*, y la colección de genes dentro de un solo cromosoma es un *grupo de ligamiento genético*. El número de grupos de ligamiento en cualquier especie es igual al número haploide de cromosomas. Si los genes en un cromosoma fueron completamente ligados pudieran no separarse, por tanto pudiera no haber recombinaciones entre los genes dentro del mismo grupo de ligamiento. Esto pudiera imponer severas restricciones para los mejoradores, porque no se podrían obtener nuevos genotipos de las recombinaciones de genes ligados, pero esta condición no existe, debido a que las recombinaciones de genes ligados ocurren como un resultado del proceso conocido como *crossing-over* o entrecruzamiento que ocurre durante la meiosis (Sleper & Poehlman, 2005).

Por otra parte, los genes segregan aleatoriamente en los gametos, de tal manera que la segregación de los alelos de un gen es independiente de los alelos de otro gen. Lo anterior, hace referencia a la segunda ley de Mendel: *la ley de segregación independiente*. Ésta se cumple para genes localizados en diferentes cromosomas, pero no siempre se cumple para genes que se encuentran en el mismo

cromosoma. Cuando dos genes se encuentran cercanos en el mismo cromosoma, éstos no segregan independientemente, es decir, están “ligados” (Semagn *et al.*, 2006; Mensúa, 2003; Ferrer *et al.*, 2004). Cuanto mayor sea la distancia entre los genes ligados, mayor será la frecuencia de que el entrecruzamiento ocurra, y el valor del entrecruzamiento será más alto. A partir de los porcentajes de entrecruzamiento, los mapas genéticos, que muestran la posición relativa de los genes en los cromosomas, han sido construidos para muchas especies (Carrera *et al.*, 2004; Paterson, 1996 citado por Semagn *et al.* 2006; Coto & Cornide, 2002). La proporción de las recombinaciones de dos genes cercanamente ligados, será más pequeña que la proporción de dos genes que se recombinan independientemente (Sleper & Poehlman, 2005).

La distribución de genes ligados en el bivalente, son denominados como *de acoplamiento* (distribución *cis*), en plantas F1 heterocigotas, si reciben alelos dominantes de un padre y alelos recesivos de otro padre. La condición donde la F1 heterocigota, recibe un alelo recesivo y un alelo dominante de un par ligado de un padre y la combinación contraria del otro padre es denominado como *de repulsión* (distribución *trans*) (Sleper & Poehlman, 2005). En especies diploides, la mayoría de gametos segregan en fase de acoplamiento (Semagn *et al.*, 2006), como puede ser el caso en *B. orellana*.

A continuación se describen los requerimientos para la construcción del mapa genético: 1) seleccionar dos padres divergentes genéticamente, que muestren claras diferencias genéticas para una o más características de interés (ej. los actuales padres pueden ser cultivares altamente productivos y comercialmente exitosos, pero que carezcan de la resistencia a enfermedades, que está presente en otro padre donador). Los padres deberían ser lo suficientemente divergentes y cercanos para exhibir polimorfismo y no: a) causar esterilidad de la progenie y/o b) mostrar muy altos niveles de distorsión a la segregación (proporciones genotípicas desviadas de las esperadas de acuerdo a la segregación genotípica mendeliana) durante el análisis de ligamiento; 2) seleccionar el tipo de

marcador molecular a utilizar para mapear a la población de mapeo; 3) explorar parentales por su polimorfismo y el genotipo de la población de mapeo y 4) realizar los análisis de ligamiento (calcular las frecuencias de recombinación entre marcadores, determinar los grupos de ligamiento, el ordenamiento de los genes dentro de cada grupo de ligamiento, estimar las distancias mapa, y determinar el orden del mapa) (Coto & Comide, 2002; Semagn *et al* 2006).

El mapa genético ayuda a determinar el número de genes que influyen en una característica y los efectos de los genes en la expresión de la característica. De igual manera, proporciona información de la evolución del genoma y ayuda a explicar la función, regulación y expresión de los genes (Lanceras *et al.*, 2001).

PREMISAS A RESOLVER

1. El contenido de bixina está asociado a caracteres como: tamaño, color, espinosidad, forma del ápice, e indehiscencia de la cápsula.
2. Es posible que la cruce de parentales con fenotipo de cápsulas indehiscentes vs. alto contenido de bixina permita estudiar la segregación alélica de los genes que controlan tales caracteres, y construir un mapa genético preliminar.
3. La alogamia es el principal tipo de polinización en *B. orellana*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecimiento de algunas bases genético-moleculares para el mejoramiento genético de *Bixa orellana*.

Objetivos específicos

1. Evaluar morfológicamente mediante descriptores morfo-agronómicos dos poblaciones de *B. orellana* en el estado de Yucatán, México.
2. Evaluar genéticamente dos poblaciones Yaxcabá y Cooperativa mediante marcadores moleculares SRAP.
3. Estimar la tasa de entrecruzamiento.
4. Efectuar la polinización cruzada empleando parentales seleccionados en función al contenido de bixina e indehiscencia del fruto.
5. Establecer las bases para construir un mapa genético de ligamiento a partir del análisis molecular de la población segregante.

LITERATURA CITADA

- Alwala, S.** (2007). *Predicting progeny performance and genome analysis in sugarcane (Saccharum spp)*. Dissertation, University of Louisiana.
- Arumuganathan, K. y E. D. Earle** (1991). *Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species*. Plant Molecular Biology Reporter, 9(3), 208-218.
- Arce, J.** (1990). *Recomendaciones para el Cultivo del Achiote (Bixa orellana)*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Programa Mejoramiento de Cultivos Tropicales. Costa Rica. Pp. 2-9.
- Arce, J.** (1999). *El achiote Bixa orellana L. cultivo promisorio para el trópico*. Earth, Costa Rica, 1-36 pp.
- Balaswamy, K., P. G. Prabhakara-Rao, A. Satyanarayana y D. G. Rao.** (2006). *Stability of bixin in annatto oleoresin and dye powder during storage*. LWT, Food Science and Technology, 39, 952–956.
- Barrett, S. C. H.** (2003). *Mating strategies in flowering plants: the outcrossing–selfing paradigm and beyond*. Philosophical Transactions of the Royal Society, 358, 991–1004.
- Bentley, B. L.** (1977). *The protective function of ants visiting the extrafloral nectaries of Bixa orellana (Bixaceae)*. Journal of Ecology, 65, 27–38.
- Bennett, M. D. y J. B. Smith** (1976). *Nuclear DNA amounts in angiosperms*. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 274, 227–274.
- Bennett, M. D. y I. J. Leitch** (1995). *Nuclear DNA amounts in angiosperms*. Annals of Botany, 76, 113–176.
- Bernal, H. Y. y Q. J. E. Correa** (1989). *Especies vegetales promisorias de los países del convenio*. Andrés Bello, Bogotá, Colombia. pp. 260-285.
- Bittencourt, C., M. P. Felicissimo, J-J. Pireaux y L. Houssiau** (2005). *Study of annatto from Bixa orellana seeds: an application of time-of-flight secondary ion mass spectrometry*, SpectroscopyEurope, 17(2), 16-22.

- Bouvier, F., O. Dogbo y B. Camara (2003).** *Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto).* Science, 300, 2089–2091.
- Bouvier, F., J-C. Isner, O. Dogbo y B. Camara (2005).** *Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants,* Trends In Plant Science, 10(4), 187-194.
- Budak, H., R. C. Shearman, I. Parmaksiz y I. Dweikat (2004).** *Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs and SRAPs.* Theoretical and Applied Genetic, 109, 280-288.
- Camadro, E. L. (2003).** *Biotecnología. Mejoramiento Genético de Hortalizas.* Revista IDIA XXI, 4, 14-18.
- Carrera, A., G. Tranquili y M. Helguera (2004),** Aplicaciones de los marcadores moleculares, en *Biotecnología y mejoramiento vegetal*, Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. (eds). ArgenBio, Consejo Argentino Para La Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. pp. 151-154.
- Cheng, Y. H., C. H. Zhou, A. F. Ma, X. G. Shi y X. C. Zhang (2007).** *SRAP study on genetic diversity of radix pilygoni multiflori in chongqing.* Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 32(8), 661-3.
- Chen, B. Y., X. M. Wu, G. Y. Lu, G. Z. Gao, K. Xu y X. Z. Li (2006).** *Molecular mapping of the gene(s) controlling petal-loss trait in Brassica napus.* Chinese, 28(6), 707-712.
- Chen, W., Y. Zhang, X. Liu, B. Chen, J. Tu y F. Tingdong (2007).** *Detection of QTL for six yield-related traits in oilseed rape (Brassica napus) using DH and immortalized F2 populations.* Theoretical and Applied Genetic, 115, 849–858.
- CONAFOR (2003).** *6th Regional Meeting of Forestry Consultants and Forest Extension Service*

- Organizations*, Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), November 25, 2003, Mérida, Yucatan, Mexico
- Córdoba, V. J. A.** (1987). *El Achiote; Cultivo, Beneficio y Posibilidades de Exportación*. Revista Esso Agrícola, 44(1), 3-7.
- Coto, O. y M. T. Cornide** (2002). "Principales aplicaciones de los marcadores moleculares", en *Marcadores moleculares nuevos horizontes en la genética y selección de las plantas*, Cornide, H. M. T. (ed), Félix Varela. pp. 92-95
- De Almeida, P. M., C. R. Carvalho y W. R. Clarindo** (2006). *Classical and Molecular Cytogenetic Tools to Resolve the Bixa Karyotypes*. Cytologia, 71(4), 391–398.
- De Oliveira, T. T., T. J. Nagem, R. M. Da Costa, L. M. Da Costa, N. M. Magalhães, P. C. Stringheta, Q. E. De Lima, K. G. H. De Moraes y V. H. Da Silva** (2004). *Propiedades biológicas de los tintes naturales*. Ars Pharmaceutica, 45(1), 5-20.
- Devia, P. J. E. y C. L. Saldarriaga** (2003). *Planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote (Bixa orellana)*, Revista Universidad EAFIT, 39(131), 8-22.
- Díaz, J. A. y J. Oyola** (2002). *Sondeo del mercado internacional de Achiote (Bixa orellana L)*, Instituto de Recursos Biológicos, Alexander von Humboldt, Bogota, Colombia. pp. 32.
- Donkin, R. A.** (1974) *Bixa orellana: The eternal shrub*. Anthropos, 69(1/2), 33–56.
- Fay, M. F., R. S. Cowan y I. J. Leitch** (2005). *The Effects of Nuclear DNA Content (C-value) on the Quality and Utility of AFLP Fingerprints*. Annals of Botany, 95, 237–246.
- Ferrer, M. M., L. E. Eguiarte y C. Montaña** (2004). *Genetic structure and outcrossing rates in Flourensia cernua (Asteraceae) growing at different densities in the South-western Chihuahuan Desert*. Annals of Botany, 94, 419–426.

- Ford-Lloyd, B. y K. Painting** (1996). *Measuring genetic variation using molecular markers*. The International Plant Genetic Resources Institute, 5-39.
- Gaiotto, F. A., M. Bramucci y D. Grattapaglia** (1997). *Estimation of outcrossing rate in a breeding population of Eucalyptus urophylla with dominant RAPD and AFLP markers*. Theoretical and Applied Genetic, 95, 842-849.
- Gao, M., G. Li, B. Yang, D. Qiu, M. Farnham y C. Quiros** (2007). *High-density Brassica oleracea linkage map: identification of useful new linkages*. Theoretical and Applied Genetic, 115, 277-287.
- Giuliano, G., C. Rosati y P. Bramley** (2003). *To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled*. Trends in Biotechnology, 21(12), 513-515.
- Godoy, G.** (2000). *El achiote: una especie subexplotada*. Ciencia y Desarrollo, 26(152), 34-39.
- Hernández, T., R. Trujillo, E. Arévalo y J. Hernández** (1988). *Sistemas de producción de achiote en la amazona peruana*. Proyecto promoción agroindustrial y desarrollo rural. Tingo María, Perú. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. Oficina de Servicios de Proyectos. pp. 12-33.
- Hidalgo, R.** (2003) "Variabilidad Genética y Caracterización de Especies Vegetales", en *Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos filogenéticos*, Franco, T. L. y Hidalgo, R. (ed). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. pp. 2-9.
- Ingram, J. y B. J. Francis** (1969). *The annatto free (Bixa orellana L) a guide to its occurrence, cultivation, preparation and uses*. Tropical Science Biolabs, 11(2), 97-102.
- Jako, C., C. Coutu, I. Roewer, D. W. Reed, L. E. Pelcher y P. S. Covello** (2002). *Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of Bixa orellana (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis*. Plant Science, 163, 141-145.

- Jauhar, P. P.** (2001) *Genetic engineering and accelerated plant improvement: Opportunities and challenges*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 64, 87–91.
- JECFA** (2003). *Evaluation of certain food additives and contaminants*. Sixty-first meeting Report of the joint FAP/WHO expert committee on food additives. Technical Report Series, 683.
- Johnson, A. y M. Peterson** (1974). Encyclopedia Technology. The Avi Publishing Company. Westport, USA.
- Jondiko, I. J. y G. Pattenden** (1989). *Terpenoids and apocarotenoid from seeds of Bixa orellana*. Phytochemistry, 28, 3159-3162.
- Júnior, A. C. T. S., L. M. B. O. Asad, E. B. De Oliveira, K. Kovary, R. A. Nasser y I. Felzenszwalb** (2005). *Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress*. Genetic and Molecular Research, 4(1), 94-99.
- Karp, A. y K. Edwards** (1997). "DNA markers: a global overview", in *DNA Makers: Protocols, Applications and Overviews*, Caetano-Anollés, G. and P. Gresshoff (eds), Wiley-Liss, Inc. New York. pp. 1-8.
- Lanceras, J. C., Zue-Liu Huang, O. Naivikul, A. Vanavichit, V. Ruanjaichon y S. Tragoonrung** (2001). *Mapping of genes for cooking and eating qualities in thai jasmine rice (KDML105)*. DNA Research, 7, 93–101.
- León, J.** (1987) *Botánica de los cultivos tropicales*. San José, Costa Rica, IICA. 445 p.
- Li, G. y C. F. Quiros** (2001). *Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica*. Theoretical and Applied Genetic, 103, 455-461.
- Li, G., M. Gao, B. Yang y C. F. Quiros** (2003). *Gene for gene alignment between the Brassica and Arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping*. Theoretical and Applied Genetic, 107, 168–180.

- Li, S., J. Jia, X. Wei, X. Zhang, L. Li, H. Chen, Y. Fan, H. Sun, X. Zhao, T. Lei, Y. Xu, F. Jiang, H. Wang y L. Li** (2007). *An intervarietal genetic map and QTL analysis for yield traits in wheat*. *Molecular Breeding*, 20, 167–178.
- Lima, L. R. P, T. T. De Oliveira, T. J. Nagem, A. D. S. Pinto, P. C. Stringheta, A. L. A. Tinoco y J. F. Da Silva** (2001). *Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38(4), 196-200.
- Lin, Z., X. Zhang, Y. Nei, D. He y M. Wu** (2003). *Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP*. *Chinese Science Bulletin*, 48(19), 2063-2067.
- Lin, Z., D. He, X. Zhang, Y. Nie, X. Guo, C. Feng y J. S. McD** (2005). *Linkage map construction and mapping QTL for cotton fibre quality using SRAP, SSR and RAPD*. *Plant Breeding*, 124, 180-187.
- Manshardt, R.** (2004). *Crop improvement by conventional breeding or genetic engineering: how different are they?*. *Biotechnology*, 5, 1-3.
- Martín-Rodríguez, E.** (2007). *Establecimiento de la metodología para el análisis cariotípico de B. orellana*. Tesis de Licenciatura ITA-SEP.
- Mazzani, E., C. Marín y V. Segovia** (2002). *Estudio de la variabilidad existente en la colección de onoto (Bixa orellana L.) del CENIAP; FONAIAP; Venezuela*. *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ*, 17, 492-50.
- McGonigle, K. E. M. y K. J. McCracken** (2002). *Study on the effects of annatto (Bixa orellana) and Yucca Schidegera on cholesterol content and yolk colour*. *British Poultry Science*, 43, S1, 41-42.
- McCouch, S.** (2004). *Diversifying selection in plant breeding*. *PLoS Biology*, 2, 1507–1512.
- Medina, A. M., C. Michelangeli, C. Ramis y A. Díaz** (2001a). *Caracterización morfológica de frutos de onoto (Bixa orellana L.) y su correspondencia con patrones de*

- proteínas e isoenzimas. Acta Científica Venezolana. 52, 14-23.*
- Medina, A. M., C. Michelangeli, C. Ramis y A. Díaz (2001b).** *Identificación y variabilidad genética de genotipos de onoto (Bixa orellana L.) mediante el uso de proteínas hidrosolubles e isoenzimas. Acta Científica Venezolana, 52, 24-33.*
- Mengyao, Y., M. Bo, L. Xia, Z. Linyong, X. Xiaoyan y Y. Zhirong (2008).** *Molecular diversity of Auricularia polytricha revealed by Inter-Simple Sequence Repeat and Sequence-Related Amplified Polymorphism Markers. Current Microbiology, 56(3), 240-245.*
- Meng-yang, J. M. Sc., L. Jia-na, F. Fu-you, Z. Zheng-sheng, Z. Xue-kun y L. Lie-zhao (2007).** *QTL Analysis of the Oil Content and the Hull Content in Brassica napus L. Agricultural Sciences in China, 6(4), 414-421.*
- Mensúa, J. L. (2003)** "Genes ligados" en *Genética problemas y ejercicios resueltos*, Mensúa, J. L. (ed), Pretince Hall, España. pp. 113-118.
- Mercadante, A. Z., A. Steck y H. Pfander (1997).** *Isolation and identification of new apocarotenoids from annato (Bixa orellana) seeds. Journal Agricultural Foods Chemistry, 45, 1050-1054.*
- Mercadante, A. Z., A. Steck, D. Rodríguez-Amaya, H. Pfander y A. Britton (1996).** *Isolation of Methyl 9'Z-apo-6'lycopenoato from Bixa orellana. Phytochemistry, 41(4), 1201-1203.*
- Michelangeli, C., A. M. Medina, P. Artioli y J. Mata (2002).** *Microsporogénesis y Microgametogénesis de Onoto (Bixa orellana L.). Acta Científica Venezolana, 53, 171-175.*
- Morawetz, W. (1985).** *Remarks on Karyological Differentiation Patterns in Tropical Woody Plants. Plant Systematics and Evolution, 152, 49-100.*
- Morcote-Ríos, G. (2006).** *Tumbas y plantas antiguas del suroccidente colombiano. Boletín Museo del Oro, 54, 46-71.*

- Muluvi, G. M., J. I. Sprent, D. Odee y W. Powell (2004).** *Estimates of outcrossing rates in Moringa oleifera using Amplified Fragment Length Polimorphism (AFLP).* African Journal of Biotechnology, 3(2), 146-151.
- Núñez, V., R. Otero, J. Barona, R. Fonnegra, S. Jiménez, O. R. Guillermo, J. C. Quintana y A. Díaz (2004).** *Inhibition of the toxic effects of Lachesis muta, Crotalus durissus cumananis and Micrurus mipartitus snake venoms by plant extracts.* Pharmaceutical Biology. 42 (1), 49–54.
- Okazaki, K., K. Sakamoto, R. S. A. Kikuchi, E. Togashi, Y. Kuginuki, S. Matsumoto y M. Hirai (2007).** *Mapping and characterization of FLC homologs and QTL analysis of Xowering time in Brassica oleracea.* Theoretical and Applied Genetic, 114, 595–608.
- Parimalan, R., P. Giridhar, H. B. Gururaj y G. A. Ravishankar (2007).** *Organogenesis from cotyledon and hypocotyl-derived explants of japhara (Bixa orellana L.)* Acta Botánica Croatica, 66(2), 153–160.
- Paiva Neto, V. B., M. N. Botelho, R. Aguiar, E. A. M. Silva y C. W. Otoni (2003).** *Somatic Embryogenesis From Immature Zygotic Embryos Of Annatto (Bixa orellana L.).* In vitro Cellular & Developmental Biology Plant, 39, 629–634.
- Patiño, V. (1964).** *Plantas cultivadas y animales domésticos en américa equinoccial.* Colombia, Imp. Departamental.
- Pérez-Vega, M. (1993).** "Biochemical characterization of populations". in *Plant Breeding: Principles and Prospects*, Hayward, M. D., Bosemar, N. O. and Romagosa, I. (eds),. Chapman & Hall, London. pp. 184-200.
- Pérez, M. y R. Becerra (2003).** *Manejo campesino de recursos naturales. El Achiote.* BioDiversitas. Boletín bimestral de la comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad, 7(46), 7-11.
- Pittier, H. (1978).** *Plantas Usuales de Costa Rica.* Editorial Costa Rica. Costa Rica. 330 p.

- Poppendieck, H-H.** (2001). "Bixaceae Link". in *Flora de Nicaragua. Introducción Gimnospermas y Angiospermas (Acanthaceae-Euphorbiaceae)*, Stevens W. D., U.C. Ulloa, A. Pool and O. M. Montiel (eds). Missouri Botanical Garden, 428-430.
- Portela de Carvalho, J. F. R., C. R. De Carvalho y O. W. Campos** (2005a). *In vitro induction of polyploidy in annatto (Bixa orellana)*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 80, 69–75.
- Portela de Carvalho, J. F. R., I. P. Robinson y A. A. Couto** (2005b). *Isozymic variability in a Brazilian collection of annatto (Bixa orellana L.)* Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 40(7), 653-660.
- Poveda, L.** (1983). "Lo Maravilloso de nuestra flora medicamentosa", en *Aspectos sobre el achiote, perspectiva para Costa Rica*, Arce, J. (ed), Trabajos presentados. CATIE, Turrialba. pp. 140-145.
- Ramos-Solorzano, G.** (1991). *El cultivo de onoto en Venezuela*. Foniap Divulga, 36, 5-17.
- Rivera-Madrid, R., R. M. Escobedo-GM, E. Balam-Galera, M. Vera-Ku y H. Harries** (2006). *Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (Bixa orellana L.)*. Scientia Horticulturae, 109, 165–172.
- Rivera, D. I. y E. M. Flores** (1988). *Morfología floral del achiote, Bixa orellana L (Bixaceae)*. Revista de Biología Tropical, 36, 499-509.
- Rodríguez, M. y A. Arencibia** (2002). "Principales tipos de marcadores del polimorfismo de los ácidos nucleicos. Técnicas analíticas", en *Marcadores moleculares nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas*. Cornide, H. M.T., Felix Varela, Habana, Cuba. pp 13-35.
- Rodríguez, G. y G. Enríquez** (1983) "Estudio preliminar del desarrollo de ramas y la biología floral en *Bixa orellana L.*" in: *Aspectos sobre el achiote y perspectivas para Costa Rica, Turrialba*. J. Arce. (ed) Turrialba, Costa Rica, CATIE, pp. 58–76.

- Ronse, D. L. P.** (1989). *Floral Development of Cochlospermum tinctorium and Bixa orellana with Special Emphasis on the Androecium*. American Journal of Botany, 76(9), 1344-1359.
- Russell, K. R. M., E. Y. StA. Morrison y D. Ragoobirsingh** (2005). *The Effect of Annatto on Insulin Binding Properties in the Dog*. Phytotherapy Research, 19, 433-436.
- Saraswathy, S., R. S. Azhakia-Manavalan y S. Subramanian** (2004). *Studies on various extraction methods on dye yield in annatto (Bixa orellana L.)* Madras Agricultural Journal, 91,524-526.
- Schmidt-Hebbel, H.** (1980). *Las Especies (Condimentos Vegetales) su Importancia en Química Tecnología de Alimentos y en el Arte Culinario Editado por Fundación Chile Editorial Universitaria, Santiago-Chile*. pp. 146.
- Semagn, K., A. Bjørnstad y M. N. Ndjioudjop** (2006). *Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants*. African Journal of Biotechnology, 5(25), 2569-2587.
- Sharon, M. y D'Souza, M. C.** (2000). *In vitro clonal propagation of annatto (Bixa orellana L.)*. Current Science, 78(12),1532 -1535.
- Shewry, P. R. y Lazzeri, P.** (1996). *Genetic manipulation of crops*. British Food Journal, 98, 5-9.
- Shu-Jing, S., G. Wei, L. Shu-Qian, Z. Jian, X. Bao-Gui y L. Zhi-Bin** (2006). *Analysis of genetic diversity in Ganoderma population with a novel molecular marker SRAP*. Applied Microbiology and Biotechnology, 72(3), 537-543.
- Siva, R.** (2007). *Status of natural dyes and dye-yielding plants in India*, Current Science 92 (7), 916-925.
- Sleper, D. A. y J. M. Poehlman** (2006). "The genetics basis of plant breeding" in *Breeding Field Crops*, Sleper, D. A. and Poehlman, J. M. Blackwell, Ames, Iowa pp. 19-53.
- Smith, N.** (2005). *Geography of Crop Plants Lecture Notes Part 2*, University of Florida, pp 18-22.

- Stebbins, G. L.** (1950). *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press, New York, New York, USA. 221 p.
- Strickberger, M. W.** (1978). *Genética*. Ediciones Omega, Barcelona, España. pp. 15-24.
- Sun, Z., Z. Wang, J. Tu, J. Zhang, F. Yu, P. B. E. McVetty y G. Li** (2007). *An ultradense genetic recombination map for Brassica napus, consisting of 13551 SRAP markers*. Theoretical and Applied Genetic, 114, 1305–1317.
- Tirimana, A. S.** (1981). *Study of Carotenoid pigments of Bixa orellana L. seeds by thin layer chromatography*. Mikrochimica Acta 2, 11-16.
- Valdez-Ojeda, R.** (2004). *Aplicación de marcadores moleculares SRAP en achote (Bixa orellana)*. Tesis de Licenciatura FIQ-UADY.
- Velíšek J, J. Davídek y K. Cejpek** (2007). *Biosynthesis of Food Constituents: Natural pigments: Part 2*. Czech Journal of Food Sciences, 25, 291-315.
- Venkatesh, C. S.** (1956). *The Curious Anther of Bixa-Its Structure and Dehiscence*. The American Midland Naturalist Journal, 55(2), 473-476.
- Wang, G., J. Pan, X. Li, H. He, A. Wu y R. Cai** (2005). *Construction of a cucumber genetic linkage map with SRAP markers and location of the genes for lateral branch traits*. Science in Series C, Life Science, 48(3), 213-20.
- Weising, K. y G. Kahl** (1997). *Hibridization-based microsatellite fingerprint of plants and fungi*. in *DNA markers: protocols, applications and overviews*. Caetano-Anollés, G. and Gresshoff, P. (ed), Willey-Liss, New York, pp 30, 32, 34.
- Williams, C. F., J. Ruvinsky, P. E. Scout y D. K. Hews** (2001). *Pollinization, breeding system and genetic structure in two sympatric Delphinium (Ranunculaceae) species*. American Journal of Botany, 88(9), 1623-1633.
- Yu, J., S. Yu, C. Lu, W. Wang, S. Fan, M. Song, Z. Lin, X. Zhang y J. Zhang** (2007). *High-density Linkage Map of*

Cultivated Allotetraploid Cotton Based on SSR, TRAP, SRAP and AFLP Markers, Journal of Integrative Plant Biology, 49(5), 716-724.

Zaldívar-Cruz J. M. y G. Godoy-Hernández (2003). *El Licopeno es el Sustrato para la Biosíntesis de Bixina*, Revista de Educación Bioquímica, 22(3), 146-154.

Zaldívar-Cruz, J. M., H. Ballina-Gómez, C. Guerrero-Rodríguez, E. Avilés-Berzunza y G. C. Godoy-Hernández (2003). *Agrobacterium-mediated transient transformation of annatto (Bixa orellana) hypocotyls with the gus reporter gene*. Plant Cell Tissue Organ Culture, 73, 281-284.

Capítulo 2

Evaluación morfológica y análisis genético del achiote (*Bixa orellana* L.) por polimorfismo amplificado de secuencia relacionada y análisis de grupos¹

RESUMEN

El achiote (*Bixa orellana* L.) es la única fuente de bixina, un pigmento apocarotenoide específico de la semilla, empleado a nivel mundial. El mejoramiento del achiote, se ha enfocado en incrementar el contenido de bixina, a través de la identificación de las características que favorecen la obtención de altos contenidos de bixina, como la indehiscencia de la cápsula y el color de la flor, entre otros. Ochenta y siete muestras colectadas de dos regiones agrícolas separadas e importantes, ubicadas en el sur-este de México, fueron caracterizadas morfológicamente y analizadas genéticamente por vez primera. El polimorfismo amplificado de secuencia relacionada fue utilizado para el análisis genético. El análisis "two-step cluster" de los individuos basados en las características morfológicas generó tres grupos: uno de ellos conteniendo a los individuos con características morfológicas deseadas y los otros dos con características complementarias. Al igual que el análisis morfológico, el análisis genético indicó alta variación genética, aunque el dendrograma basado en el coeficiente de similitud genética de Nei, mostró la dispersión de los individuos por el sitio de colecta. Sin embargo, los valores calculados de acuerdo al índice de similitud, indicaron que todos los individuos exhibieron alta variación genética. Los resultados son un importante avance hacia el mejoramiento genético más efectivo del achiote debido a que las cruza entre los diferentes grupos morfológicos y/o genéticos descritos aquí, tienen el potencial para producir una recombinación de caracteres deseados en la descendencia híbrida.

ABSTRACT

Annatto (*Bixa orellana* L.) is the sole source of bixin, a seed-specific red apocarotenoid pigment used worldwide. Genetic improvement of annatto has focused on increasing bixin content as well as fostering traits that favor higher content such as pod indehiscence and flower color, among others. Eighty-seven samples collected from two separate important agricultural regions of the southeast of Mexico were characterized morphologically and analyzed genetically for the first time. The sequence-related amplified polymorphism method was used for genetic analysis. Two-step cluster analysis of the individuals based on morphological traits produced three groups: one containing individuals with desired morphological characteristics and two others with complementary traits. Like the morphological analysis, the genetic analysis indicated high genetic variation, although the dendrogram based on Nei and Li's similarity coefficient showed them to be dispersed by collection site. However, calculated similarity index values indicated all individuals exhibited high genetic variation. The results are an important advance toward a more effective genetic improvement of annatto because crosses between the different morphological and/or genetic groups described here have the potential to produce a recombination of desired traits in hybrid offspring.

¹Assessing Morphological and Genetic Variation in Annatto (*Bixa orellana* L.) by Sequence-related Amplified Polymorphism and Cluster Analysis. Ruby Valdez-Ojeda, José Luis Hernández-Stefanoni, Margarita Aguilar-Espinosa, Renata Rivera-Madrid, Rodomiro Ortiz and Carlos F. Quiros. 2008. Hortscience 43(7), 2013–2017.

2.1 INTRODUCTION

Annatto (*Bixa orellana* L.) is a commercial crop originally from the southwest Amazon (Sandy-Cuen & Becerra, 2003). It is grown for its unique capability to produce bixin, a natural pigment, found predominantly in the seed aril and widely used in the food industry (Giuliano *et al.*, 2003). The demand for natural colorants of annatto has increased for its natural nutrients and its beneficial effects in lowering glucose (Russell *et al.*, 2005) and cholesterol (McGonigle & McCracken, 2002) in blood. It has also displayed antimutagenic (Júnior *et al.*, 2005) and antimicrobial properties (Rojas *et al.*, 2006) among others. These make annatto a very attractive and healthy pigment as a substitute for the many synthetic colorants.

The mechanism of bixin biosynthesis remains unresolved. However, it has been suggested that three genes govern bixin biosynthesis (lycopene cleavage dioxygenase, bixin aldehyde dehydrogenase, and norbixin carboxyl methyltransferase), which catalyze the sequential conversion of a C40 carotenoid, most probably lycopene, into bixin (Bouvier *et al.*, 2003).

Annatto is currently cultivated in Africa, Asia, and Latin America (from Brazil to Mexico, especially on the Caribbean coast) (Portela de Carvalho *et al.*, 2005). In Mexico, annatto is primarily grown in the southeast states (Sandy-Cuen & Becerra, 2003), particularly in Yucatan, which has the highest annatto production in the country. It is used extensively in regional cuisine and is consequently grown in many agricultural fields and even in backyards.

Annatto has a number of cultivars, including the varieties leiocarpa (Kuntze) and urucurana (Willd) (Poppendieck, 2001), and these manifest wide phenotypic variation in the shape and color of capsules and flowers (Arce, 1999). This species' ecology, cultivation, and industrial applications have been researched previously (Rivera-Madrid *et al.*, 2006), but limited effort has been made to classify its cultivars based on bixin content and morphological traits; therefore, such research will

facilitate rapid and accurate selection of parental genotypes for further genetic improvement.

Morphological characterization was initially carried out in Venezuela, where variation in traits clustered individuals by origin (Mazzani *et al.*, 2000). Isozyme variation has been studied for annatto in Brazil and indicated that genetic differences corresponded to geographic differences (Portela de Carvalho *et al.*, 2005). Similar research in Venezuela allowed identification of unique genotypes within highly diverse populations (Medina *et al.*, 2001a).

The objective of this study was to analyze morphological variation in *B. orellana* and support it for the first time with genetic variation data generated using molecular markers (SRAP) (Li & Quiros, 2001). High bixin content material and agronomically important traits favoring bixin yield were also evaluated such as pod indehiscence and flower color, among others. The agronomical traits were compared with bixin production and the individuals were analyzed genetically to select the most appropriate germplasm for genetic improvement of annatto.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 Sample collection

Samples were collected between Oct. 2005 and Jan. 2006 from the locations of Cooperativa and Yaxcaba, Yucatan state, Mexico (Fig. 2.1). One to five panicles and five to ten leaves from active shoots were collected from a total of 200 adult plants (100 in each Cooperativa and Yaxcaba). All plant materials were stored at 80°C until processing. In both locations, Cooperativa and Yaxcaba, the sample plants were 5 to 10 year old seed propagated plants. In Cooperativa, plants were grown in different fields, whereas in Yaxcaba, they were grown in the backyards of houses. The collected germplasm was chosen after review of available *B. orellana* materials in the herbarium at the Centro de Investigación Científica de Yucatán

and based on the relationship between capsule morphology and bixin production (Rivera-Madrid *et al.*, 2006).

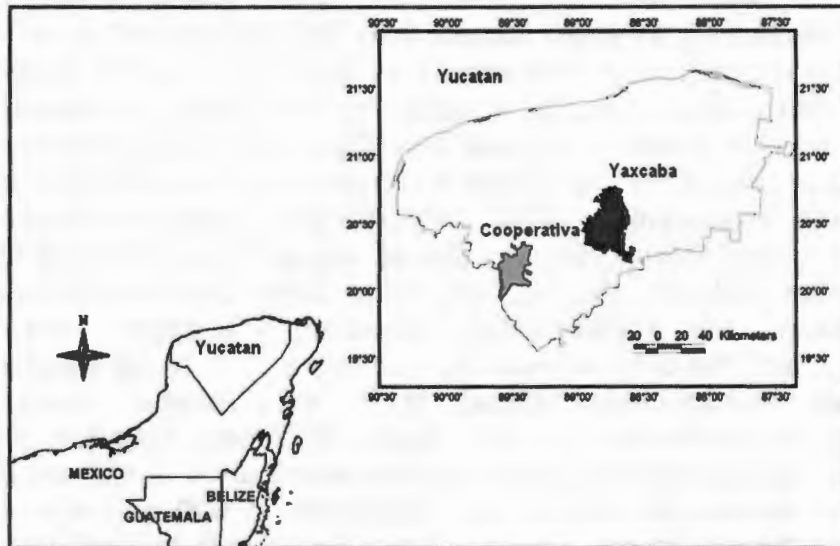


Figure 2.1 Annatto accession collection sites in Yucatan state, Mexico.

2.2.2 Morphological characterization

Thirteen quantitative and qualitative descriptors of the capsule, flower, and seed known to be important for annatto breeding were used in morphological characterization (Arce, 1999). The quantitative descriptors were: capsule length (cm; from tip to bottom); capsule width (cm; of widest part); seed number in five capsules; bixin content ($\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$); total carotene content ($\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$); capsule length/width ratio; and bixin/carotene content ratio. The qualitative descriptors were: spine density (0 = no spines, 1 = very low, 3 = low, 5 = medium, 7 = high, 9 = very high), spine length (1 = very short, 3 = short, 5 = medium, 7 = long, 9 = very long), apex shape (1 = rounded, 2 = acute, 3 = acuminate, 4 = chordate), dehiscence (1 = dehiscent, 2 = indehiscent), flower color (1 = light pink, 2 = pink, 3 = purple, 4 = fuchsia, 5 = white), and capsule color (1 = yellow, 2 = green, 3 = red, 4 = dark red). All measurements were taken from

mature materials, except for capsule color, which was recorded from immature materials. Measurements of 10 randomly chosen capsules were taken from each individual.

Seeds were placed in 2 mL plastic tubes, wrapped in aluminum foil to avoid contact with light and stored at -20°C . Bixin content was determined in triplicate following Dendy's (1966) protocol, slightly modified for this study. A sample of $\approx 0.1\text{g}$ was placed in a glass tube (15 mL) in an ice bath and 5 mL of chloroform was added and mixed for 1 min with an Ultraturrax homogenizer (T25; Janke-Kunkel, Seelbach, Staufen, Germany). The extract was filtered with a 25-mm Swinnex filter holder (Millipore, Billerica, MA; SX0002500, 0.45 mm; Millipore, Billerica, MA; HNWP02500), recovered in a plastic tube (15 mL), and the volume was adjusted to 5 mL. A 10 mL aliquot of bixin extract was diluted to 1 mL volume. Using a spectrophotometer (DU 600 Series; Beckman, Fullerton, CA), bixin was measured at a maximum absorbance of 500 nm and total carotenoid content was measured at 500 and 404 nm. Absorbance records ranged from 0.5 to 1.0 to produce an accurate estimate of bixin content. Bixin and carotenoids contents were calculated using correction factors of 282.6 for bixin and 0.256 for total carotenoids.

2.2.3 Molecular characterization

A sample of $\approx 100\text{ mg}$ of fresh leaf was ground in liquid nitrogen and total genomic DNA was extracted using a DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany; 69506). Following the method of Li & Quiros (2001), the SRAP protocol was implemented using 53 primer combinations to select for polymorphic bands. The selected primers consisted of ≈ 5 polymorphic fragments from two individuals with contrasting traits, for example, large and dehiscent capsules with high bixin content or short and indehiscent capsules with low bixin content.

Twelve primer combinations were selected for SRAP analysis (Table 2.1). The forward primers were labeled with IRDye 800 or IRDye 700. A standard polymerase chain reaction

(PCR) cocktail mix was prepared according to Ruiz *et al.* (2005) and subjected to the following conditions: 1 cycle of 94°C for 2 min, 5 cycles of 94°C for 30 s, 35°C for 30 s, and 72°C for 1 min, and 35 cycles of 94°C for 30 s, 50°C for 30 s, 72°C for 1 min followed by a final extension of 72°C for 2 min. Briefly, 3 mL bidistilled water containing bromophenol blue 0.25% (w/v) and sucrose 40% (w/v) was added to the PCR products before denaturing at 94°C for 5 min. After denaturing, 0.6 mL of reaction mixture was loaded into 5.5% (w/v) denatured acrylamide gels and continuous 1x TBE buffer. The samples were run in duplicate to ensure band pattern reproducibility. The PCR products were run in a sequencer (IR2 4200; LI-COR, Lincoln, NE).

Table 2.1 SRAP primers used to develop the polymorphic markers used in the study.

Name	Forward primers	Name	Reverse primers
Odd-3	5'-CCAAAACCTAAAACCAGGA-3'	Pm-3	5'-ACAAGATTTTGAGAATACTAC-3'
Odd-3	5'-CCAAAACCTAAAACCAGGA-3'	Ga-45	5'-AGTGGTATT TTTGCAGTTCTA-3'
Odd-8	5'-CACAAGTCGCTGAGAAGG-3'	Odd-15	5'-GCGAGGATGCTACTGTT-3'
Odd-8	5'-CACAAGTCGCTGAGAAGG-3'	Odd-21	5'-CAGAGTAATTGCCATGAAATG-3'
Odd-26	5'-CTATCTCTCGGGACCAAAC-3'	Fc-3	5'-ACAGAAGGATGCTCAGTTG-3'
Em-1	5'-GACTGCGTACGAATTCAA-3'	Odd-45	5'-AAGTGAAGTGCCTACAATAC-3'
Em-1	5'-GACTGCGTACGAATTCAA-3'	Odd-21	5'-CAGAGTAATTGCCATGAAATG-3'
Em-2	5'-GACTGCGTACGAATTCTG-3'	Me-2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'
Em-2	5'-GACTGCGTACGAATTCTG-3'	Odd-22	5'-TACACCAGCCAAGGATGC-3'
Em-2	5'-GACTGCGTACGAATTCTG-3'	Ga-6	5'-GGCATTCACTAACCATTTC-3'
Me-2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	Odd-2	5'-TTAGTCTTCACTTCAAACC-3'
Me-2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	Sa -9	5'-GTTGAGAGTGTTGATTGG T-3'

2.2.4 Analysis of morphological data

A cluster analysis was performed to group the individuals from both studied sites according to similar morphological traits based on different quantitative and qualitative descriptors of the capsule, flower, and seed. To form groups and test for relationships between these groups and bixin content, a two-step cluster analysis algorithm was run using the SPSS 13.0 program (SPSS Inc., Chicago, IL). This is a relatively new cluster technique that can process both continuous and categorical variables with a log likelihood distance measure. It is therefore appropriate for forming groups according to the similarity of two variable types: quantitative variables (capsule length and width, length/width ratio, and number of seeds) and qualitative variables (spine density and length, capsule apex shape, flower and capsule color, and capsule dehiscence or indehiscence). The two-step cluster analysis consists of a preclustering step in which records are grouped into numerous small subclusters followed by a clustering step. The subclusters are grouped into clusters using an agglomerative hierarchical clustering approach. The method automatically chooses the optimum number of clusters by examining the Akaike information criterion values (Chiu *et al.*, 2001).

Significant differences between the groups produced in the two-step cluster analysis were evaluated with an analysis of variance (ANOVA) and Tukey's honestly significant difference (HSD) test for numerical variables and Pearson's X^2 and Fisher's exact test for categorical variables. Another ANOVA was run to analyze differences in bixin content among collection sites in each group as well as between groups.

2.2.5 Analysis of genetic data

Each SRAP fragment was coded "1" for the presence of a specific allele or "0" in its absence. Similarity matrices based on Nei and Li's similarity coefficient was used to construct an unweighted pair group method with arithmetic average

dendrogram using NTSYS-PC version 2.02 (Exeter Software, Setauket, NY). Statistical stability of the branches in the dendrogram was tested by bootstrap analysis with 1000 replicates using the Free Tree 0.9.1.50 software program (Pavlicek *et al.*, 1999). A specific *B. orellana* variant (pink flower, high bixin content, red and dehiscent capsule) was used as a positive control to confirm any polymorphic bands detected in the *B. orellana* samples. An analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) was used to determine molecular variance between and within collection sites using the Arlequin 3.1 software (Excoffier *et al.*, 2005). The significance of variance component Φ -statistics was tested using 1000 permutations of a nonparametric permutation approach described in Excoffier *et al.* (1992). The level of genetic differentiation between samples was analyzed by calculating pairwise Φ_{ST} estimations.

2.3 RESULTS

2.3.1 Morphological analysis

These analyses were performed on samples from 87 individuals of *B. orellana* plants, 42 from Cooperativa and 45 from Yaxcaba. Three groups with similar morphological characteristics were recognized from 87 individuals of *B. orellana* based on the two-step cluster analysis of quantitative and qualitative descriptors. Group 1 individuals (7 from Cooperativa and 11 from Yaxcaba) had larger and narrower capsules, i.e., a larger capsule and shorter length/width ratio than individuals in Group 2 (21 from Cooperativa and 28 from Yaxcaba) and Group 3 (14 from Cooperativa and 6 from Yaxcaba). The only difference between individuals in Groups 2 and 3 was capsule width with Group 2 having wider capsules than Group 3 (Fig. 2.2).

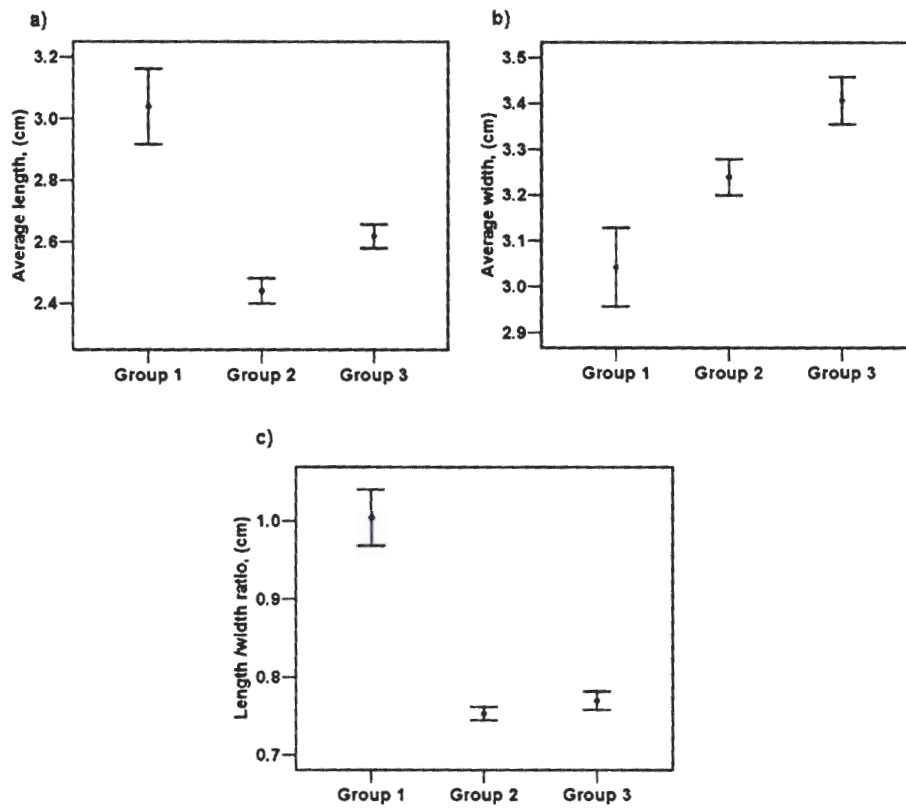


Figure 2.2 Differences in capsule size between clustered groups: (a) average length, (cm) ($F_{[2, 86]}=21.85$, $P < 0.000$; Tukey HSD at 5%); (b) average width, (cm) ($F_{[2, 86]}=7.56$, $P < 0.001$; Tukey HSD at 5%); and (c) length/width ratio, (cm) ($F_{[2, 86]}=59.39$, $P < 0.000$, Tukey HSD at 5%).

A large proportion of Group 1 individuals had capsules with short to medium spines, a rounded and acuminate capsule apex, purple flowers, and red and dark red capsules that were dehiscent. In contrast, most individuals in Groups 2 and 3 had capsules with large to very large spines, an agreed capsule apex, white flowers, and yellow and green capsules that were indehiscent (Fig. 2.3).

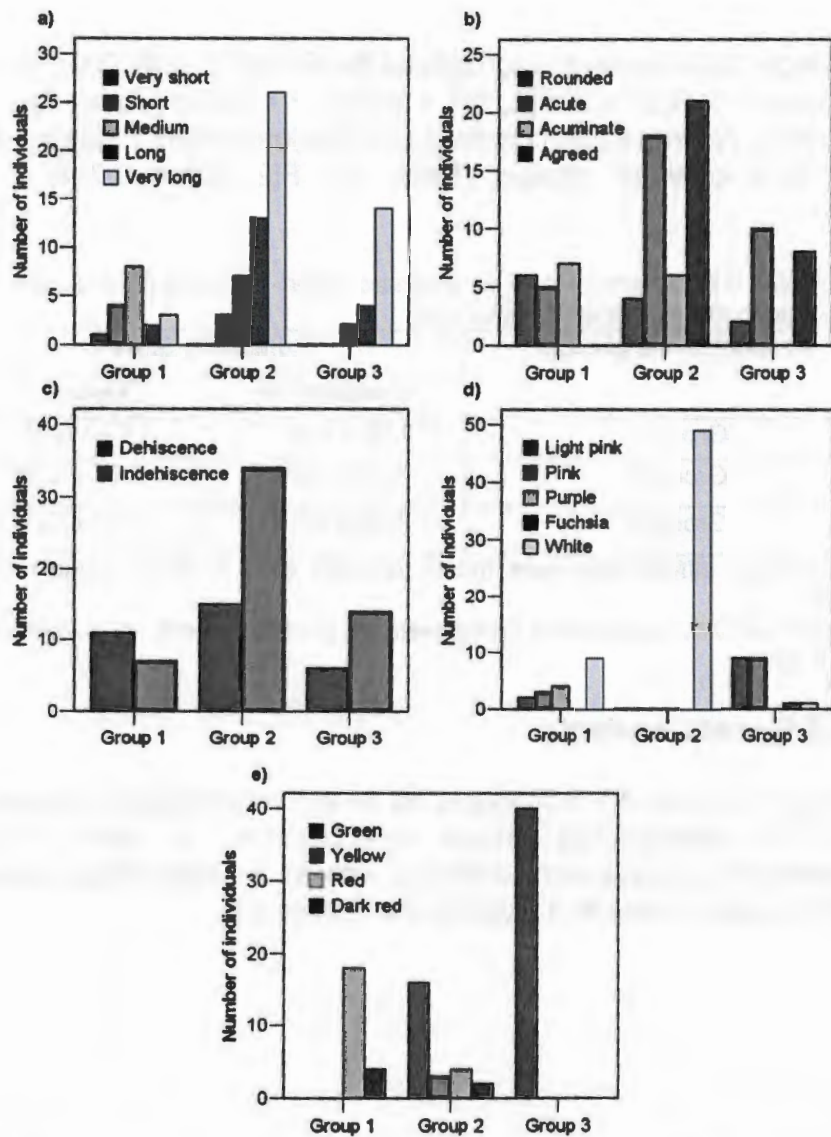


Figure 2.3 Differences in qualitative morphological features between clustered groups: (a) capsule spine length (Fisher's Exact Test =21.63, $P < 0.001$); (b) capsule apex shape (Fisher's Exact Test =25.66, $P < 0.000$); (c) capsule dehiscence (Pearson's Chi-Square =5.78, $P < 0.058$); (d) flower color (Fisher's Exact Test =77.66, $P < 0.000$); and (e) capsule color (Fisher's Exact Test =80.57, $P < 0.000$).

Average bixin content was highest for Group 1 individuals from Cooperativa (Table 2, $F[2, 41] = 10.59$, $P < 0.001$; Tukey HSD, $P < 0.001$). Average bixin content of individuals from Yaxcaba did not differ between groups (Table 2.2, $F[2, 44] = 0.795$; $P < 0.458$).

Table 2.2 Mean bixin content (\pm standard error) in morphological groups produced in the cluster analysis by site.

Morphological groups	Collection Sites	
	Cooperativa	Yaxcaba
Group 1	$2.65 \pm 0.24^{x,y}$	1.83 ± 0.14^x
Group 2	1.84 ± 0.08^y	1.72 ± 0.07
Group 3	1.66 ± 0.15^y	1.92 ± 0.08

^x Significant differences were found between sites in these groups ($P < 0.001$).

^y Significant differences were found between groups in these collection sites ($P < 0.001$).

2.3.2 Genetic analysis

Using the same 87 individuals as in the morphologic analysis, and 12 polymorphic primer combinations, a total of 58 reproducible bands were detected with an average of six bands and a range of one to 11 bands per primer set.

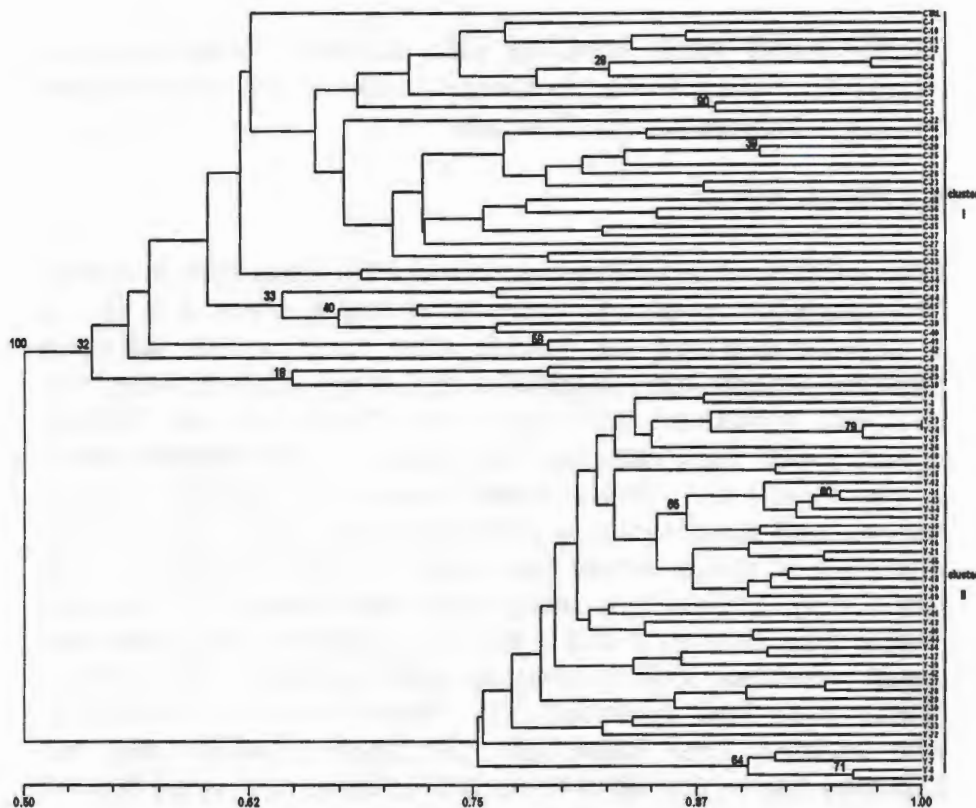


Figure 2.4. Dendrogram of annatto collection sites based on UPGMA cluster analysis of 58 sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular markers in the study. The resulting clusters are labeled Cluster I and II. The letter “C” indicates an individual collected at Cooperativa and “Y” one collected at Yaxcaba. CTRL indicates the positive control (pink flower, high bixin content, red and dehiscent capsule). The numbers at the nodes indicate the percentage bootstrap values.

Two large clusters were defined in the dendrogram (Fig. 2.4): Cluster I grouped all individuals from Cooperativa and Cluster II grouped all those from Yaxcaba. According to similarity distances, both clusters exhibited high genetic variation: Cluster I exhibited the highest genetic variation (0.14815 to 0.8679) compared with Cluster II (0.42553 to 0.97143). No duplicates were detected among the analyzed individuals. An AMOVA also showed genetic variation to be attributed to differences between

(61.55%) and within sampling sites (38.45%). A significant Φ value ($\Phi_{ST} = 0.61$, $P < 0.00$) further confirmed the differentiation between Cooperativa and Yaxcaba.

2.4 DISCUSSION

The morphological analysis clustered individuals with desirable characteristics for genetic improvement of *B. orellana* in Group 1. Capsule size was not found to affect seed number, although previous reports have suggested that large, wide capsules are positively correlated with seed size (Medina *et al.*, 2001b). Group 1 also had capsules with short to intermediate length spines, which is a desirable trait because it facilitates capsule harvest and seed recovery (Medina *et al.*, 2001b) (Fig. 2.3a). The pink or purple flower color and red capsule color of this group (Fig. 2.3d-e) are associated with higher bixin content (Table 2.2). Groups 2 and 3 had white flowers and yellow and green capsules (Fig. 2.3d-e) as well as lower bixin content (Table 2.2). This coincides with Rivera-Madrid *et al.* (2006), who reported that individuals with purple flowers and red capsules had higher bixin content than those with white flowers and green capsules. Another advantage of individuals with purple or pink flowers is that outcrossed hybrids exhibit higher fruit set than those of white flower individuals (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Parents with purple or pink flowers and red capsules are therefore potential sources for genetic improvement of annatto with the goal of increasing bixin content.

The difference in bixin content between Group 1–Cooperativa and Group 1–Yaxcaba individuals and Group 2 and 3 individuals is probably the result of the different uses of annatto seeds at each site. In Cooperativa, seeds are probably selected for commercial use in bixin extraction, whereas in Yaxcaba, the seeds are for household use and may not be subject to heavy selection pressure.

Individuals in Groups 2 and 3 had indehiscent capsules (Fig. 2.3c). This is an important breeding target, because indehiscence may enhance crop yields (Roberts *et al.*, 2002),

and dehiscent capsules expose seeds to sunlight, leading to bixin photo-oxidation and decreased bixin content (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). The present results coincide with Mazzani *et al.* (2000) (Fig. 2.3b-c). The genetic basis for dehiscence and indehiscence capsule in *B. orellana* is not known. In *Brassica* and *Arabidopsis thaliana*, dehiscence is controlled by the MADS gene family (Liljegren *et al.*, 2000).

Genetic improvement of annatto is currently incipient and largely empirical. Some effort has been made to select for high bixin content and traits that favor bixin yield such as pod indehiscence, flower color, and so on. Molecular markers have not been used to investigate the genetic variability of *Bixa orellana* instead the SRAP molecular markers were used to confirm the high observed morphological variation shown here, because this method is powerful enough to detect sequences codifying for morphological characters (Espósito *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2005). Based on the similarity genetic diversity index, all individuals have sufficient variation to permit genetic improvement by interindividuals.

The dendrogram built from the genetic analysis showed that the individuals studied in this research were clustered by collection site rather than morphological characters (Fig. 2.4). The AMOVA supported the dendrogram results by indicating there to be high genetic differentiation between and within collection sites. This was confirmed by the genetic distances among Cooperativa individuals and among Yaxcaba individuals as well as between the sites. This differentiation is probably the result of Cooperativa farmers introducing seed from stock with commercially desirable traits and from variable sources, whereas in Yaxcaba, seeds were probably introduced independently by different households at different times.

2.5 CONCLUSIONS

Genetic analysis indicated that both sampled sites contain different annatto accessions, implying that they probably originated from independent introductions from different

locations. This high genetic variability in all individuals expands the gene pool and increases the possibility of selecting elite parents for genetic improvement. In particular, Group 1 exhibited desirable morphological traits that make it a promising source for selection of individuals with traits linked to high pigment yield. These could then be included in a breeding and clonal propagation program focused on establishment of new plantations. The undesirable trait of capsule dehiscence could be mitigated by crossing blocks with Groups 2 and 3 individuals with indehiscent capsules. As reported by Medina *et al.* (2001b), large and indehiscent capsules without spines are desirable because they facilitate harvest and produce higher bixin content. Genetically diverse parents may also manifest a broad range of phenotypic variation potentially useful for further trait selection (McCouch, 2004). Future research can make genetic improvement of annatto more efficient by focusing on segregation of contrasting traits from crossing individuals to map genes of interest for marker-assisted selection of useful traits. Genetic analysis can also be used to identify DNA markers linked to quantitative trait loci affecting important traits in the *B. orellana* genome.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financed by the International Foundation for Science (IFS) F/2932-2 and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 31602B and 46541. Ruby Valdez-Ojeda received a CONACYT PhD grant (No. 185874). Dr. Renata Rivera-Madrid and Dr. Carlos F. Quiros received support from UC Mexus- CONACYT. We thank Dr. Dan Qiu for technical assistance with the SRAP markers, Dr. Emilio Laca for advice on the cluster analysis, and Dr. Dan Potter for advice on dendrogram construction. Dr. Patricia Colunga and Dr. Jaime Martinez provided academic advice. Mr. Filogonio May participated in the fieldwork. We thank Mr. Julián Coello for technical advices in preparation of acrylamide gels.

LITERATURE CITED

- Arce, J.** (1999). *El achiote Bixa orellana L. cultivo promisorio para el trópico*. EARTH Press, Costa Rica. 23 p.
- Bouvier, F., O. Dogbo and B. Camara** (2003). *Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto)*. *Science*, 300, 2089–2091.
- Chiu, T., D. Fang, J. Chen, Y. Wang and C. Jeris** (2001). *A robust and scalable clustering algorithm for mixed type attributes in large database environment*. Proc. of the Seventh ACM SIGKDD international conference on knowledge discovery and data mining, San Francisco, CA.
- Dendy, D. A. V.** (1966). *The assay of annatto preparations by thin-layer chromatography*, *Journal. Science Food Agriculture*, 17, 216–218.
- Espósito, M. A., E. A. Martin, V. P. Cravero and E. Cointry** (2007). *Characterization of pea accessions by SRAP's markers*. *Scientia Horticulturae*, 113, 329– 335.
- Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider** (2005). *Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis*. *Evolutionary Bioinformatics*, 1, 47–50.
- Excoffier, L., P. E. Smouse and J. M. Quattro** (1992). *Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data*. *Genetics*, 131, 479–491.
- Giuliano, G., C. Rosati and P. Bramley** (2003). *To dye or not to dye: Biochemistry of annatto unveiled*. *Trends in Biotechnology*. 21, 513–515.
- Júnior, A. C. T. S., L. M. B. O. Asad, E. B. De-Oliveira, K. Kovary, N. R. Asad and I. Felzenszwalb** (2005). *Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress*. *Genetic and Molecular Research*, 4, 94–99.

- Li, G. and C. F. Quiros** (2001). *Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in Brassica*. Theoretical and Applied Genetics, 103, 455–461.
- Liljgren S. J., G. S. Ditta, Y. Eshed, B. Savidge, J. L. Bowman and M. F. Yanofsky** (2000). *SHATTERPROOFMADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis*. Nature 404, 766–770.
- Mazzani, E., R. C. Marín and V. Segovia** (2000). *Estudio de la variabilidad existente en la colección de onoto (Bixa orellana L.) del CENIAP, FONAIAP. Venezuela*. Revista de la Facultad de Agronomía LUZ, 17, 492–504.
- McCouch, S.** (2004) *Diversifying selection in plant breeding*. PLoS Biology, 2, 1507–1512.
- McGonigle, K. E. M. and K. J. McCracken** (2002). *Study on the effects of annatto (Bixa orellana) and Yucca Schidegera on cholesterol content and yolk colour*. British Poultry Science, 43, S41–S42.
- Medina, A. M., C. Michelangeli, C. Ramis and A. Díaz** (2001a). *Identificación y variabilidad genética de genotipos de onoto (Bixa orellana L.) mediante el uso de proteínas hidrosolubles e isoenzimas*. Acta Científica Venezolana 52, 24–33.
- Medina, A. M., C. Michelangeli, C. Ramis and A. Díaz** (2001b). *Caracterización morfológica de frutos de onoto (Bixa orellana L.) y su correspondencia con patrones de proteínas e isoenzimas*. Acta Científica Venezolana 52, 14–23.
- Pavlicek, A., S. Hrda and J. Flegr** (1999). *Free Tree: Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application of the RAPD analysis of genus Frenkelia*. Folia Biologica Praha, 45, 97–99.
- Poppendieck, H-H** (2001). *Bixaceae*. in *Flora de Nicaragua. Introducción gimnospermas y angiospermas (Acanthaceae- Euphorbiaceae)*. Stevens, W. D., Ulloa

- U.C., Pool A. and Montiel O. M. (eds.). Missouri Botanical Garden Press, Saint Louis, MO.
- Portela de Carvalho J. F. R., I. P. Robinson and A. C. Alfenas** (2005). *Isozymic variability in a Brazilian collection of annatto (Bixa orellana L.)*. Pesquisa Agropecuaria Brasi Brasília, 40,653– 660.
- Rivera-Madrid, R., R. M. Escobedo-GM, E. Balam-Galera, M. Vera-Ku and H. Harries** (2006). *Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (Bixa orellana L.)*. Scientia Horticulturae, 109,165–172.
- Roberts, J. A., K. A. Elliott and Z. H. Gonzalez-Carranza** (2002). *Abscission, dehiscence, and other cell separation processes*. Annual Review of Plant Biology, 53, 131–158.
- Rojas, J. J., V. J. Ochoa, S. A. Ocampo and J. F. Muñoz** (2006). *Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 6, 1–6.
- Ruiz, J. J., S. García-Martínez, B. Picó, M. Gao and C. F. Quiros** (2005). *Genetic variability and relationship of closely related spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers*. Journal of the American Society for Horticultural Science, 130: 88–94.
- Russell, K. R. M., E. Y. S. A. Morrison and D. Ragoobirsingh** (2005). *The effect of annatto on insulin binding properties in the dog*. Phytother. Res. 19, 433–436.
- Sandy-Cuen, P. M. and R. Becerra** (2003). *Manejo campesino de recursos naturales. El achiote*. BioDiversitas, 7, 7–11.

Capítulo 3

Tasas de entrecruzamiento en *Bixa orellana* L. mediante polimorfismo amplificado de secuencia relacionada (SRAP)²

RESUMEN

Numerosas metodologías han sido propuestas para acelerar programas de mejoramiento en *B. orellana* (achiote). Sin embargo, antes de su implementación, es importante conocer el sistema reproductivo en achiote, una especie tropical altamente comercializada por su única capacidad para producir bixina. Este es el primer reporte sobre la estimación de las tasas de entrecruzamiento en una población de polinización abierta de *B. orellana* por marcadores moleculares, SRAP. Once progenies de polinización abierta compuesta por 10 individuos fueron empleados. Los datos SRAP indicaron una tasa de entrecruzamiento multilocus (t_m) de 0.748. El entrecruzamiento es predominante en la población de polinización abierta de *B. orellana*. El índice de fijación de Wright (F), indicó una alta homocigosidad en la progenie evaluada con reproducción azarosa, probablemente debido a la baja variabilidad en la población. Los marcadores moleculares SRAP, fueron altamente polimórficos en *B. orellana* y adecuados para evaluar el sistema reproductivo de esta especie.

ABSTRACT

Numerous methodologies have been proposed to accelerate breeding programs in *Bixa orellana* (annatto). However, before implementing them it is important to know the mating system in annatto, a tropical species that is highly commercial for its unique capability to produce bixin. This is the first report to estimate outcrossing rates in an open-pollinated population of

B. orellana by molecular markers, SRAP. Eleven open-pollinated progeny arrays of 10 individuals were used. SRAP data indicate a multilocus outcrossing rate (t_m) of 0.748. Outcrossing is predominant in the *B. orellana* open-pollinated population. The Wright's fixation index (F), indicated high homozygosity in the progeny evaluated with random mating, probably due to the low variability in the population. The molecular marker SRAP was highly polymorphic in *B. orellana* and adequate for evaluating the mating system of this species.

²Outcrossing rates in *Bixa orellana* L. determined by Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP). Ruby Valdez-Ojeda, Carlos F. Quiros, Margarita de Lourdes Aguilar Espinosa and Renata Rivera-Madrid. 2009. Sometido en Plant Breeding.

3.1 INTRODUCTION

Bixa orellana L. (annatto) is grown for its unique capability to produce bixin, a natural pigment, found predominantly in the outer coatings of the seeds and widely used in the food industry. The demand for natural colorants of annatto has increased because of its natural nutrients and its beneficial effects in lowering glucose (Russell *et al.*, 2005) and cholesterol (McGonigle & McCracken, 2002) in blood. It has also displayed antimutagenic (Júnior *et al.*, 2005), antimicrobial (Rojas *et al.*, 2006), neuropharmacological, anticonvulsant, analgesic, and antidiarrhoeal activity and an effect on gastrointestinal motility (Shilpi *et al.*, 2006). These all make annatto a very attractive and safe substitute pigment for many synthetic colorants, including as an alternative tracking dye for gel electrophoresis (Siva *et al.*, 2008).

However, annatto yields vary from sample to sample, and from plant to plant (Michelangeli *et al.*, 2002, Valdez-Ojeda *et al.*, 2008). Numerous methodologies have been developed to accelerate true-breeding programs; i.e, high yielding lines have been selected and vegetatively propagated for commercial

plantations (Parimalan *et al.*, 2007). In vitro regeneration of *B. orellana* has been used for the production of high-yielding and productive genotypes (Sharon & D'Souza, 2000). Portela de Carvalho *et al.* (2005) induced polyploidy *in vitro*, to duplicate the chromosome complements in interspecific hybrid crosses. Morphologic and genetic assessments were used to select the parents according to their morphological and genetic traits (Rivera-Madrid *et al.*, 2006; Valdez-Ojeda *et al.*, 2008).

Critical decisions in recurrent selection breeding include the choice of mating design and selection method, the intensity of selection applied, and proper management of inbreeding (Sleper & Poehlman, 2006). At present, information concerning the mating systems in *B. orellana* is still being discussed. Studies on artificial pollination in *B. orellana* (Rivera-Madrid *et al.*, 2006) suggest that outcrossing and selfing occur in annatto. Nevertheless, with the use of marker genes to obtain quantitative estimates of mating system parameters, we can make proper estimates of the outcrossing rates (Shaw & Allard, 1982). Molecular markers, SRAP, have not been used to analyze this event in plants as they were highly polymorphic in morphologic and genetic characterization in annatto (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008). Although their character is dominant, Ritland & Jain (1981) demonstrated that by simulation studies, this limitation could be readily overcome by multilocus estimation using a large number of dominant markers with intermediate gene frequencies and with many loci. The aim of the present study was to estimate the relative frequencies of outcrossing versus selfing in a population of *B. orellana* in Yucatan, México by Sequence Related-Amplified Polymorphism (SRAP).

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Plant Material

B. orellana seeds were collected from fields in Yucatán, México. Their location is latitude 20°13' to 20° 29' and longitude 88° 55'

to 89° 54'. The origins of selected trees were sufficiently distant from each other to allow an assumption of non-relatedness among the individuals. One hundred trees were selected for progeny testing. Open-pollinated (O.P) seeds collected from these selected trees were grown under greenhouse conditions. From the 100 O.P. families, a random sample of 11 O.P. progeny arrays of 10 individuals each, i. e. a total of 110 individuals were used for this study.

3.2.2 DNA isolation and SRAP procedure

Samples of approximately 100 mg of fresh leaf were ground in liquid nitrogen and total genomic DNA was extracted using a DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Following the method of Li and Quiros (2001), the SRAP protocol was implemented using primer combinations selected by their polymorphism in *B. orellana* (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008) as well as others selected for this study. Eighteen primer combinations were used to detect 50 polymorphic bands, which were used for this study. The SRAP analysis was performed with forward primers labeled with IRDye 800 or IRDye 700 (LI-COR, Lincoln, NE, USA). A standard PCR cocktail mix was prepared according to Valdez-Ojeda *et al.* (2008) and subjected to the following conditions: 1 cycle of 94 °C for 2 min; 5 cycles of 94 °C for 30 s, 35 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min; 35 cycles of 94 °C for 30s, 50 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min; followed by a final extension of 72 °C for 2 min. 3 µl of blue stop solution (LI-COR, Lincoln, NE, USA) were added to the PCR products prior to denaturing at 94 °C for 5 min. After denaturing, 0.6 µl of the reaction mixture were loaded into KB 6.5% gel matrix (LI-COR, Lincoln, NE, USA) and continuous 1x TBE buffer. The samples were run in triplicate to ensure band pattern reproducibility. The PCR products were run in a sequencer (IR2 4200, LI-COR, Lincoln, NE, USA).

3.2.3 Data Analysis

The bands scored "1" for presence or "2" for absence. The mating system was analyzed using the multilocus estimation of outcrossing with dominant markers procedure (MLDT) (Ritland, 1990), based upon the multilocus outcrossing estimation procedure of Ritland & Jain (1981). The MLDT specifies that both selfing and outcrossing occur in the population (Shaw & Allard, 1982). From progeny array data, the MLDT simultaneously estimated: the multilocus outcrossing rates (t_m) by the Newton-Raphson method; the average singlelocus outcrossing rate (t_s); the average singlelocus inbreeding coefficient (Wright's fixation index) of maternal parents (F); the average gene frequencies via the expectation-maximization method and; the variances of the above quantities (including t_m - t_s) using the bootstrap method where the progeny array (within families) is the unit of resampling (a minimum of 100 bootstraps were used). For each locus evaluated, the χ^2 statistic was calculated to test the null hypothesis that the number of observed progeny individuals for each genotype class from each maternal genotype plant did not differ from the expected number under the mixed mating model.

3.3 RESULTS

The SRAP markers were registered by their presence and absence (Fig. 3.1).

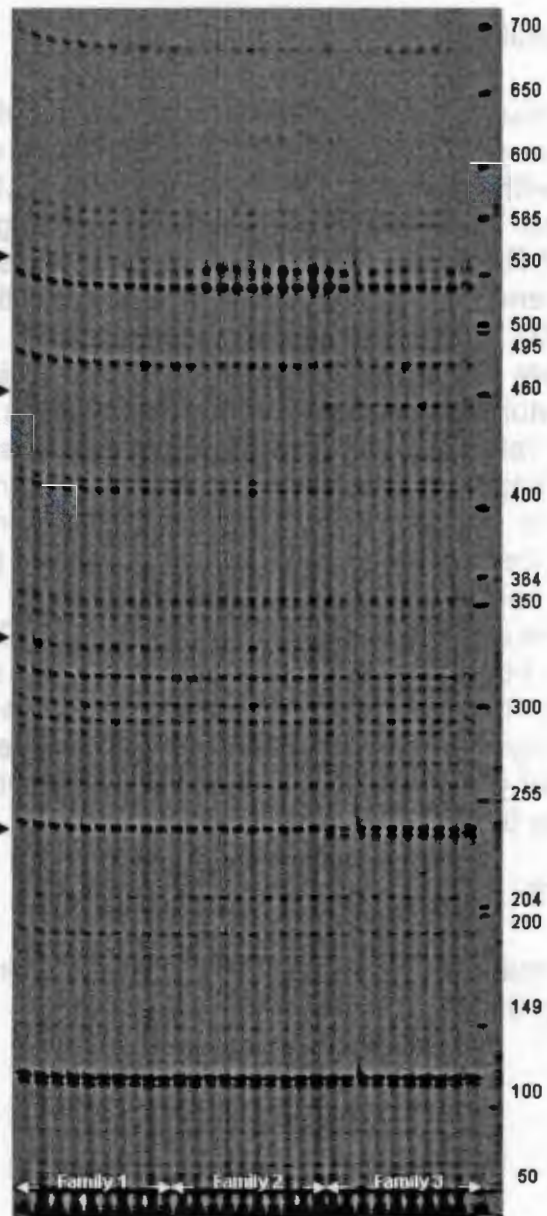


Figure 3.1 SRAP fragments generated with primer combinations SA-12 and EM-8. The families 1, 2 and 3 are indicated. The rows indicate the markers detected. Size standard (in base pairs) is shown on the left.

The more informative markers for outcrossing-rate estimation are those where the dominant allele ("band presence") occurs at a low frequency in the population, increasing the probability that the maternal plants are homozygous recessive for "band absence" (Gaiotto *et al.* 1997). The estimates of multilocus outcrossing rates (t_m) and single-locus outcrossing rates (t_s) obtained from the MLDT from SRAP data; clearly indicate that outcrossing is predominant in the *B. orellana* open-pollinated population. Even though it is not exclusive in *B. orellana*, some selfing exists (26%). The multilocus outcrossing rates based on all 50 loci were approximately 74%. The multilocus estimates significantly differ from the single locus estimates, suggesting the existence of mating among relatives (biparental breeding) (Table 3.1). The possibility of biparental inbreeding was investigated calculating the difference between the multilocus outcrossing rate and the mean of the single locus estimate. The Wright's fixation index (F), indicated high homozygosity in the progeny evaluated with random mating. The chance of inbreeding was investigated by comparing the F estimated and F expected. An χ^2 statistic to test the conformity of marker loci with the mixed-mating model indicated that for 29 SRAP markers the number of observed progeny individuals for each genotype class from each maternal genotype class departed from the expected numbers (data not presented).

Table 3.1 Outcrossing rates (t_m), mean of singlelocus (t_s) and Wright's fixation index (F).

Site	Families	Progeny	t_m	t_s	$t_m - t_s$	F
Yaxcaba	11	110	0.748	0.651	0.097	0.332
Variances			(0.097)	(0.110)	(0.103)	(0.226)

3.4 DISCUSSION

This research is the first molecular study to estimate the outcrossing rates in *B. orellana*. According to the results obtained, SRAP were highly polymorphic in *B. orellana* and adequate for evaluating the mating system in this species. Estimated outcrossing rates indicated that *B. orellana* seeds in Yucatan were the product of both selfing and outcrossing events, being preferentially from outcrossing. Recent pollination studies suggest that annatto can tolerate both pollination types indicated by the fruit set: 31.4% from self-pollination, and 57% from allogamy (Rivera-Madrid *et al.* 2006). These studies suggest that flower maturation in annatto was asynchronous on the same panicle and between different panicles, and that annatto is protandrous, that is, the anthers shed their pollen before the stigma of the same flower is receptive (Rivera-Madrid *et al.* 2006), therefore favoring outcrossing. This reproductive mechanism (documented within 50% of all angiosperms) is a pre-zygotic mechanism that favors outcrossing, reducing the frequency of selfing and biparental inbreeding (Charlesworth & Charlesworth 1987).

Inflorescence morphology can have an impact on the outcrossing rate (Sleper & Poehlman 2006). The reproduction biology in annatto has not been explained by floral morphology, although floral morphology in annatto (Rivera & Flores 1988), indicated by the position of female and male sexual organs, appears to favor selfing.

The single locus estimates in annatto were high (26%), probably due to the low genetic variability found by us in this study site by means of SRAP (Valdez-Ojeda *et al.* 2008). This could be because the seeds from maternal plants were probably introduced independently, propagated and maintain by different households.

The difference between the multilocus rate and single-locus estimates suggests the existence of biparental breeding. This biparental breeding or mating between relatives causes inbreeding with increased homozygosity (Ritland, 2002), which

is indicated by the single-locus rate in this study. Artificial pollination studies indicate that seed set per fruit was higher in the cross pollination of the white variant with the pink and/or purple flower variants, than in crosses between white variants (Rivera-Madrid *et al.* 2006). This appears to indicate that the mating system obeys phenotypic traits between relatives. On the other hand, we could assume inbreeding depression with respect to white variants; probably they are related by ascendance.

The Wright's fixation (F) value, in the progeny estimated from SRAP data, was lower than expected based on the estimate of t_m . Taking $t_m = 0.748$, the expected fixation index was $[F = (1-t)/(1+t)] = 0.144$, while the estimated value was 0.332. A higher than expected index suggests an excess of homozygotes and higher inbreeding than expected in the progenies of *B. orellana* analyzed. Although the maternal plants were randomly collected, the excess of homozygotes indicated by the fixation index, correspond to the low variability found in *B. orellana* at this collection site (Valdez-Ojeda *et al.* 2008). A χ^2 test indicated that observed progeny genotype frequencies did not conform to those expected under mixed mating for some marker loci. Several factors can contribute to such violations: selection against homozygous genotypes, genotype-dependent outcrossing rate, and unbalanced frequencies of pollen in the population (Ritland, 1983).

3.5 CONCLUSIONS

This study contributes to the annatto improvement, in the sense to designing programs according to annatto mating system. In addition, we are interested in improving the knowledge and understanding of the nature of pollination in areas such as: floral structure and their relation with the mating system; the compatibility of morphotypes from the point of view of floral morphology; the contribution of agents in pollen and seed dispersal and the identification of these agents like bees,

wasps, flies, wind; and the identification of how many parents contribute to outcrossing, among other issues.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the International Foundation for Science (IFS) F/2932-3 and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 46541 and UC Mexus. V-O R was supported by CONACYT PhD grant No 185874.

LITERATURE CITED

- Charlesworth, D. and B. Charlesworth** (1987). *Inbreeding Depression and Its Evolutionary Consequences*. Annual Review Ecology System. 18, 237-268.
- Gaiotto, F. A., M. Bramucci and D. Grattapaglia** (1997). *Estimation of outcrossing rate in a breeding population of Eucalyptus urophylla with dominant RAPD and AFLP markers*. Theoretical and Applied Genetic, 95, 842-849.
- Júnior, A. C. T. S., L. M. B. O. Asad, E. B. De Oliveira, K. Kovary, N. R. Asad and I. Felzenszwalb** (2005). *Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress*. Genetic and Molecular Research, 4, 94-99.
- Li, G. and C. F. Quiros** (2001). *Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in Brassica*. Theoretical and Applied Genetic, 103, 455– 461.
- McGonigle, K. E. M. and K. J. McCracken** (2002). *Study on the effects of annatto (Bixa orellana) and Yucca Schidegera on cholesterol content and yolk colour*. British Poultry Science. 43, S41–S42.
- Michelangeli, C., A. M. Medina, P. Artioli and J. Mata** (2002). *Microsporogénesis y Microgametogénesis de Onoto (Bixa orellana L.)*. Acta Científica Venezolana, 53, 171-175.

- Parimalan, R., P. Giridhar, B. G. Harischandra and G. A. Ravishankar** (2007). *Organogenesis from cotyledon and hypocotyl-derived explants of japhara (Bixa orellana L.)*. Acta Botánica Croatica. 66(2), 153–160.
- Portela de Carvalho, J. F. R., C. R. De Carvalho and O. W. Campos** (2005). *In vitro induction of polyploidy in annatto (Bixa orellana)*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 80, 69–75.
- Ritland, K. and S. Jain** (1981). *A Model for the Estimation of Outcrossing Rate and Gene Frequencies Using n Independent Loci*. Heredity, 47, 35-52.
- Ritland, K.** (1983). "Estimation of mating systems", in *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A*, Tanksley S. D. and T. J. Orton (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 289-302.
- Ritland, K.** (1990). *A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems*. Heredity, 47, 37-54.
- Ritland, K.** (2002). *Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci*. Heredity, 88, 221–228.
- Rivera-Madrid, R., R. M. Escobedo-GM, E. Balam-Galera, M. Vera-Ku and H. Harries** (2006). *Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (Bixa orellana L.)*. Scientia Horticulturae, 109, 165–172.
- Rivera, D. I. and E. M. Flores** (1988). *Morfología floral del achote, Bixa orellana L (Bixaceae)*. Revista de Biología Tropical, 36, 499-509.
- Rojas, J. J., V. J. Ochoa, S. A. Ocampo and J. F. Muñoz** (2006). *Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 6, 1–6.
- Russell, K. R. M., E. Y. S. A. Morrison and D. Ragoobirsingh** (2005). *The effect of annatto on insulin binding properties in the dog*. Phytotherapy and Research, 19, 433-436.

- Sharon, M. and D'Souza, M. C.** (2000). *In vitro clonal propagation of annatto (Bixa orellana L.)*. Current Science, 78(12), 1532-1535.
- Shilpi, J. A., Md. Taufiq-Ur-Rahmanb, S. J. Uddin, Md. S. Alamc, S. K. Sadhu and V. Seidel** (2006). *Preliminary pharmacological screening of Bixa orellana L. leaves*. Journal of Ethnopharmacology. 108, 264–271.
- Sleper, D. A. and J. M. Poehlman** (2006). "Methods in Plant Breeding", in *Breeding Field Crops*, Sleper D. A. and Poehlman J. M. (eds). Blackwell Publishing, Iowa. 155-182
- Siva, R., G. J. Mathew, A. Venkat and C. Dhawan** (2008). *An alternative tracking dye for gel electrophoresis*. Current Science, 94, 765-767.
- Shaw, D. V. and R. W. Allard** (1982). *Estimation of outcrossing rates in Douglas-fir using isozyme markers*. Theoretical and Applied Genetic, 62, 113-120.
- Valdez-Ojeda, R., J. L. Hernández-Stefanoni, M. Aguilar-Espinosa, R. Rivera-Madrid, R. Ortiz and C. F. Quiros** (2008). *Assessing Morphological and Genetic Variation in Annatto (Bixa orellana L.) by Sequence-related Amplified Polymorphism and Cluster Analysis*. Hortscience, 43, 2013-2017.

Capítulo 4

Mapa genético preliminar de *Bixa orellana* (L) usando polimorfismo amplificado de secuencia relacionada (SRAP)³

RESUMEN

Bixa orellana L. ($2n = 14$), es una planta tropical y perenne de ciclo anual. Esta especie es usada comercialmente por su biosíntesis de bixina, el segundo colorante natural más importante a nivel mundial. Durante los últimos diez años, la variación contrastante en los rendimientos y en la calidad de bixina, han motivado el desarrollo de estrategias para su mejoramiento genético. En este sentido, este trabajo se enfocó en la utilización del polimorfismo amplificado de secuencia relacionada (SRAP) para generar, por vez primera, un mapa genético preliminar usando una población F1. Esta población F1, constituida por 150 individuos segregantes, fue obtenida cruzando el parental masculino que presenta altos contenidos de bixina y cápsula dehiscente, con el parental femenino que presenta bajos contenidos de bixina y cápsula indehiscente. Veintiún pares de cebadores polimórficos SRAP fueron seleccionados para detectar 63 marcadores en la población F1. De éstos marcadores, 49 segregaron del parental masculino y 14 del parental femenino. El análisis indicó que 33 marcadores segregaron mendelianamente 1:1 ($P \geq 0.05$). Éstos marcadores fueron utilizados para generar un mapa con el programa JoinMap. Cuatro grupos de ligamiento (GL) fueron generados con un valor LOD de 3.0. Los GL formados de 2 a 9 marcadores abarcan 381.9 cM Haldane del genoma de *B. orellana*. La incorporación de un mayor número de marcadores detectados permitirá la generación de todos los 7 grupos de ligamiento esperados. Este estudio demuestra que SRAP es un

marcador molecular efectivo para generar un mapa genético preliminar de achiote

ABSTRACT

Bixa orellana L. ($2n = 14$) is a tropical perennial plant with an annual cycle. This species is used commercially for its biosynthesis of bixin, the second most important natural colorant worldwide. During the last ten years, the contrasting variation in the yields and quality of bixin has led to the development of strategies for genetic improvement. In this context, this research focuses on the use of sequence-related amplified polymorphism (SRAP) to generate, for the first time, a preliminary genetic map using an F1 population. This F1 population, that constituted 150 segregating individuals, was obtained by crossing the male parent, which presented high bixin contents and dehiscent pods, with the female parent, which presented low bixin contents and indehiscent pods. Twenty-one polymorphic SRAP primers were selected to detect 63 markers in the F1 population. From those markers, 49 were segregated from the male parent and 14 from the female parent. The analysis showed that 33 markers segregated in an expected Mendelian segregation ratio of 1:1 ($P \geq 0.05$). These markers were used to generate a map with the software JoinMap. Four linkage groups (LGs) were generated with an LOD score of 3.0. LGs containing 2 to 9 markers covered 381.9 Haldane cM of the *B. orellana* genome. The incorporation of additional markers will allow the generation of all 7 expected linkage groups. This study demonstrates that SRAP is an effective molecular marker for generating a preliminary genetic map in annatto.

³Preliminary Genetic Map of *B. orellana* using Sequence-related Amplified Polymorphism. Ruby Valdez-Ojeda, Carlos F. Quiros, Margarita Aguilar-Espinosa and Renata Rivera-Madrid.

4.1 INTRODUCTION

Bixa orellana L. is a tropical perennial tree with annual flowering and fructifying cycles. This crop is broadly distributed around the neotropic zone. The reproduction of *B. orellana* ($2n = 14$) is sexual and auto-incompatible (Rivera-Madrid *et al.*, 2006) and the mating system is currently under study (Valdez-Ojeda *et al.*, submitted). The great morphologic and genetic heterogeneity and the biosynthesis of bixin are characteristic of this species (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008).

Bixin is the second most important colorant worldwide and demand for it continues to increase due to the toxicity of synthetic colorants (Bittencourt *et al.*, 2005). Bixin is used in the Food Industry for its beneficial effects on human health (Russell *et al.*, 2005; McGonigle & McCracken, 2002; Júnior *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2006; Shilpi *et al.*, 2006).

The recent use of SRAP in annatto (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008) has made it possible to generate a genetic map. The information from this map can be used in breeding programs to quickly locate genes of interest, such as those involved in bixin biosynthesis and pod dehiscence for introgression using Marker Assisted Selection (MAS). Genetic mapping is a prerequisite for comparative mapping between *Bixa* spp, to investigate possible differences in genome size and gene organization.

SRAP have been used for genetic mapping in numerous species, representing an attractive alternative over other marker systems such as restriction fragment length polymorphism (RFLP), amplified fragment length polymorphism (AFLP) and simple sequence repeats (SSR) (Okasaki *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007). SRAP detected more than 50% of all polymorphic fragments in species such as cotton and *Brassica oleracea*. SRAP are efficient markers for exploring the genome and detecting genetic polymorphism, important characteristics in the selection of a molecular marker for use in genetic mapping.

Controlled crosses of *B. orellana* can be carried out each September when it flowers. The development of an F2

population can take between 3 to 5 years. To deal with this issue, we studied the morphological and genetic traits in *B. orellana* (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008) to identify characters associated with bixin content and select potential parents. Based on this information, diploid parents with extremely contrasting phenotypic traits in bixin content, pod dehiscence, thorns, and flower color, were crossed using an artificial pollination system (Rivera-Madrid *et al.*, 2006) to obtain an F1 population. This population was used to detect SRAP markers and to generate the first preliminary genetic map of *B. orellana*, based on genetic linkage groups produced according to recombination frequencies of the segregating markers.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Plant Material

Previously selected individuals of *B. orellana* were crossed. The male parent, had pink flowers, higher bixin content (>2.7%), red pods with a few thorns and was dehiscent, while the female parent had white flowers, lower bixin content (<2.7%), green pods with many thorns and was indehiscent (Fig. 4.1) (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008). One hundred and fifty segregants from the F1 population were grown by *in vitro* methods to secure the germination. Seedlings were then acclimated and transplanted to garden conditions. The morphological traits from the progenie were not testing because only are one year old. We have to wait one more year to get flowers and fruits.

(A) 'Male parent'



(B) 'Female parent'



Figure 4.1 Morphological traits of the parental lines selected for crossing: **A.** male parent with pink flowers, higher content of bixin (>2.7%), red pods with a few thorns and dehiscent. **B.** female parent, with white flowers, lower content of bixin (<2.7%), green pods with many thorns and indehiscent.

4.2.2 DNA extraction and SRAP procedure

A sample of ≈ 100 mg of fresh leaf tissue from both parents and the F_1 progeny was ground individually in liquid nitrogen and total genomic DNA was extracted using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Following the method of Li and Quiros (2001), the SRAP protocol was implemented using 40

primer combinations, from which we selected 21 for their polymorphism in *B. orellana* (Table 4.1). The SRAP analysis was performed with forward primers labeled with IRDye 800 or IRDye 700. A standard polymerase chain reaction (PCR) cocktail mix was prepared according to Valdez-Ojeda *et al.* (2008) and subjected to the following conditions: 1 cycle of 94 °C for 2 min; 5 cycles of 94 °C for 30 s, 35 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min; and 35 cycles of 94 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, followed by a final extension of 72 °C for 2 min. 3 µl of stop solution (LI-COR, Lincoln, NE, USA) was added to the PCR products before denaturing at 94 °C for 5 min. After denaturing, 0.6 µl of the reaction mixture was loaded into 6.5% Gel matrix KB Plus (LI-COR, Lincoln, NE, USA) and continuous 1x TBE buffer. The samples were run in duplicate to ensure band pattern reproducibility. The PCR products were run on an IR2 4200 sequencer (LI-COR, Lincoln, NE).

Table 4.1 Sequences of SRAP primers used in this study.

SRAP primer combinations	Sequences
Me2 - Sa9	TGAGTCCAAACCGGAGC – GTTGAGAGTGTGATTGGT
Em2 - Odd38	GACTGCGTACGAATTCTGC - T TGGATCTGTTGGTTAC
Odd8 - Ga30	CAC AAG TCG CTG AGA AGG – TCATCTCAAACCATCTACAC
Odd3 - Odd21	CCAAAACCTAAAACCAGGA – CAGAGTAATTGCCATGAAATG
Em1 - Ga3	GACTGCGTACGAATTCAAT – GTCCAATTGAGAGAGAG
Em1 - Odd19	GACTGCGTACGAATTCAAT- AGCTTTACGGACATCACTC
Em1 - Odd21	GACTGCGTACGAATTCAAT – CAGAGTAATTGCCATGAAATG
Odd3 - Pm3	CCAAAACCTAAAACCAGGA – ACAAGATTTTGAGAATACTAC
Em1 - Odd2	GACTGCGTACGAATTCAAT- TTAGTCTTCACTTCCAAACC
Em1 - Odd45	GACTGCGTACGAATTCAAT – AAGTGAAGTGCCTACAATAC
Me2 - Sa16	TGAGTCCAAACCGGAGC – AATGTTGTATGACCAAGGTAA
Odd3 - Ce12	CCAAAACCTAAAACCAGGA – TTGCCTTACTGGGAATTTAC
Me2 - Ga45	TGAGTCCAAACCGGAGC – AGTGGTATTTTTGCAGTTCTA

Me2 - Odd11	TGAGTCCAAACCGGAGC – ATTATTATTGGGATGCAAAGT
Me2 - Odd15	TGAGTCCAAACCGGAGC – GCGAGGATGCTACTGGTT
Dc1 - Odd19	TAAACAATGGCTACTCAAG – AGCTTTACGGACATCACTC
Me2 - Odd15	TGAGTCCAAACCGGAGC – GCGAGGATGCTACTGGTT
Dc1 - Odd23	TAAACAATGGCTACTCAAG – CTCCTCGTCCTTCATCTC
Dc1 - Odd15	TAAACAATGGCTACTCAAG – GCGAGGATGCTACTGGTT
Dc1 - Odd2	TAAACAATGGCTACTCAAG – TTAGTCTTCACTTCCAAACC
Me2 - Odd26	TGAGTCCAAACCGGAGC – CTATCTCTCGGGACCAAAC

4.2.3 Linkage analysis

Polymorphic bands were registered according to parent origin from the marker band in the F₁ population. The markers obtained from the F₁ population were registered using the cross-pollinator or out breeder full-sib family (CP) population type (heterozygous parents, four possible alleles) coding for JoinMap® 4.0 software (Van Ooijen, 2006). CP is a population resulting from a cross between two heterogeneously heterozygous and homozygous diploid parents. Linkage phases for this population are originally or possibly unknown. The markers segregating 1:1 with one heterozygous parent and the other one homozygous at that locus were coded as 'lm' (present), 'll' (absent), or '-' (undetermined). The candidate markers segregating 3:1 were coded as 'h-' (present), 'kk' (absent), or '-' (undetermined).

A Chi-square goodness-of-fit test was applied to all loci for a theoretical Mendelian segregation ratio of 1:1 or 3:1. Markers with segregation ratios significantly different (significance level < 0.05) were omitted and linkage analysis was performed with the remaining markers. Markers' positions were determined using a minimum LOD score of 3.0, a recombination frequency of 0.25, a maximum θ of 1.0, and a threshold of 3.0 for removal of loci with respect to jumps in goodness-of-fit. The recombination fractions were translated

into map distances (cM) with Haldane's mapping function, as well as the multipoint maximum likelihood (ML). We used these parameters to develop the map, because for a CP type population, derived from two independent meiosis divisions, the likelihood is correct, it is not an approximation. The likelihood method employed assumes that adjacent chromosome segments are independent of their recombination events. On the other hand, the Haldane mapping function applies to the situation that assumes no crossover interference, similar to the CP population type (Van Ooijen, 2006).

4.2.4 Genome length

Genome length, \hat{G} , was estimated using the method of Hulbert *et al.* (1988), and Chakravarti *et al.* (1991), in which $\hat{G} = n(n-1)d/k$, where n is the total number of markers, d is the map distance corresponding to the LOD threshold T for declaring linkage, and k is the number of markers linked at LOD T or greater. We chose the locus with the largest estimated θ value from all the locus pairs with LOD scores of 2.0. This θ value was used in Haldane's mapping function to obtain d .

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1 Linkage analysis

The primer combinations Me-2 and Sa-16 detected 7 polymorphic loci, in contrast to the average number of loci detected (2.9) by the other primer combinations used (Table 4.1). Figure 4.2 shows an example of a typical banding pattern with the primer combination Dc-1 and Odd-23.

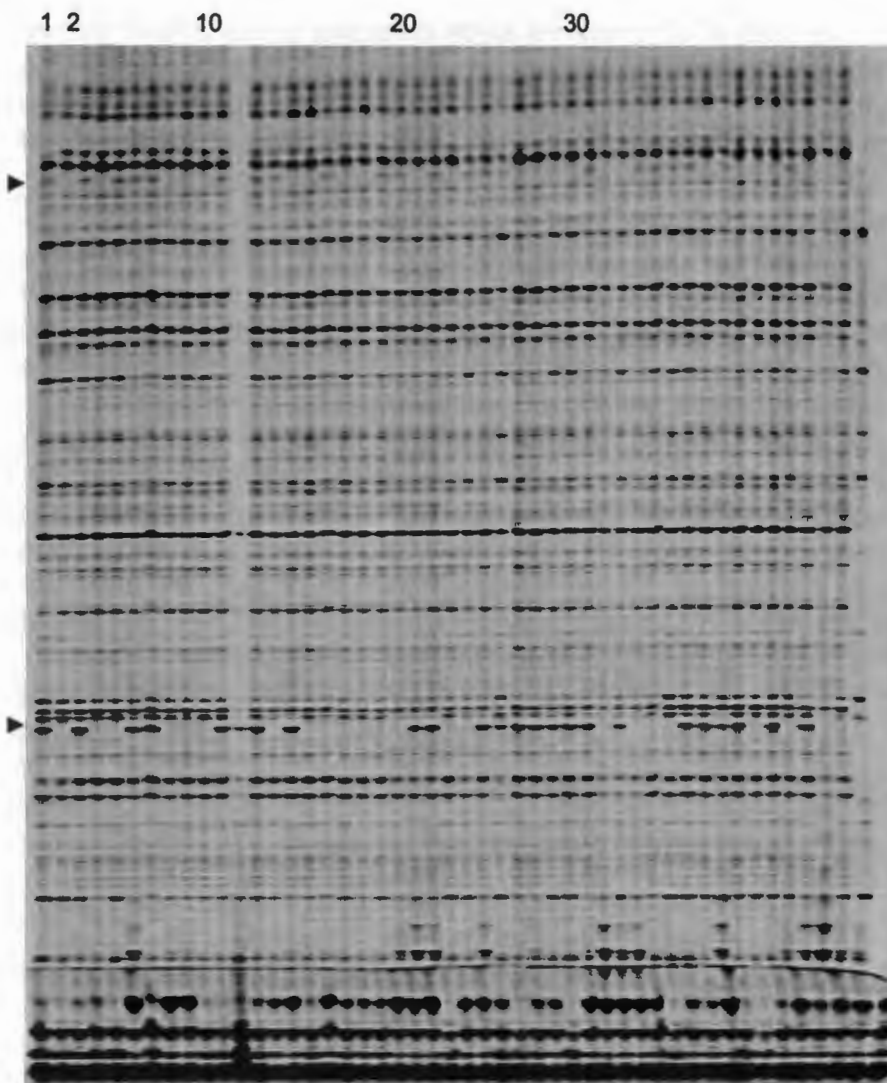


Figure 4.2 Fragment of TIFF image with the SRAP marker combination Dc1 and Odd23. Lanes 1 and 2 contain DNA from 'male parent' and 'female', respectively. Lanes 3-47 contain DNA from the segregants F1. The fragments present in a segregant with respect to the absence or presence in the parents were registered for their polymorphism.

A total of 63 markers were detected by 21 SRAP primer combinations; from those, 49 segregated from male parent and 14 from female parent. Those showing missing data were eliminated. The remaining markers (55) were evaluated; of these, 22 SRAP markers (40%) showed significant segregation distortion or deviation from the expected genotypic proportion of 1:1 ($\chi^2 > 3.84$; $P \leq 0.05$) with one degree of freedom and were eliminated from the analysis. All markers evaluated with genotypic proportion of 3:1 showed deviation therefore the markers were not analyzed, probably the incorporation of more markers detected will allow detect the genotypic proportion 3:1. Segregation distortion is a natural phenomenon especially with divergent parents, as in the case of an inter-specific cross, where the progeny inherit alleles from one of the parents in a greater proportion with respect to the other, a phenomenon known as meiotic drive (Mensúa, 2003). However, we consider that in this study the distortion could be owed to the detection of chloroplastic sequences or artefacts of amplification.

A total of 33 markers showed a Mendelian segregation of 1:1 ($P \geq 0.05$), and were analyzed using JoinMap software (version 4.0). Four linkage groups (LG) with an LOD score of 3.0 (Fig. 4.3) were generated. LGs containing between 2 and 9 markers, covered 381.9cM Haldane of the *B. orellana* genome (Table 4.2)

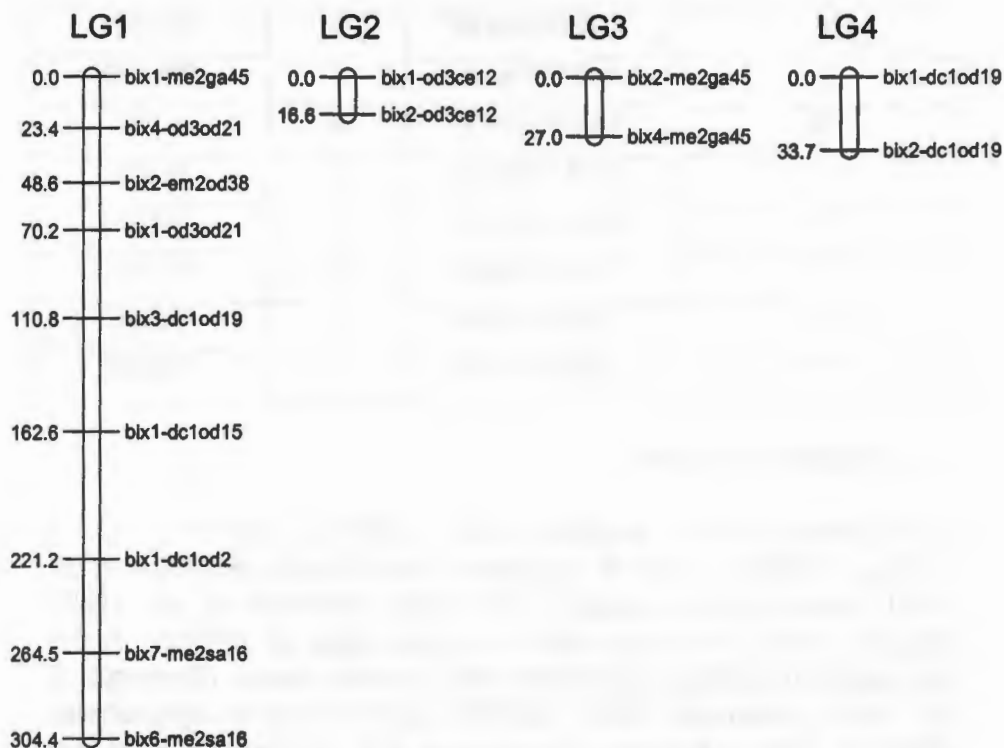


Figure 4.3 Genetic linkage map of the F1 segregant population ('male parent', x 'female parent'). The map was estimated by 381.9 cM Haldane. 4 linkage groups were generated with $LOD \geq 3.0$ and $\theta \leq 0.4$.

Table 4.2 Marker number, locus, linkage group and cM position.

Marker number	Locus	Group	cM position
1	bix1-me2ga45	1	0.000
2	bix4-od3od21	1	23.390
3	bix2-em2od38	1	48.567
4	bix1-od3od21	1	70.233
5	bix3-dc1od19	1	110.760
6	bix1-dc1od15	1	162.581
7	bix1-dc1od2	1	221.193

8	bix7-me2sa16	1	264.281
9	bix6-me2sa16	1	304.145
10	bix1-od3ce12	2	0.000
11	bix2-od3ce12	2	16.824
12	bix2-me2ga45	3	0.000
13	bix4-me2ga45	3	27.028
14	bix1-dc1od19	4	0.000
15	bix2-dc1od19	4	33.549

4.3.2 Genome length

DNA content of *B. orellana* from a diploid genome, 1C, is 0.20pg of DNA, which is equivalent to 191Mpb (Hanson *et al.* 2001) since 1pg is equal to 980 Mpb (Bennett *et al.*, 2000; Dolezel, 2003). In plants there is a great deal of variation in the equivalence between physical and genetic maps (Semagn *et al.*, 2006), however, Mézar (2006) showed that in *Arabidopsis thaliana* 1cM = 217Kpb. Considering this correspondence, we estimated the *B. orellana* genome to be approximately 880.64cM. Therefore, 496.7 Haldane cM remain to be explored.

On the other hand, an approximate calculation made using the Hulbert *et al.* (1988) and Chakravarti *et al.* (1991) methods showed the genome length estimate (\hat{G}) to be 117.154 cM. This is based on a total of 528 linked marker pairs that were detected using an LOD threshold of 2.0, where n represents the 33 markers used in linkage analysis with a significance level less than 0.05. The maximum map distance associated with an LOD score of 2.0 was 58.577cM.

The difference between the calculated genome length (117.154cM) and that estimated for the linkage groups (381.9cM) is probably because the mapping function multipoint maximum likelihood recommended by Van Ooijen (2006), to CP type populations, form extreme linkage groups. Increased incorporation of markers will allow a better approximation of the

calculation carried out for genome coverage according to Hulbert *et al.* (1988) and Chakravarti *et al.* (1991).

4.4 CONCLUSIONS

The detection and incorporation of more loci will allow the generation of all expected 7 linkage groups and examine the genotypic segregation 3:1. This study also demonstrates that 15 loci detected by SRAP with a Mendelian segregation of 1:1 were successfully mapped on 4 genetic linkage groups from the 7 expected. SRAP markers were polymorphic in *B. orellana* according to the results obtained in this study and those obtained from molecular characterization in *B. orellana* (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008).

To our knowledge, this research represents the first effort to generate a preliminary linkage map of *B. orellana* from an F1 population, given the time required to obtain an F2 population. To resolve this problem, an alternative is to produce a perpetual mapping population of homozygous recombinant lines of *B. orellana*. This can be through lines obtained from doubled haploids (DH), which are produced by duplicating the chromosome number from the F1 microspore population. The plants are regenerated using anthers or microspore tissue culture, thus obtaining homozygous recombinant lines in a single generation, and so reducing time and resources (Semagn *et al.* 2006). In *B. orellana* there have been previous studies to produce polyploidy using hypocotyl segments or cotyledonary nodes and chemical treatments based on colchicine to prevent the synthesis of the meiotic spindle that separates the sets of chromosomes, thus leading to duplication of the chromosome set (Portela de Carvahlo *et al.*, 2005).

The performance of multiple crosses between parents with high levels of bixin content and parents with indehiscent pods will allow us to analyze the segregation of alleles which control these traits in F1 populations. With this, we will explore different recombination events to generate a genetic map in annatto.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the International Foundation for Science (IFS) F/2932-3 and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 46541 and UC Mexus. V-O R was supported by the CONACyT PhD grant No. 185874. We thank Dr. Francisco Luna for informatics assistance with the JoinMap software and Dra. June Simpson for academic advice.

LITERATURE CITED

- Alwala, S.** (2007). *Predicting progeny performance and genome analysis in sugarcane (Saccharum spp)*. Dissertation, University of Louisiana.
- Arce, J.** (1999). *El achioté Bixa orellana L. cultivo promisorio para el trópico*, EARTH, Costa Rica. Pp. 1-36.
- Bittencourt, C., M. P. Felicissimo, J-J. Pireaux and L. Houssiau** (2005). *Study of annatto from Bixa orellana seeds: an application of time-of-flight secondary ion mass spectrometry* Spectroscopy Europe, 17(2), 16-22.
- Bennett, M. D. and I. J. Leitch** (2001). *Nuclear DNA amounts in pteridophytes*, Annals of Botany, 87, 335-345.
- Chen, W., Y. Zhang, X. Liu X, B. Chen, J. Tu and F. Tingdong** (2007). *Detection of QTL for six yield-related traits in oilseed rape (Brassica napus) using DH and immortalized F2 populations*. Theoretical and Applied Genetic, 115, 849–858.
- Chen, B. Y., X. M. Wu, G. Y. Lu, G. Z. Gao, K. Xu and X. Z. Li** (2006). *Molecular mapping of the gene(s) controlling petal-loss trait in Brassica napus* Chinese, 28(6), 707-712.
- Chakravarti, A., L. K. Lasher and J. E. Reefer** (1991). *A maximum likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data* Genetics. 128:175–182.

- Doležel, J. J., Bartoš, H. Voglmayr and J. Greilhuber (2003).** *Nuclear DNA content and genome size of trout and human* Cytometry, 51, 127-128.
- Gao, M., G. Li, B. Yang, D. Qiu, M. Farnham and C. Quiros (2007).** *High-density Brassica oleracea linkage map: identification of useful new linkages* Theoretical and Applied Genetic, 115, 277-287.
- Hanson, L., K. A. McMahon, M. A. T. Johnson and M. D. Bennett (2001).** *First nuclear DNA C-values for another 25 angiosperm families* Annals of Botany, 88, 851-858.
- Hulbert, S. H., T. W. Ilott, E. J. Legg, S. E. Lincoln, E. S. Lander and R. W. Michelmore (1988).** *Genetic analysis of the fungus, Bremia lactucae, using restriction fragment length polymorphisms* Genetics, 120, 947-958.
- Li, S., J. Jia, X. Wei, X. Zhang, L. Li, H. Chen, Y. Fan, H. Sun, X. Zhao, T. Lei, Y. Xu, F. Jiang, H. Wang and L. Li (2007).** *An intervarietal genetic map and QTL analysis for yield traits in wheat* Molecular Breeding, 20, 167-178.
- Li, G. and C. F. Quiros (2001).** *Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica* Theoretical and Applied Genetic, 103, 455-461.
- Lin, Z., X. Zhang, Y. Nei, D. He and M. Wu (2003).** *Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP*, Chinese Science Bulletin, 48(19), 2063-2067.
- Lin, Z., D. He, X. Zhang, Y. Nie, X. Guo, C. Feng and J. S. McD (2005).** *Linkage map construction and mapping QTL for cotton fibre quality using SRAP, SSR and RAPD*. Plant Breeding, 124, 180-187.
- Marcos de Almeida, P., C. R. Carvalho and W. R. Clarindo (2006).** *Classical and Molecular Cytogenetic Tools to Resolve the Bixa Karyotypes*, Cytologia, 71(4), 391-398
- Meng-yang, J. M. Sc., L. Jia-na, F. Fu-you, Z. Zheng-sheng, Z. Xue-kun and L. Lie-zhao (2007).** *QTL Analysis of the Oil Content and the Hull Content in Brassica napus L.* Agricultural Sciences in China, 6(4), 414-421.

- Mensúa, J. L.** (2003). *Genes ligados* En: Mensúa JL, Genética problemas y ejercicios resueltos Pretince Hall, España Pp. 113-118.
- Mézar, C.** (2006). *Meiotic recombination hotspots in plants*. Biochemical society transactions, 34(4), 531-534.
- Michelangeli, C., M. A. Maureen, P. Artioli and J. Mata** (2002). *Microsporogénesis y microgametogénesis de onoto (Bixa orellana L.)* Acta Científica Venezolana, 53(3), 171-175.
- Okazaki, K., K. Sakamoto, R. S. A. Kikuchi, E. Togashi, Y. Kuginuki, S. Matsumoto and M. Hirai** (2007). *Mapping and characterization of FLC homologs and QTL analysis of Xowering time in Brassica oleracea*, Theoretical and Applied Genetic, 114, 595–608.
- Paterson, A. H., J. E. Bowers, M. D. Burow, X. Draye, C. G. Elsik, C-X. Jiang, C. S. Katsar, T. H. Lan, Y. R. Lin, R. Ming and R. J. Wright** (2000). *Comparative genomics of plant chromosomes* Plant Cell, 12, 1523-1539.
- Portela de Carvalho, J. F. R., C. R. De Carvalho and O. W. Campos** (2005). *In vitro induction of polyploidy in annatto (Bixa orellana)*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 80, 69–75.
- Pradhan, A. K., V. Gupta, A. Mukhopadhyay, N. Arumugam, Y. S. Sodhi and D. Pental** (2003). *A high-density linkage map in Brassica juncea (Indian mustard) using AFLP and RFLP markers*, Theoretical and Applied Genetic, 106, 607–614.
- Rivera-Madrid, R., R. M. Escobedo-GM, E. Balam-Galera, M. Vera-Ku and H. Harries** (2006). *Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (Bixa orellana L.)* Scientia Horticulturae, 109, 165–172.
- Semagn, K, A. Bjørnstad and M. N. Ndjiondjop** (2006). *Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants*. African Journal of Biotechnology, 5(25), 2569-2587.
- Sun Z, Z. Wang, J. Tu, J. Zhang, F. Yu, P. B. E. McVetty and G. Li** (2007). *An ultradense genetic recombination map*

for Brassica napus, consisting of 13551 SRAP markers. Theoretical and Applied Genetic, 114, 1305–1317.

- Valdez-Ojeda, R., M. Aguilar-Espinosa, R. Ortiz, C. F. Quiros, J. L. Stefanoni-Hernandez and R. Rivera-Madrid** (2008). *Assessing genetic variation for morphological traits and molecular markers in annatto (Bixa orellana L.) in Yucatan, Mexico. Hortscience, 43(7), 2013–2017*
- Van-Ooijen, J. W.** (2006). *JoinMap® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B. V., Wageningen, Netherlands.*
- Wang, G., J. Pan, X. Li, H. He, A. Wu and R. Cai** (2005). *Construction of a cucumber genetic linkage map with SRAP markers and location of the genes for lateral branch traits. Science China Current Life Science, 48(3), 213-20.*
- Yu J., S. Yu, C. Lu, W. Wang, S. Fan, M. Song, Z. Lin, X. Zhang and J. Zhang** (2007). *High-density Linkage Map of Cultivated Allotetraploid Cotton Based on SSR, TRAP, SRAP and AFLP Markers Journal of Integrative, Plant Biology, 49(5), 716–724.*

Capítulo 5

Discusión general

Los estudios desarrollados en este trabajo contribuirán en el programa de mejoramiento de achiote que se está desarrollando en el grupo de la Dra. Renata Rivera en la UBBMP-CICY. Además permitirá diseñar sistemas adecuados para su mejoramiento, a través de la caracterización morfológica y genética, el sistema reproductivo y un mapa genético preliminar.

1. Evaluación morfológica y análisis genético del achiote (*Bixa orellana* L.) por polimorfismo amplificado de secuencia relacionada y análisis de grupos

La necesidad de la reducción de la variación, el incremento del contenido y la calidad de bixina, a partir del material vegetal existente, condujo al estudio de las características que podrían favorecer la obtención de mejor calidad y mayores contenidos de bixina, como la indehiscencia de la cápsula y el color de la flor, entre otros.

En este sentido, el análisis morfológico realizado, en el presente trabajo, concentró en un sólo grupo, individuos con características deseables para el mejoramiento genético de *B. orellana*: cápsulas con espinas cortas a intermedias; color rosado o púrpura y cápsulas de color rojo. Otro grupo reunió individuos que presentaron cápsulas indehiscentes, característica importante para el mejoramiento, debido a que la indehiscencia podría influir en el incremento del rendimiento del cultivo (Roberts *et al.*, 2002). Por el contrario, la dehiscencia en las cápsulas ocasiona la exposición de las semillas a la luz solar, conduciendo a la fotooxidación y degradación de la bixina repercutiendo en el rendimiento del contenido de bixina (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Los caracteres identificados en este trabajo, para el mejoramiento genético de *B. orellana*, son iguales a los seleccionados por Medina *et al.* (2002) en una

colección de individuos de *B. orellana* de Brasil. De acuerdo a los resultados obtenidos por Medina *et al.* (2002), la dehiscencia de las cápsulas se encuentra asociada con una coloración de semilla de baja calidad, así como con frutos de alta espinosidad y espinas largas, características indeseables, considerando que la cosecha se realiza manualmente. Los mismos autores sugieren que cápsulas grandes e indehiscentes serían deseables para la obtención de semillas con mayor contenido de bixina y de buena calidad; siendo a su vez, cápsulas que se manejarían con más facilidad durante la cosecha. Los resultados obtenidos por Mazzani *et al.* (2000), son igualmente similares a los obtenidos en el presente trabajo. Estos investigadores, mencionan que los frutos con ápice puntiagudo presentan dehiscencia menor que los de ápice apiculado. Los frutos dehiscentes presentaron menor densidad de las espinas. Los frutos con menor indehiscencia mostraron una mayor densidad de espinas.

Las cruzas entre los diferentes grupos morfológicos formados mediante el estudio realizado en este trabajo, tienen el potencial para producir una recombinación de caracteres deseados en la descendencia híbrida. Sin embargo, la caracterización morfológica no es suficiente, debido a que para efectos de mejoramiento genético es preferible que los parentales involucrados sean también divergentes genéticamente. Por lo que realizamos la caracterización genética de los mismos para determinar la variabilidad genética en *B. orellana*. En este sentido, los marcadores moleculares SRAP, se utilizaron para analizar la variación genética en los individuos estudiados. Basados en el índice de similitud genética, todos los individuos son variables genéticamente, por lo que el entrecruzamiento entre estos individuos con fines de mejoramiento genético pudiera permitir ampliar la variación genética en la descendencia. Portela de Carvahlo *et al.* (2005), igualmente encontraron alta variabilidad genética en los sitios de colecta más aislados de *B. orellana*, mediante isoenzimas. Medina *et al.* (2001), mostraron que mediante los patrones electroforéticos utilizados, se puede establecer un sistema de

clasificación para identificar genotipos y determinar la variabilidad genética existente en esta especie.

Los marcadores SRAP detectados en los individuos muestreados, no separaron a los individuos de acuerdo a las características morfológicas, contrario a los resultados obtenidos por Espósito *et al.* (2007) en cultivares de chícharos y de jitomate (Ruiz *et al.*, 2005), donde los cultivares se agruparon de acuerdo a los morfotipos analizados. Sin embargo, los marcadores detectados en este estudio mostraron alta variabilidad genética en los individuos muestreados.

2. Tasas de entrecruzamiento en *Bixa orellana* L. mediante polimorfismo amplificado de secuencia relacionada (SRAP)

La implementación de un programa de mejoramiento genético del achiote, requiere del conocimiento del sistema reproductivo de esta especie. La información concerniente a esta etapa fisiológica en *B. orellana* estaba en discusión, debido a la inexistencia de un estudio molecular. Los estudios genético-moleculares desarrollados en este trabajo en *B. orellana*, mediante el uso de SRAP, indicaron una tasa de entrecruzamiento multilocus (t_m) de 0.748. El entrecruzamiento es predominante en la población de polinización abierta de *B. orellana* estudiada, aunque de acuerdo a los datos también existe autopolinización. El entrecruzamiento en *B. orellana* se podría explicar, por la madurez asincrónica de la flor en la misma panícula y entre diferentes panículas, de plantas diferentes. Además, el achiote es una especie protándrica, esto es, las anteras liberan el polen antes de que el estigma de la misma flor sea receptiva (Rivera-Madrid *et al.*, 2006) favoreciendo, por tanto, el entrecruzamiento. Por otra parte, la biología de la reproducción en achiote aunque no ha sido explicada en función a su morfología floral, la morfología que presenta, indicada por la posición de los órganos femenino y masculino (Rivera & Flores, 1988), parece favorecer el autocruzamiento.

Estudios de polinización artificial indican que el número de semillas por fruto fue más alto en las polinizaciones cruzadas de las variantes blancas con la rosada y la púrpura que las cruza entre las variantes blancas (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Esto parece indicar que probablemente el sistema de reproducción, obedece a características fenotípicas entre parientes, denominado apareamiento fenotípicamente positivo. Por otro lado, podríamos asumir depresión por endogamia respecto a las variantes blancas; probablemente relacionados por ascendencia. Respecto a la cruce entre variantes rosadas y púrpuras con las de color blanco, probablemente éstas estén menos relacionadas evolutivamente basados en los síndromes de domesticación, de las variantes de *B. orellana*. Los resultados obtenidos, permiten tomar medidas adecuadas para diseñar programas de mejoramiento adecuados según el sistema de reproducción de la especie. Dentro de las medidas adecuadas, se citan la mezcla de las variantes de flor blanca y flor rosada, previniendo el autocruzamiento de las mismas con la enmasculación de las plantas receptoras de polen. De igual forma podrían aislarse las mismas variantes y debido a que presumiblemente esta especie es polinizada por abejas, se podrían aislar conteniendo una colmena en el sitio aislado para que de esta manera las abejas realicen la polinización cruzada.

3. Mapa genético preliminar de *Bixa orellana* (L) usando polimorfismo amplificado de secuencia relacionada (SRAP).

La generación de un mapa genético de *B. orellana*, facilitaría la ubicación de los genes involucrados en la biosíntesis de bixina y la dehiscencia de la cápsula, facilitando la ejecución de los estudios futuros para el mejoramiento genético del achiote, tales como la distribución y organización de los genes; la introgresión de los mismos a través de la selección asistida por marcadores (MAS), la identificación de loci de características cuantitativas (QTL), etc.

Lo anterior, motivó la generación del primer mapa genético de *B. orellana*. Sin embargo, como sucede con muchas especies, *B. orellana* presenta una fase juvenil larga, y ciclos de floración anuales, lo que imposibilita la generación de líneas puras, a corto plazo.

El empleo de SRAP para la identificación de los parentales empleados para su cruce, así como la estimación de la tasa de entrecruzamiento de *B. orellana*, significaron estudios precedentes para realizar la cruce de individuos con características morfológicas extremas: contenido de bixina y la dehiscencia de la cápsula. Derivando así en una población segregante F_1 , que permitió el estudio de la segregación alélica de los genes de los parentales en la descendencia, debido a que la obtención de una población F_2 , tomaría entre 3 y 5 años.

De esta manera, únicamente con 33 ($P \geq 0.05$) marcadores SRAP detectados, que segregaron mendelianamente 1:1, se formaron 4 grupos de ligamiento de los 7 esperados, a pesar del carácter dominante del marcador SRAP. Por lo que la detección de un mayor número de marcadores permitiría la generación de los 3 grupos de ligamiento que faltan por cubrir enachiote. La generación del mapa genético de *B. orellana* con los 7 grupos de ligamiento esperado nos permitiría posiblemente ubicar a los marcadores en los cromosomas, dado que éstos han sido caracterizados anteriormente. Sin embargo, para la detección de loci de características cuantitativas como lo son en su mayoría los caracteres involucrados en el rendimiento, sería necesario la detección de secuencias repetidas o microsatélites en el genoma deachiote, para facilitar la ubicación de éstos loci, puesto que cercano a éstos se encuentran por lo general secuencias repetidas.

El marcador molecular SRAP ha sido utilizado, por su polimorfismo y amplia exploración del genoma, para la detección de marcadores SRAP y generación de mapas de ligamiento en numerosas especies como algodón (Lin *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2007), *Cucumber sp.* (Wang *et al.*, 2005), *Brassica sp.* (Li & Quiros 2001; Chen *et al.*, 2006;

Chen *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2007; Okazaki *et al.*, 2007; Mengyang *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007), caña de azúcar (Alwala *et al.*, 2007) y trigo (Li *et al.*, 2007), así como en el alineamiento gen a gen entre los genomas de *Arabidopsis* y *Brassica* (Li *et al.*, 2003).

La limitante en la generación inicial de mapas de ligamiento es como se ha mencionado, el largo período de la etapa juvenil, de algunas especies como papaya (Sondur *et al.*, 1996), aguacate (Sharon *et al.*, 1997) y cocoa (Lanaud *et al.*, 1995). La adición de marcadores detectados en el genoma de *B. orellana* conducirá a la generación inicial del primer mapa de ligamiento de esta especie.

LITERATURA CITADA

- Alwala, S.** (2007). *Predicting progeny performance and genome analysis in sugarcane (Saccharum spp)*. Dissertation, University of Louisiana.
- Chen, B. Y., X. M. Wu, G. Y. Lu, G. Z. Gao, K. Xu y X. Z. Li** (2006). *Molecular mapping of the gene(s) controlling petal-loss trait in Brassica napus*. Chinese, 28(6), 707-712.
- Chen, W., Y. Zhang, X. Liu, B. Chen, J. Tu y F. Tingdong** (2007). *Detection of QTL for six yield-related traits in oilseed rape (Brassica napus) using DH and immortalized F2 populations*. Theoretical and Applied Genetic, 115, 849–858.
- Espósito, M. A., E. A. Martin, V. P. Cravero y E. Cointry** (2007). *Characterization of pea accessions by SRAP's markers*. Scientia Horticulturae, 113, 329–335.
- Gao, M., G. Li, B. Yang, D. Qiu, M. Farnham y C. Quiros** (2007). *High-density Brassica oleracea linkage map: identification of useful new linkages*. Theoretical and Applied Genetic, 115, 277–287.
- Lanaud, C., A. M. Risterueei, A. K. J. N'Goran, D. Clement, M. H. Flament, V. Laurent y M. Falque** (1995). A

- genetic linkage map of Theobroma cacao L.* Theoretical and Applied Genetic, 91,987-993.
- Li, G. y C. F. Quiros** (2001). *Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica.* Theoretical and Applied Genetic, 103, 455-461.
- Li, G, M. Gao, B. Yang y C. F. Quiros** (2003) *Gene for gene alignment between the Brassica and Arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping.* Theoretical and Applied Genetic, 107, 168–180.
- Li, S., J. Jia, X. Wei, X. Zhang, L. Li, H. Chen, Y. Fan, H. Sun, X. Zhao, T. Lei, Y. Xu, F. Jiang, H. Wang y L. Li** (2007). *An intervarietal genetic map and QTL analysis for yield traits in wheat.* Molecular Breeding, 20,167–178.
- Lin, Z., D. He, X. Zhang, Y. Nie, X. Guo, C. Feng y J. S. McD** (2005). *Linkage map construction and mapping QTL for cotton fibre quality using SRAP, SSR and RAPD.* Plant Breeding, 124, 180-187.
- Lin, Z, X. Zhang, Y. Nei, D. He y M. Wu** (2003). *Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP.* Chinese Science Bulletin, 48 (19), 2063-2067.
- Mazzani, E., R. C. Marín y V. Segovia** (2000). *Estudio de la variabilidad existente en la colección de onoto (Bixa orellana L.) del CENIAP, FONAIAP. Venezuela.* Revista de la Facultad de Agronomía LUZ, 17, 492–504.
- Medina, A. M., C. Michelangeli, C. Ramis y A. Díaz** (2001a). *Caracterización morfológica de frutos de onoto (Bixa orellana L.). y su correspondencia con patrones de proteínas e isoenzimas.* Acta Científica Venezolana, 52, 14-23.
- Meng-yang, J. M. Sc., L. Jia-na, F. Fu-you, Z. Zheng-sheng, Z. Xue-kun y L. Lie-zhao** (2007). *QTL Analysis of the Oil Content and the Hull Content in Brassica napus L.* Agricultural Sciences in China, 6(4), 414-421.
- Medina, A. M., C. Michelangeli, C. Ramis y A. Díaz** (2001b). *Caracterización morfológica de frutos de onoto (Bixa*

- orellana L.) y su correspondencia con patrones de proteínas e isoenzimas. Acta Científica Venezolana, 52, 14–23.*
- Okazaki, K., K. Sakamoto, R. S. A. Kikuchi, E. Togashi, Y. Kuginuki, S. Matsumoto y M. Hirai (2007).** *Mapping and characterization of FLC homologs and QTL analysis of Xowering time in Brassica oleracea.* Theoretical and Applied Genetic, 114, 595–608.
- Portela de Carvalho J. F. R., I. P. Robinson y A. C. Alfenas (2005).** *Isozymic variability in a Brazilian collection of annatto (Bixa orellana L.).* Pesquisa Agropecuaria Brasi Brasília, 40,653– 660.
- Rivera, D. I. y E. M. Flores (1988).** *Morfología floral del achiote, Bixa orellana L (Bixaceae).* Revista de Biología Tropical, 36, 499-509.
- Rivera-Madrid, R., R. M. Escobedo-GM, E. Balam-Galera, M. Vera-Ku y H. Harries (2006).** *Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (Bixa orellana L.).* Scientia Horticulturae, 109,165–172.
- Roberts, J. A., K. A. Elliott y Z. H. Gonzalez-Carranza (2002).** *Abscission, dehiscence, and other cell separation processes.* Annual Review of Plant Biology, 53, 131–158.
- Ruiz, J. J., S. García-Martínez, B. Picó, M. Gao y C. F. Quiros (2005).** *Genetic variability and relationship of closely related spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers.* Journal of the American Society for Horticultural Science, 130, 88–94.
- Sharon D., P. B. Cregan, S. Mhameed, M. Kusharska, J. Hillel, E. Lahav y U. Lavi (1997).** *An integrated genetic linkage map of avocado,* Theoretical and Applied Genetic, 95, 911- 921.
- Sondur, S. N., R. M. Manshardt y J. I. Stiles (1996).** *A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers,* Theoretical and Applied Genetic, 93, 547-553.

- Sun, Z., Z. Wang, J. Tu, J. Zhang, F. Yu, P. B. E. McVetty y G. Li (2007).** *An ultradense genetic recombination map for Brassica napus, consisting of 13551 SRAP markers*, Theoretical and Applied Genetic, 114, 1305–1317.
- Wang, G., J. Pan, X. Li, H. He, A. Wu y R. Cai (2005).** *Construction of a cucumber genetic linkage map with SRAP markers and location of the genes for lateral branch traits*. Science in Series C, Life Science, 48(3), 213-20.
- Yu, J., S. Yu, C. Lu, W. Wang, S. Fan, M. Song, Z. Lin, X. Zhang y J. Zhang (2007).** *High-density Linkage Map of Cultivated Allotetraploid Cotton Based on SSR, TRAP, SRAP and AFLP Markers*, Journal of Integrative Plant Biology, 49(5), 716–724.

Conclusiones generales

Los resultados obtenidos en este trabajo, son un avance importante hacia la efectividad del mejoramiento genético del achote, debido a que las cruza entre los grupos genética y morfológicamente descritos en este trabajo, tienen el potencial de producir una recombinación de características deseables en la descendencia. Así mismo, la estimación del entrecruzamiento permitirá diseñar los procedimientos de mejora de la progenie segregante de la cruza. La generación del mapa genético de *B. orellana*, nos permitirá seguir la segregación alélicas de los caracteres seleccionados en los parentales.

1. La caracterización morfológica y molecular mediante SRAP, desarrolladas por vez primera, permitieron seleccionar a parentales con características deseables en el contenido de bixina y complementarias, en la indehiscencia de la cápsula y color rosada de la flor.
2. El análisis genético indicó una alta variación genética, en todos los individuos muestreados expandiendo el acervo genético e incrementando la posibilidad de seleccionar parentales élites para el mejoramiento genético.
3. Con los cebadores SRAP utilizados para el análisis genético de *B. orellana*, se estimó la tasa de entrecruzamiento, indicando que el entrecruzamiento es predominante en la población estudiada de polinización abierta de *B. orellana*.
4. Se obtuvo una población F1 de 150 segregante de la cruza de parentales que presentan características contrastantes en función al contenido de bixina e indehiscencia de la cápsula.
5. El marcador molecular SRAP, mostró ser adecuado por el polimorfismo detectado para la generación de un mapa genético preliminar de *B. orellana*, conformado por 4 grupos de

ligamiento de los siete esperados de acuerdo su número haploide.

Perspectivas

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo enfocado a desarrollar algunas bases que permitan el mejoramiento genético de *B. orellana*, es posible plantearse objetivos precisos en tiempo y actividades a través de los cuales pueda continuarse el mejoramiento genético de esta especie.

1. Debido a que la floración y fructificación ocurre una vez al año, se plantea la posibilidad de realizar múltiples cruzas. La selección de los parentales, se realizará de acuerdo a las características morfológicas complementarias de la cápsula, según resultados obtenidos del análisis morfológico y genético llevado a cabo en este trabajo. De esta manera, se llevará a cabo el entrecruzamiento de los parentales potenciales: parentales femeninos con altos contenidos de bixina vs. parentales masculinos con cápsulas indehiscentes, o viceversa. La realización de múltiples cruzas permitirá seguir la segregación alélica de los genes que controlan estas características en las poblaciones F1 resultantes.

2. De igual manera, considerando que *B. orellana* es una planta perenne y que para obtener una línea homocigota o línea pura por autocruzamiento podría tomar muchos años, se ha iniciado la planeación de estrategias que conduzcan a la obtención de líneas doble haploides, para producir líneas homocigas. Esto es a través de la duplicación del número de cromosomas de microesporas o granos de polen de una población F1. Las plantas haploides que contienen solamente una copia de cada cromosoma pueden ser inducidas para duplicar su número de cromosomas, por un tratamiento químico, resultando rápidamente en plantas que tienen dos juegos idénticos de cromosomas, o completamente mejoradas (homocigos), en una sola generación reduciendo tiempo y recursos. De esta manera, podríamos generar dos líneas homocigas adecuadas para su cruzamiento.

3. El estudio de entrecruzamiento desarrollado permitió descubrir aspectos interesantes en el sistema de entrecruzamiento de la especie. Las variantes de flor rosada y púrpura presentan aparentemente apareamiento fenotípicamente positivo, con variantes de flor blanca. Contrario al entrecruzamiento entre variantes blancas. Por lo que estudios evolutivos sobre estas variantes podrían explicar esta preferencia en el sistema de apareamiento. Es posible que las variantes blancas estén más estrechamente relacionados, o por el contrario las variantes de color y blancas sean más divergentes genéticamente.

4. Otros aspectos que merecen su estudio son: la relación entre la morfología floral y el sistema de reproducción; compatibilidad entre las variantes y su morfología floral, la contribución de los agentes (abejas, hormigas, mariposas, viento, etc.) para la dispersión de polen y semillas, así como la estimación del número de padres que contribuyen al entrecruzamiento; permitirían determinar la contribución de los parentales.

5. La generación de un mapa genético en la población segregante F1 generada en este trabajo, facilita la futura cobertura del genoma de *B. orellana*, para tener un mapa genético denso, y mapear los genes de interés. Construido el mapa genético denso de *B. orellana* se puede llevar a cabo la identificación de genes que controlan los caracteres cuantitativos o QTL (Quantitative Trait Locus). El estudio de cosegregación entre marcadores y caracteres cuantitativos, permite la detección de zonas cromosómicas en las que se encuentran uno o más genes que afectan al carácter de interés, así como los efectos de los alelos en dichos QTLs.

6. Establecidas las herramientas para la construcción del mapa genético de *B. orellana* se puede llevar a cabo el mapeo

comparativo entre ésta y *B. arbórea* (especie que no produce bixina o norbixina, pero que es apreciada en la industria maderera y usada en proyectos de reforestación), para conocer el tipo de organización genómica que ha operado durante el proceso de especiación de *Bixa*, determinar la sintenia entre las especies de *Bixa*, e incluso en las variantes de *B. orellana*.

7. Los marcadores moleculares SRAP pueden ser utilizados en el mejoramiento asistido (MAS) para seleccionar a la progenie que posee los genes de interés agronómico y económicamente, reduciendo así tiempo y recursos para la selección del material mejorado.

8. La heredabilidad de los caracteres evaluados en este trabajo aún no se ha realizado. Éste estudio es importante, de llevarse a cabo debido a que a partir de éste estudio, se pueden tomar las medidas de selección para llevar a cabo el mejoramiento genético de *B. orellana*. La mayoría de los caracteres de interés en el mejoramiento son cuantitativos, es decir, intervienen muchos genes y presentan presuntamente alta heredabilidad, por lo que para el mejoramiento de este tipo de caracteres se recurre generalmente a la selección recurrente de los individuos involucrados.

9. La identificación de las regiones repetidas en el genoma de *B. orellana* (mini o microsátélites), a través de la construcción de una biblioteca genómica, permitiría el estudio de regiones polimórficas en el genoma, puesto que 99% del genoma lo constituyen regiones repetidas. La identificación de estas regiones es importante para poder explorar mejor el genoma de *B. orellana* y así condensar el mapa genético e identificar los genes de interés con mayor facilidad.

10. El mapeo físico del genoma de *B. orellana*, basado en distancias moleculares, resultantes de mapas de fragmentos de restricción.

