



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES
MOLECULARES PARA EL MEJORAMIENTO
GENÉTICO DEL ACHIOTE (*BIXA ORELLANA* L.)**

Tesis que presenta

PEDRO JAVIER ESCOBAR TURRIZA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2017

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Pedro Javier Escobar Turriza titulado “**Identificación de marcadores moleculares para el mejoramiento genético del achiote (*Bixa orellana* L.)**” fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Vegetal de Plantas, en la Línea de Investigación de Genética Molecular del Laboratorio No. 27 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la **Dra. Renata Rivera Madrid**, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 7 de marzo de 2017

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____

Nombre: PEDRO JAVIER ESCOBAR TURRIZA

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Análisis del genoma y transcriptoma del achiote (*Bixa orellana* L.)” para su mejoramiento y exploración como alimento funcional, clave: 220259, el que participé bajo la dirección de la Dra. Renata Rivera Madrid.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Renata Rivera Madrid, por su asesoramiento y conocimientos ofrecidos hacia mi persona, permitiéndome formar parte de su grupo de investigación en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. (CICY); además de agradecerle su amistad durante mi estadía de posgrado.

Al CONACYT por la beca otorgada (No. CVU/Becario): 624129/338189 para realizar el posgrado Maestría en Ciencias Biológicas opción Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, y formar parte del proyecto titulado “Análisis del genoma y transcriptoma del achiote (*Bixa orellana* L.) para su mejoramiento y exploración como alimento funcional”.

Al CICY por brindarme los conocimientos científicos que amplian mi formación académica.

A la UBBMP por las instalaciones brindadas para la realización de estudio de posgrado.

Al Dr. Yair Cárdenas Conejo por todos los consejos y asesoramientos, brindados durante su estadía posdoctoral en el grupo de la Dra. Renata Rivera Madrid, siendo un cimienta para desarrollar más a fondo mi formación académica, y, sobre todo, por su valiosa e incondicional amistad.

A la M. C. Margarita Aguilar por el apoyo incondicional brindado durante mi estudio de posgrado, así como también su valioso afecto y amistad.

A la Dra. Luz Elena Garza por su sus consejos ofrecidos y las discusiones entorno a los trabajos y resultados obtenidos en este estudio, permitiéndome mejorar mis conocimientos científicos.

A mi comité tutorial por las observaciones, correcciones y consejos brindados en este posgrado.

A mis compañeros de laboratorio: Ing. Claudiné Gallegos, Lic Bio. Rocío Tamayo, IBQ. Rosa Chi, IBQ. Jhonatan Dzib, Pasante Ricardo Uicab, IQ. Merary Pech, IBQ. Laura Barrera, M. C. Víctor Carballo, M. C. Rodolfo Pech, M. C. Nayeli Romero, M. C. Abraham Trujillo entre

otros, por su valiosos conocimientos y apoyos brindados, haciendo toda mi estancia de posgrado más amena y enriquecedora.

A mi madre Marcela por darme la vida, por su amor sin límites, por su apoyo total en todos los aspectos, siendo una figura ejemplar en mi desarrollo como ser humano.

A mis hermanitos Juanito y Nicté-há, la vida sin ustedes no sería maravillosa y especial.

A toda mi familia, por su existencia y apoyo incondicional brindado en toda mi vida.

A mi esposa M. C. Irán Andira Guzmán por ser mi motivo de superación en los aspectos personales y académicos, por su amor inquebrantable, por decidir acompañarme por el resto de nuestra vida, incentivándome a ser mejor ser humano cada día.

Finalmente, agradecido con el Destino, puesto que me dio uno de los regalos más hermosos y puros que existen en la naturaleza: El inmenso poder de crear VIDA, mi hija Oceáne Danasha.

DEDICATORIAS

*A mis familias Turriza Guán, Escobar Turriza y
Guzmán Méndez*

*A las musas de mi vida: mi abuela Elvia, mi madre
Marcela, mi hermana Nicte-Há, mi esposa Andira
y mi hijaocéane*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1. GENERALIDADES	3
1.1. MODELO DE ESTUDIO	3
1.1.1. <i>BIXA ORELLANA</i> L.....	3
1.1.1.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	4
1.1.1.2. IMPORTANCIA INDUSTRIAL Y SOCIOECONÓMICA DEL ACHIOTE EN MÉXICO.....	5
1.1.2. CAROTENOIDES	7
1.1.2.1 BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN PLANTAS SUPERIORES	7
1.1.3 BIXINA	9
1.1.3.1 BIOSÍNTESIS DE BIXINA EN <i>BIXA ORELLANA</i> L.	10
1.2. FITOMEJORAMIENTO	12
1.2.1. BASES GENÉTICAS-MOLECULARES DEL FITOMEJORAMIENTO	12
1.2.2. VARIABILIDAD GENÉTICA	13
1.2.2.1. CAUSAS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA.....	13
1.2.2.1.1 MUTACIÓN.....	13
1.2.2.1.2. DIVERSIDAD ALÉLICA	14
1.3. HERRAMIENTAS GENÉTICO-MOLECULARES APLICADAS AL MEJORAMIENTO	

GENÉTICO	14
1.3.1. MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES	14
1.3.2. MARCADORES MOLECULARES	14
1.3.3. POLIMORFISMO DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNP)	15
1.3.4. POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA (SSCP)	16
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
CAPÍTULO II	23
AISLAMIENTO GENÓMICO PARCIAL DEL GEN CAROTENOGENÉTICO <i>BoBLYC2</i> EN 3 MORFOTIPOS DE <i>BIXA ORELLANA L.</i>	23
2.1. INTRODUCCIÓN	23
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.2.1. SELECCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO	24
2.2.2. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	24
2.2.3. DISEÑO DE CEBADORES	24
2.2.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	24
2.2.5. ELECTROFORÉISIS	25
2.2.6. PURIFICACIÓN Y CLONACIÓN	25

2.2.7. SECUENCIACIÓN	25
2.2.8. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	27
2.3 RESULTADOS	28
2.4 DISCUSIÓN	31
CAPÍTULO III	33
IDENTIFICACIÓN DE SNPs EN EL GEN CAROTENOGÉNICO <i>BoBLYC2</i> APLICANDO LA TÉCNICA SSCP EN 28 ACCESIONES DE <i>BIXA ORELLANA L.</i>	33
3.1. INTRODUCCIÓN	33
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.2.1. SELECCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO	34
3.2.2. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	34
3.2.3. DISEÑO DE CEBADORES	34
3.2.4. REACCIÓN DE CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	34
3.2.5. ELECTROFORÉISIS	36
3.2.6. ANÁLISIS SSCP	36
3.2.7. PCR-SSCP	36
3.2.8. SECUENCIACIÓN	36
2.2.8. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	37
3.3 RESULTADOS	38
3.3.1. DISEÑO DE CEBADORES PARA EL ANÁLISIS CON LA TÉCNICA SSCP EN 28 ACCESIONES DE <i>BIXA ORELLANA L.</i>	38

3.3.2. PCR CON CEBADORES PARA LA TÉCNICA SSCP EN 28 ACCESIONES DE <i>BIXA ORELLANA</i> L.	40
3.3.3. ANÁLISIS MEDIANTE PCR-SSCP DEL GEN <i>BoBLYC2</i> DE 28 ACCESIONES DE <i>BIXA ORELLANA</i> L.	42
3.3.4 ANÁLISIS BIONFORMÁTICO DE 4 REGIONES POLIMÓRFICAS DEL GEN <i>BoBLYC2</i>	47
3.3.4.1 FRAGMENTO POLIMÓRFICO BCROM 3 DEL GEN <i>BoBLYC2</i>	47
3.3.4.2 FRAGMENTO POLIMÓRFICO BCROM 5 DEL GEN <i>BoBLYC2</i>	48
3.3.4.3 FRAGMENTO POLIMÓRFICO BCROM 7 DEL GEN <i>BoBLYC2</i>	49
3.3.4.4 FRAGMENTO POLIMÓRFICO BCROM 10 DEL GEN <i>BoBLYC2</i>	51
3.3.5. DETECCIÓN DE SNPs SIGNIFICATIVOS EN 4 FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS DEL GEN <i>BoBLYC2</i>	53
3.3.5.1 SNPs SIGNIFICATIVOS EN EL FRAGMENTO POLIMÓRFICO BCROM 3 DEL GEN <i>BoBLYC2</i>	55
3.3.5.2 SNPs SIGNIFICATIVOS EN EL FRAGMENTO POLIMÓRFICO BCROM 5 DEL GEN <i>BoBLYC2</i>	56
3.3.5.3 SNPs SIGNIFICATIVOS EN EL FRAGMENTO POLIMÓRFICO BCROM 7 DEL GEN <i>BoBLYC2</i>	57
3.3.5.4 SNPs SIGNIFICATIVOS EN EL FRAGMENTO POLIMÓRFICO BCROM 10 DEL GEN <i>BoBLYC2</i>	58
2.4 DISCUSIÓN	61
CAPÍTULO V	64
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	64
5.1 CONCLUSIONES	64

5.2 PERSPECTIVAS.....	65
BIBLIOGRAFIA.....	66
ANEXOS	77

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Planta de <i>Bixa orellana</i> L. Temozón Norte, Mérida, Yucatán.	5
Figura 1.2 Producción anual nacional y del Estado de Yucatán de semillas de achiote. Yucatán produce, actualmente, aproximadamente el 50% de la producción nacional de achiote.	6
Figura 1.3 Semillas frescas de un fruto inmaduro de <i>Bixa orellana</i> L. Las semillas frescas contienen muchos carotenoides, pero principalmente al apocaroteno bixina.	10
Figura 1.4 Rutas metabólicas de la carotenogénesis y biosíntesis de bixina en <i>Bixa orellana</i> L. (Cárdenas-Conejo <i>et al.</i> , 2015).	11
Figura 2.1 Agrupación de plantas. Grupos establecidos de acuerdo a sus características fenotípicas.	26
Figura 2.2 Gen <i>BoBLYC2</i> en DNA genómico de 3 morfotipos caracterizados de <i>Bixa orellana</i> L.	28
Figura 2.3 Gen <i>BoBLYC2</i> de 3 morfotipos caracterizados de <i>Bixa orellana</i> L., clonados en el vector pGEM-T Easy.	29
Figura 2.4 Representación gráfica de los fragmentos parciales obtenidos de la secuenciación del gen <i>BoBLYC2</i>	30
Figura 2.5 Cambios puntuales involucrados con el cambio de aminoácidos de la traducción de los fragmentos parciales del gen <i>BoBLYC2</i> obtenidos de <i>Bixa orellana</i> L.	30
Figura 3.1 Representación gráfica del diseño de cebadores a lo largo del gen <i>BoBLYC2</i> (KT359005) para obtener fragmentos parciales para el análisis polimórfico mediante SSCP.	38
Figura 3.2 DNA genómico extraído de muestras de hojas jóvenes obtenidas de 28 accesiones ya caracterizadas de 3 poblaciones de <i>Bixa orellana</i> L.	39

Figura 3.3 PCR con los juegos de cebadores BCROM2 hasta BCROM12 en 28 variantes de <i>Bixa orellana</i> L.	41
Figura 3.4 Perfiles monomórficos en 7 fragmentos parciales del gen <i>BoBLYC2</i> , obtenidos mediante la técnica SSCP de 28 accesiones de <i>Bixa orellana</i> L.	42
Figura 3.5 Perfiles polimórficos en 4 fragmentos parciales del gen <i>BoBLYC2</i> , obtenidos mediante la técnica SSCP de 28 accesiones de <i>Bixa orellana</i> L.	43
Figura 3.6 Perfiles polimórficos descritos en 4 fragmentos parciales del gen <i>BoBLYC2</i> , obtenidos mediante la técnica SSCP de 28 accesiones de <i>Bixa orellana</i> L.	45
Figura 3.7 SNPs presentados en el fragmento polimórfico BCROM 3 del gen <i>BoBLYC2</i> . 48	
Figura 3.8 SNPs presentados en el fragmento polimórfico BCROM 5 del gen <i>BoBLYC2</i> . 50	
Figura 3.9 SNPs detectados en el fragmento polimórfico BCROM 7 del gen <i>BoBLYC2</i> . . 51	
Figura 3.10 SNPs detectados en el framgento polimórfico BCROM 10 del gen <i>BoBLYC2</i>	52
Figura 3.11 Localización de los SNPs significativos en 4 fragmentos polimórficos obtenidos del gen <i>BoBLYC2</i>	54
Figura 3.12 SNPs significativos obtenidos del fragmento polimórfico BCROM 3 del gen <i>BoBLYC2</i>	56
Figura 3.13 SNPs significativos obtenidos del fragmento polimórfico BCROM 5 del gen <i>BoBLYC2</i>	57
Figura 3.14 SNPs significativos obtenidos del fragmento polimórfico BCROM 7 del gen <i>BoBLYC2</i>	58
Figura 3.15 SNPs significativos obtenidos del fragmento polimórfico BCROM 10 del gen <i>BoBLYC2</i>	59
Figura 3.16 Localización de los SNPs significativos en la secuencia de aminácidos de la	

proteína <i>BoBLYC2</i>	60
FiguraS 2.1 Alineamiento contra la secuencia de referencia KT359005 del ORF putativo del gen <i>BoBLYC2</i> de los 3 morfotipos caracterizados de <i>Bixa orellana</i> L.....	78
FiguraS 2.2 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína <i>BoBLYC2</i> de los 3 morfotipos caracterizados de <i>Bixa orellana</i> L.	78
FiguraS 3.1 Localización de los SNPs significativos en 4 fragmentos polimórficos obtenidos del gen <i>BoBLYC2</i>	80

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 3.1 Características de los cebadores diseñados para amplificar los fragmentos parciales de 150-200pb del gen <i>BoBlyc2</i> , para el análisis polimórfico mediante la técnica SSCP.....	39
--	----

RESUMEN

La bixina es un apocarotenoide esencial para las industrias de alimentos, fármacos y cosméticos, entre los más importantes. Es explotada como aditivo natural con una gran viabilidad alimenticia; se deriva de la carotenogénesis y se acumula en el arilo de las semillas de *Bixa orellana* L., dándole un color rojo-anaranjado. Los genes *BoBLYC 1* y *2*, cuya enzima funcional cicla los extremos terminales de la estructura química del pigmento licopeno, están involucrados en la bifurcación de la carotenogénesis y su probable participación en la biosíntesis de bixina. En este estudio, mediante la técnica SSCP se determinaron 4 fragmentos polimórficos en el gen *BoBLYC2* (cromoplastos), lográndose detectar 35 sitios SNP que están asociados a tres morfotipos con características morfológicas contrastantes, establecidas a partir de 28 accesiones de *Bixa orellana* L. Estos resultados aportan marcadores moleculares para ampliar el desarrollo de un programa de mejoramiento genético de *Bixa orellana* L., determinada por la asociación selectiva, en etapas tempranas de desarrollo, de plantas cuyas características fenotípicas se correlacionan con la acumulación de bixina en sus semillas.

ABSTRACT

Bixin is an essential apocarotenoid for the food, pharmaceutical and cosmetic industries, being exploited as a natural additive with a high nutritional value, it is derived from carotenogenesis and accumulates in a dense zone of red-orange papillae surrounding the seeds of *Bixa orellana* L. BoBLYC 1 and 2 genes, whose functional enzymes cycle the terminal ends of the pigment lycopene, are involved in the bifurcation of carotenogenesis and are postulated to participate in the biosynthesis of bixin. In this study, 4 polymorphic fragments were determined in the Bo β Lyc2 gene (chromoplasts), and 35 SNP sites were found to be associated with three morphotypes with congruent morphological characteristics, established from 28 *Bixa orellana* L. accessions. This study provides molecular markers to expand the development of a *Bixa orellana* L. breeding program, determined by selective association, in the early stages of development of plants whose phenotypic characteristics are correlated with the accumulation of bixin in their seeds.

INTRODUCCIÓN

Bixa orellana L. (achiote) es una especie cultivada comercialmente a nivel mundial, ya que posee un pigmento liposoluble conocido como bixina (metil hidrógeno 9'-cis-6, 6' diapocaroteno-6, 6' dioato), responsable del color rojizo-anaranjado que define a sus semillas. La bixina es un colorante natural empleado potencialmente en las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética, gracias a las aprobaciones otorgadas por los organismos orientados a los sectores alimenticios, como la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los E.E.U.U.) y la OMS (Organización Mundial de la Salud), estableciéndose como un aditivo natural con una gran viabilidad alimentaria. A nivel nacional, se reportan tasas de producciones anuales de 500 ton de semillas de achiote, siendo el estado de Yucatán uno de los principales productores de semillas de achiote, con una tasa de producción de 239 toneladas anuales (SINAREFI, 2015). Esta especie leñosa presenta una densa gama de características morfológicas diferentes en sus plantas, que son correlacionados con los contenidos heterogéneos del apocaroteno bixina (Valdéz Ojeda *et al.*, 2008). Al ser un cultivo potencial para la generación de bixina, el grupo de trabajo de la Dra Rivera Madrid está enfocado en el desarrollo y diseño de programas de mejoramiento genético de *Bixa orellana* L. a través de estudios bioquímicos y genético-moleculares. En estudios sobre la regulación genética y transcripcional de la carotenogénesis de esta especie, prevalecen genes que tienen un rol esencial hacia la acumulación de pigmentos carotenogénicos. Uno de los genes claves recién estudiado es el *BoBLYC*, cuya enzima BLYC está involucrado en la ramificación de la carotenogénesis y su posible participación hacia la biosíntesis de bixina (Cárdenas Conejo *et al.*, 2015). Trujillo Hernández y colaboradores (2016), lograron generar marcadores moleculares, a través del estudio sobre el gen *BoBLYC1* (asociado a cloroplastos), que les permitían correlacionarse con las características fenotípicas de 12 variantes de achiote, intentando asociarse con cultivares de achiote que presenten alto contenido de bixina. Incentivado con los estudios recientes, en este trabajo se planteó como objetivo continuar con la búsqueda de las variaciones polimórficas en gen *BoBLYC2* (asociado a cromoplastos) en 28 accesiones de *Bixa orellana* L., el cual nos conferirá un aumento en el número de marcadores moleculares que nos permitan seleccionar, en una población de achiote, a las variantes que presenten un mayor

contenido de bixina en las semillas, contribuyendo de esta manera en los programas de fitomejoramiento de la especie *Bixa orellana* L., ya sea para la selección de materiales élite o a la detección temprana de plantas potenciales en la producción de bixina.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. GENERALIDADES

1.1. MODELO DE ESTUDIO

1.1.1. *Bixa orellana* L.

Bixa orellana L. es una especie tropical diploide ($n=14$) que posee un genoma de 0.39pg (Hanson *et al.*, 2001; Lombello *et al.*, 2014) y, posiblemente, sea nativa de la cuenca amazónica del alto Brasil (Fonnegra *et al.*, 2007), aunque otros autores le dicen oriunda de una zona comprendida entre el centro de México y Panamá (Arce, 1984). El nombre científico otorgado a esta especie proviene del vocablo brasileño *bija* que significa árbol bixáceo y *orellana* en honor al español Francisco de Orellana por ser el descubridor del Amazonas el cual también fue parte de la conquista de Perú (Patiño, 1964; Arce, 1999; Pittier, 1978; Fonnegra *et al.*, 2007). También podemos conocerla con diferentes nombres, tales como “oox” o “k’uxub” [Maya], “achiote” [Náhuatl, Español], “annatto” [Inglés] y “urucu” [Portugués] (Vázquez de Ágredos Pascal *et al.*, 2010; Patiño, 1964; Fonnegra, 2007; Akshatha *et al.*, 2011). En épocas prehispánicas, los mayas y aztecas usaban el extracto de las semillas del achiote como un colorante textil y del cuerpo humano [las mujeres lo usaron como lápiz labial, y los hombres como símbolo de guerra] y como colorante de alimentos [que se añadió, junto a la vainilla, a la bebida a base de cacao, cacahuatl] (Giuliano *et al.*, 2003). Por ello, el achiote era uno de los 3 productos (achiote, cacao y vainilla) que conformaban una verdadera tríada cultural, representada por el consumo de chocolate entre los pueblos de Mesoamérica (Barrera y Aliphath, 2006). Actualmente, *Bixa orellana* L. es una especie cultivada comercialmente en 4 países del Caribe, 4 países de la América Latina, 3 países de África y 4 países de Asia (Leal y Clavijo, 2010a; Leal y Clavijo, 2010b). La razón de su explotación comercial está sujeta a las normas actuales en contra del uso de colorantes de origen sintético, por lo cual el colorante natural proveniente del achiote es utilizado ampliamente en las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética, debido a sus aportaciones favorables para la salud (Trujillo Hernández, 2013; Shuhama *et al.*, 2003).

1.1.1.1. Descripción botánica

Bixa orellana L. es una especie que corresponde a la división de las Angiospermas, de Clase Magnoliopsida, Subclase Ranunculidae [Eudicotiledóneas], del Orden Malvales, pertenece a la Familia Bixaceae y dentro del único Género: *Bixa*. Existen, hasta el momento, 5 especies del Género *Bixa*: *Bixa orellana* L., *Bixa arborea*, *Bixa excelsa*, *Bixa platycarpa* y *Bixa urucurana* (Moreira *et al.*, 2015). Las accesiones de *Bixa orellana* L. son árboles bajos o arbustos que presentan distintas formas de copas [sean piramidales, redondeadas o irregulares], llegando alcanzar una altura entre 2m y 10m de altura (Rivera y Flores, 1988; León, 2000; Blair y Madrigal, 2005). Las hojas suelen ser acorazonadas, agudas o acuminadas, con una textura cartácea, de lámina simétrica o asimétrica y pubescentes, que cuentan con un largo de 2-10cm y con 3 a 5 nervios principales procedentes de la inserción del peciolo (Rivera y Flores, 1988; León, 2000; Blair y Madrigal, 2005); las láminas foliares superiores presentan una tonalidad verdeoscuro brillante, aunque también se presentan en tonos cobrizos (León, 2000). Esta especie presenta inflorescencias de 10-25cm de longitud en sus panículas terminales, con 5-60 primordios florales [de las cuales la mayoría no llegan a la madurez] (Rivera y Flores, 1988; Blair y Madrigal, 2005). Las flores se presentan con una gama de matices: en tonalidades blancas, rosas pálidas, rosas y lilas; una flor posee 5 pétalos cóncavos con estambres [>100 estambres] que se desarrollan de manera centrífuga sobre un pistilo, el cual tiene un ovario unicelular con numerosos óvulos en 2 placentas parietales (León, 2000). Los frutos de *Bixa orellana* L. son cápsulas erectas que se exhiben en múltiples morfologías [formas hemisféricas, ovoides, elipsoides o cónicas] (Trujillo Hernández, 2013; Blair y Madrigal, 2005), y en la gran mayoría de los frutos se aprecia una cubierta de espinas largas y suaves, con excepción de algunas plantas en las que se puede observar una cubierta lisa en los frutos (Blair y Madrigal, 2005). En la etapa de fructificación, las cápsulas se presentan en 3 matices: en tonalidades verdes, roji-verdes y rojos. En la maduración, estas llegan a tornarse de un matiz pardo, de las cuales cada cápsula contiene de 10 a 50 semillas con diversas formas y tamaños (ovoides-angulares) rodeadas por una zona densa de papilas rojo-anaranjadas (apocarotenoide *cis-bixina*) dentro del tegumento membranoso (León, 2000; Blair y Madrigal, 2005; Mercadante *et al.*, 1996; Gómez Ortiz *et al.*, 2010).



Figura 1.1 Planta de *Bixa orellana* L. Temozón Norte, Mérida, Yucatán.

1.1.1.2. Importancia industrial y socioeconómica del achiote en México

El interés y la demanda por los colorantes naturales se ha incrementado en los recientes años, en los cuales las industrias comerciales han agregado aditivos a sus productos para un mayor atractivo visual, justificado por la mínima o ausente toxicidad que estos colorantes presentan (Rodrigues *et al.*, 2014). El extracto del achiote se puede obtener a partir de soluciones hidrófilas o hidrofóbicas, ya que adquiere una diversidad de colores intensos que son generados a partir de las diferentes estructuras químicas de los carotenoides que contienen las semillas de achiote (Rodrigues *et al.*, 2014; Chisté *et al.*, 2011; Preston y Rickard, 1980). Por ello, es un candidato ideal para aportar pigmentos naturales a las industrias cosméticas, farmacéuticas y alimentarias (Rodrigues *et al.*, 2014; WHO, 2006; Kumaran, 2014; Preston y Rickard, 1980). Anualmente, la producción mundial de semillas

de achiote llega a ser aproximadamente de 14,500 toneladas en peso seco (SINAREFI [Servicio Nacional de Servicios Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura], 2015), mientras que el consumo mundial de los extractos de achiote llega a ser en promedio de 10,650 toneladas por año (Satyanarayana *et al.*, 2003; Kumaran, 2014). En México, los principales estados productores de semillas de achiote son Quintana Roo [247.60 ton] seguido por Yucatán [239.90 ton] y Tabasco [27 ton], de acuerdo a lo reportado por el SIAP [Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera] (SIAP, 2015). Para el estado de Yucatán, uno de los principales mercados es la industria alimentaria. Correa Navarro (1999) reporta que las empresas alimenticias La Extra y la Anita, demandan una mayor producción de semillas de achiote para procesar como pasta de condimento para uso común en la cocina peninsular, así como para su exportación a países extranjeros. En 1994 se procesaron 400 toneladas de semilla seca, de los cuales el 30% fue destinado a las empresas regionales de Yucatán y el 70% para exportación nacional e internacional (Correa Navarro, 1999). La producción de achiote ha sido de vital importancia para la generación de nuevos productos alimenticios en México, aunado a las demandas farmacéuticas y cosméticas que se generan a partir de la aplicación de las normas actuales que prohíben la utilización de colorantes sintéticos.

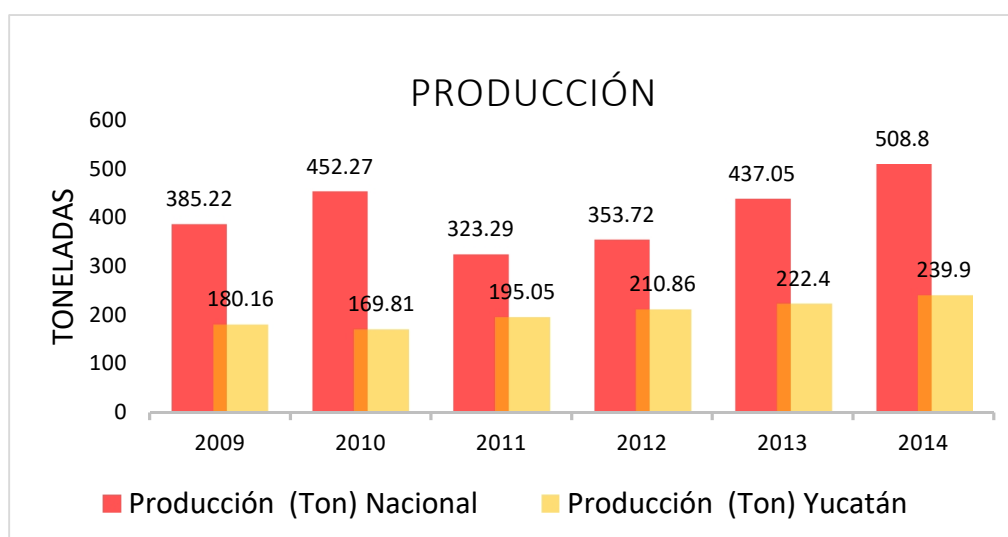


Figura 1.2 Producción anual nacional y del Estado de Yucatán de semillas de achiote. Yucatán produce, actualmente, aproximadamente el 50% de la producción nacional de achiote.

1.1.2. Carotenoides

Los carotenoides son esqueletos de carbonos ramificados por estructuras de isoprenos, y actualmente comprenden más de 700 estructuras (Zechmeister, 2014; Della Penna y Pogson, 2006). Existen, por su naturaleza química, 2 grupos de esqueletos carotenogénicos: los carotenoides hidrocarbonados, denominados carotenos, son aquellos que poseen carbonos e hidrógeno en su estructura química; y los carotenoides oxigenados, denominados xantofilas, aquellos compuestos que posee un oxígeno que forma parte de un grupo funcional: hidroxilo, ceto, epoxi, metoxi o de grupos de ácidos carboxílicos (Goodwin, 2012; de Quirós y Costa, 2006). En las plantas, los carotenoides se pueden observar en una gama de colores intensos como amarillos, naranjas, rojos o violetas (Zechmeister, 2014). Desde el punto de vista celular, los carotenoides son sintetizados en todos los tejidos fotosintéticos y acumulados en los tejidos no fotosintéticos de las plantas superiores (Britton y Young, 1993; Zhu *et al.*, 2010). Los carotenoides se encuentran en niveles elevados en cloroplastos, donde se encuentran asociados a un complejo proteico, LCHII, con la cual actúan como receptores de luz y fotoprotectores de las membranas tilacoidales, evitando el daño a las clorofilas que es producido por radicales libres generados por un exceso de luz (Niyogi, 1999; Cazzonelli, 2011). En tejidos no fotosintéticos, como los cromoplastos, los carotenoides son secuestrados en distintos tipos de estructuras lipoproteicas y cristalinas (Vishnevetsky *et al.*, 1999). También podemos encontrar a los carotenoides en cantidades mucho menores en etioplastos presentes, en plántulas crecidas en la oscuridad (Park *et al.*, 2002) y leucoplastos (plastos de tejidos no fotosintéticos). El rol esencial de los carotenoides en la fotosíntesis, fotomorfogénesis y el desarrollo de las plantas, sugiere que la biosíntesis es coordinadamente regulada con estos procesos, así como por la biogénesis de plastidios, floración y desarrollo de frutos (Fraser y Bramley 2004).

1.1.2.1 Biosíntesis de carotenoides en plantas superiores

En las plantas superiores, los carotenoides son sintetizados en los plastidios, mediante la vía del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato [MEP, siglas en inglés] (Walter y Strack, 2011). La primera etapa de la vía consiste en la formación de la molécula fitoeno, incoloro, llevada a cabo mediante la condensación de 2 moléculas de geranil geranil difosfato [GGDP, siglas en inglés], catalizada por la enzima periférica fitoeno sintasa (Siva *et al.*, 2010). Por

consiguiente, la fitoeno sufre la introducción de 4 dobles enlaces, reacción llevada a cabo por las enzimas fitoeno desaturasa [PDS] y ζ -caroteno desaturasa [ZDS], en la cual cada enzima cataliza en 2 etapas de deshidrogenación simétrica para generar a las moléculas ζ -caroteno y licopeno, respectivamente (Castillo *et al.*, 2005). Se ha reportado que después de la primera desaturación, ocurre una isomerización *cis-trans* catalizada por la enzima ζ -caroteno isomerasa [Z-ISO] en la cual genera la molécula 9,15,9'-tris-*trans*- ζ -caroteno. Este último producto se desatura, mediante la ZDS, a la molécula *cis*-licopeno, que será isomerizada para convertirse en *trans*-licopeno, catalizada mediante la enzima carotenoide isomerasa sintasa [CRTISO] (Siva *et al.*, 2010; Trujillo Hernández, 2013). La ruta continúa cuando a partir del licopeno, que representa el punto de ramificación para la síntesis de los carotenoides, se crean series de carotenoides que sufren ciclaciones en sus extremos (Fig 1.4), que pueden ser anillos β o ϵ . La enzima β -licopeno ciclasa (LYC β) cataliza una reacción en dos pasos que conduce al β -caroteno (dos anillos β en cada extremo), mientras que la ϵ licopeno ciclasa (LYC ϵ) crea un anillo para producir δ -caroteno. Se cree que el α -caroteno se forma por la acción de las dos enzimas ciclasas (Siva *et al.*, 2010; Cunningham *et al.*, 1996). Róo debajo de la ruta, las moléculas del α -caroteno y del β -caroteno sufren una hidroxilación, produciendo a las xantofilas luteína y zeaxantina, respectivamente. La luteína, que representa el punto final de la ramificación del α -caroteno, es generada por la enzima P50 - ϵ -hidroxilasa CYP97C (Zhu *et al.*, 2010). La zeaxantina, generada por la acción de las enzimas no-hemo hidroxilasas CHY1 y CHY2, y es epoxidada por la enzima zeaxantina epoxidasa [ZEP, siglas en inglés] produciendo a la molécula violaxantina, que será convertida a neoxantina por acción de la enzima neoxantina sintasa [NSY, siglas en inglés] (Tian *et al.*, 2004; Galpaz *et al.*, 2006; DellaPenna y Pogson, 2006). Por otro lado, la violaxantina pueden ser catabolizada por la 9-epoxicarotenoide dioxigenasa para la formación de xantoxina, el sustrato directo de la fitohormona ácido abscísico [ABA], cuya molécula está involucrada en numerosos procesos del crecimiento de la planta y en la coordinación a las diferentes respuestas a estrés abiótico en las plantas (Schwartz *et al.*, 2003; De Smet *et al.*, 2003; Nambara y Marion-Poll, 2005; Li *et al.*, 2008; Welsch *et al.*, 2008).

1.1.3 Bixina

Las semillas de la especie *Bixa orellana* L. poseen una gama de carotenoides y compuestos fenólicos que rodea al pericarpio de las mismas (Chisté *et al.*, 2011; Preston y Rickard, 1980). El pigmento cis-bixina [metil hidrógeno 9'-cis-6, 6 'diapocaroteno-6, 6' dioato] representa un 80 % de los carotenoides existentes en el pericarpio (Fig 1.2), por lo cual es el responsable de la tez rojizo-anaranjando que define a las semillas de achiote (Chisté *et al.*, 2011; Preston y Rickard, 1980). La bixina es un apocarotenoide que presenta actividad antioxidante, así como la capacidad de proteger al DNA de sustancias que le provocan daños, además de que a este compuesto no se le han atribuido efectos de tipo genotóxicos o carcinógenos (Trujillo Hernández, 2013; Agner *et al.*, 2004). Actualmente, la bixina está siendo empleada como un producto para consumo humano seguro en América Latina, ya que es reconocida por su nula toxicidad y denominándola como uno de los colorantes permitidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), siendo aceptado como aditivo de color por la Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de los E.E.U.U. (FDA&C). Mundialmente, es el segundo colorante natural de mayor importancia económica, empleado en sustitución de tartrazina, un colorante sintético que se ha prohibido en muchos países (JECFA, 2003).



Figura 1.3 Semillas frescas de un fruto inmaduro de *Bixa orellana* L. Las semillas frescas contienen muchos carotenoides, pero principalmente al apocaroteno bixina.

1.1.3.1 Biosíntesis de bixina en *Bixa orellana* L.

¿Cómo es producida la bixina a partir del licopeno? Jako y colaboradores (2002) han sugerido al licopeno como el principal precursor para llevar a cabo la síntesis de bixina. En 2003, Bouvier y colaboradores demostraron en *E. coli* que la biosíntesis de bixina consistía en la conversión del licopeno a bixina aldehído a través de la enzima bixina dioxigenasa (BoLCD), prosiguiendo con la acción enzimática de una aldehído deshidrogenasa (BoBADH) dando origen a la norbixina y, por último, una tercera reacción enzimática mediada por metiltransferasa (BoBMT) para producir al apocarotenoide bixina. Posteriormente, en 2015, Cárdenas-Conejo y colaboradores analizaron el transcriptoma de *Bixa orellana* L. en donde los transcritos de las tres secuencias que codifican para las enzimas sugeridas por Bouvier y colaboradores (2003), no se encontraron en este a través del análisis bioinformático. No obstante, en el transcriptoma se encontraron nuevos y diferentes transcritos que codifican a las enzimas carotenoides dioxigenasas [BoCCDs], aldehído deshidrogenasas [BoALDHs] y metiltransferasas [BoMTs] que pudiesen estar involucrados para la biosíntesis de bixina. A partir de estos datos, Cárdenas-Conejo y colaboradores (2015) proponen 2 rutas metabólicas para la biosíntesis de bixina. Las rutas difieren en la localización subcelular en la cual se podría llevar a cabo la biosíntesis: la primera ruta está sublocalizada dentro de los plástoglobulos de los plastidios, y la segunda sublocalizada en el citosol de las células (Fig 1.4).

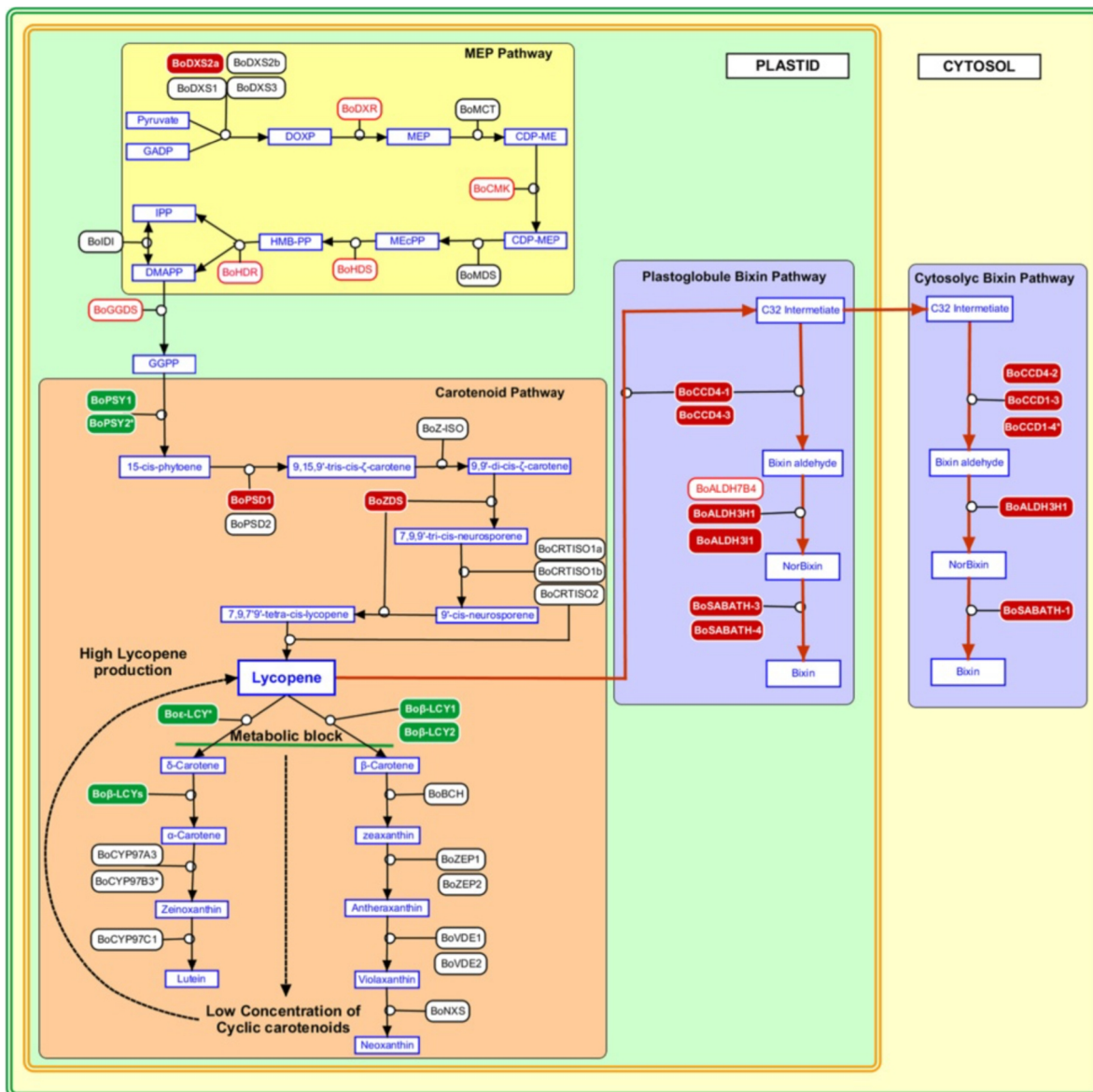


Figura 1.4 Rutas metabólica de la carotenogénesis y biosíntesis de bixina en *Bixa orellana* L. (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015).

1.2. Fitomejoramiento

Desde hace 11,000 años la domesticación y el cultivo de las plantas ha existido, provocando una evolución de los cultivos de cientos de especies en varias partes del mundo (Allard, 1999). El fitomejoramiento comenzó apenas a ser dirigido alrededor de 200 años atrás en los países industrializados (Cleveland *et al.*, 2000). El fitomejoramiento es un área dinámica de la ciencia aplicada, el cual está basado en la variación genética para seleccionar a aquellas plantas con rasgos y características mejoradas que son de interés para el productor y el consumidor (Asíns, 2002). La base fundamental del mejoramiento genético vegetal consiste en la selección de plantas élite y el análisis de la descendencia de las mismas (Trujillo-Hernández, 2013).

1.2.1. Bases genéticas-moleculares del fitomejoramiento

El fitomejoramiento está basado en la evolución darwiniana y en los principios mendelianos, por lo cual crea procedimientos convencionales de mejora genética vegetal, como el estudio de la variabilidad en las variantes de un cultivar mediante la identificación del tipo de reproducción que presenta el cultivo (Allard, 1999). En las plantas existe un tipo de proceso biológico de reproducción sexual llamada polinización, que consiste en la unión de dos gametos que provienen de dos progenitores distintos (alogamia), generando la fecundación de un nuevo organismo con la información genética de los 2 organismos diferentes; aunque también puede ocurrir una fecundación en la cual se lleva a cabo la unión de dos gametos provenientes de un mismo organismo, denominándose a ésta autogamia (Bedolla *et al.*, 2002). La especie *Bixa orellana* L. presenta ambos tipos de polinización (Lombello *et al.*, 2014). La viabilidad del polen explica el éxito de la polinización abierta que produce un fruto por cada dos brotes en el campo, de acuerdo a los resultados obtenidos por Lombello y colaboradores (2014). Sin embargo, la autopolinización en *Bixa orellana* L. se produce en un 31.4% en un sistema de polinización artificial (Rivera Madrid, *et al.*, 2006), además de que el índice de germinación de las semillas provenientes de la autopolinización fue de un 85.7% (Lombello *et al.*, 2014). En 2010, Valdéz-Ojeda y colaboradores reforzaron, mediante la aplicación de la técnica SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism), que el achiote presenta casos de autopolinización.

1.2.2. Variabilidad genética

El DNA es una molécula esencial, ya que contiene toda la información necesaria para definir a un organismo, sea eucarionte o procarionte. En los eucariontes, el DNA se localiza en el núcleo celular, en los orgánulos mitocondriales y los plastidios, en los cuales pueden sufrir cambios o variaciones en todos sus niveles de organización: desde las bases químicas hasta los cromosomas. Esta diversidad es la responsable de fenómenos biológicos que inducen a la evolución de una especie y, dentro de la misma, hace que cada individuo adquiera la presencia de características únicas e irrepetibles (Torrades, 2002). La variabilidad genética, en un sentido más vasto, es un concepto que se hace sinónimo de polimorfismo que, literalmente, significa “muchas formas” (Luque, 2006). Hoy en día, podemos definir polimorfismo como “la existencia simultánea en una población de genomas con distintos alelos para un locus determinado” (Luque, 2006). Los polimorfismos se pueden apreciar en regiones no codificantes, denominándose polimorfismos genéticos, cuyo propósito puede ser una función reguladora o simplemente estructural; mientras que los polimorfismos que se localizan en regiones codificantes (ORF. Marco de Lectura Abierto, siglas en inglés) pueden producir una alteración a las características fenotípicas de un individuo determinando una ventaja adaptativa hacia el camino de la evolución, o, marcar diferencias morfológicas entre individuos de una especie (Torrades, 2002; Luque, 2006).

1.2.2.1. Causas de la variabilidad genética

1.2.2.1.1 Mutación

La existencia de los polimorfismos puede ser causada por la mutación del DNA (Torrades, 2002). La mutación es definida como todos los cambios permanentes de nucleótidos que han ocurrido en las cadenas de DNA de un organismo (Solari, 2007). Algunos de estos cambios pueden ser ocasionados por un error de las polimerasas en los procesos de replicación, o pueden ser inducidos, en donde los cambios ocasionados en la cadena de DNA son inducidos por la presencia de un agente químico o físico, que tienen la capacidad de generar modificaciones en la molécula de DNA (Brown, 2008). Además, sin las mutaciones no existiría la diversidad de formas de vida presentes en el planeta en actualidad. Por ello, la mutación se considera como una fuerza motriz evolutiva que aumenta la diversidad alélica existente en cualquier especie de cultivo (Kumar *et al.*, 2010).

Algunos genetistas, consideran definir la mutación como “la fuente primaria de la variabilidad genética” (Fernández *et al.*, 2002).

1.2.2.1.2. Diversidad alélica

Otro de los factores que influyen a la presencia de polimorfismos, es la existencia de formas alternativas que ostenta un gen en particular, denominados alelos. Estas formas alternativas son causadas por la mutación, ya que esta puede modificar u ocasionar variaciones en alelos ya existentes, generados a partir de cambios y deleciones importantes que pueden tener un tremendo efecto sobre el fenotipo alterando la estructura codificada de proteínas y / o función, o producir mutaciones silenciosas sin presentar efectos en los fenotipos (Kumar *et al.*, 2010). Trabajos sobre la diversidad alélica pueden generar estudios de asociación de todo un genoma (GWAS, siglas en inglés), como en el caso de los cultivos de garbanzo, que detectan numerosos SNPs (polimorfismo en un solo nucleótido, siglas en inglés) para identificar posibles loci del genoma (genes blancos asociados) que regulan específicamente a características agronómicas cuantitativas e importantes para estos cultivos (Kujur *et al.*, 2015). En cebada, *Hordeum vulgare*, se ha estudiado el comportamiento de los cultivos a la tolerancia de temperaturas frías y su contribución al mejoramiento genético a través de la Selección Asistida por Marcadores (MAS, siglas en inglés) (Rizza *et al.*, 2016).

1.3. HERRAMIENTAS GENÉTICO-MOLECULARES APLICADAS AL MEJORAMIENTO GENÉTICO

1.3.1. Marcadores genético-moleculares

1.3.2. Marcadores moleculares

Un marcador es definido como una característica detectable en el fenotipo o genotipo de una especie, que se utiliza para reconocer la presencia o ausencia de un carácter que puede ser mapeado en el genoma. Los marcadores son clasificados como: marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares (Cubero, 2002).

Los marcadores moleculares de DNA proporcionan valiosas herramientas, que son utilizados en diversos estudios que van desde el análisis filogenético a la clonación de

genes. El acoplamiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas en inglés) a las técnicas empleadas en los marcadores moleculares, ha hecho posible la cartografía y el etiquetado de casi cualquier carácter. La selección asistida por marcadores moleculares nos ha permitido la posibilidad de implementar combinaciones favorables de genes para el estudio de enfermedades, así como ensayos comparativos entre especies; dando lugar a mapas que son útiles no solo en la predicción de la organización del genoma y estudios evolutivos, sino también en la aplicación práctica en el fitomejoramiento (Faroq y Azam, 2002).

Una ventaja que poseen los marcadores moleculares, es que estos requieren sólo unos pocos nanogramos de DNA para su análisis, características que los hacen ideales para su uso en estudios de ligamiento, así como en programas de mejoramiento vegetal (Faroq y Azam, 2002).

Existen diferente tipos de marcadores moleculares que se han desarrollado en los últimos años, los cuales se dividen en 3 gamas: la primera gama corresponde a los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP, siglas en inglés) y Amplificación Aleatoria de DNA Polimórfico (RAPD, siglas en inglés); la segunda incluye a las Secuencias Simples Repetidas (SSR) así como a los Fragmentos Amplificados de Longitud Polimórfica (AFLP, siglas en inglés); y en la tercera gama se encuentran los Polimorfismos en un Sólo Nucleótido (SNP, siglas en inglés) (Gupta *et al.*, 2001).

1.3.3. Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)

El polimorfismo en un solo nucleótido que se encuentra asociado a una característica fenotípica en particular de interés agronómico, es utilizado en el mejoramiento genético para la selección asistida por marcadores moleculares. Es un sistema altamente reproducible y eficiente que lo hace comparable con otros sistemas de marcadores como los SSR y los AFLP. Los SNP son dicotómicos, lo que representa una desventaja cuando se habla de una población de naturaleza multialélica, sin embargo, esta desventaja es superada por la extensa cantidad de polimorfismos de un nucleótido encontrados en un genoma, estimándose que cada 100 a 300 pb se encuentra un SNP en el DNA eucarionte, que lo hace ser el marcador más abundante hasta ahora (Gupta *et al.*, 2001). Se han identificado SNPs que poseen una asociación con una característica fenotípica de importancia

comercial en plantas. Entre los métodos utilizados para la detección de SNPs se encuentra la Amplificación de Alelo Específico (ASO, siglas en inglés), Ensayos en Cadena de Ligación (LCR), Análisis de Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla (SSCP), Espectrometría de Masas MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization), Ensayos TaqMan, Pirosecuenciación, y Tecnología de Microarreglos (Liu y Cordes, 2004).

1.3.4. Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP)

En 1989, Orita y colaboradores desarrollaron una técnica molecular muy sensible para la detección de polimorfismos en secuencias de DNA entre 100 y 300 pb con la finalidad de estudiar las mutaciones puntuales en humanos. Con esta técnica molecular, llamada Análisis del Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla (SSCP), Orita demostró que los fragmentos de cadena sencilla de DNA con una única diferencia de una base, pueden ser potencialmente distinguidos en función de la diferencia en la movilidad electroforética en condiciones nativas y, durante la ejecución de la electroforesis, los fragmentos de una sola hebra adoptan una estructura secundaria dependiendo de la secuencia y las condiciones (Highsmith *et al.*, 1999). Para llevar a cabo el análisis se requiere de la amplificación de la región del DNA que se pretende analizar mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas en inglés); el producto de PCR es desnaturalizado para obtener a las cadenas sencillas y que estas durante el análisis adopten las estructuras secundarias, como se mencionó anteriormente, que serán distintas si existe o existen diferencias en su secuencia nucleotídica que se manifiestan durante la actividad electroforética en el gel (Aranceta *et al.*, 2011).

En 2010, en el grupo de investigación de la Dra. Renata Rivera Madrid, se logró establecer la metodología para la identificación de SNPs utilizando la técnica SSCP para la observación de la variación genética. Dichos genes analizados, están involucrados en la ruta de síntesis de los carotenoides como: *PDS* y *β LCY*. El patrón de bandeo generado por individuo presentó una relación con las características fenotípicas como color de flor y fruto, así como la producción de bixina en *Bixa orellana* L. (Martín Rodríguez, 2010). Además, se presentó una alta reproducibilidad de esta técnica, de esta forma se pudieron identificar alelos favorables dentro de una diversidad genética para el desarrollo de herramientas que proveen la información necesaria para facilitar la selección y diseño de plantas con características deseables (Martín Rodríguez, 2010; Flint García *et al.*, 2005; Harjes *et al.*,

2008). En 2013, Trujillo-Hernández continuó el trabajo anterior enfocándose en la variación alélica del gen *BoβLCY1* de *Bixa orellana* L. ya que logró identificar 8 SNPs que pueden ser utilizados como marcadores moleculares para la detección de producción de bixina.

En un trabajo realizado en sandía por Bang *et al.*, (2006) se identificaron tres SNPs en la región codificante del gen *βLCY* de dos variedades de sandía, la variedad de pulpa color amarillo canario y la variedad de pulpa roja, en los cuales se observó una co-segregación perfecta con los dos fenotipos de sandía distinguiéndose 2 alelos del gen *βLCY*. Además, uno de los SNPs encontrados sustituye un aminoácido valina (Val) por una fenilalanina (Phe) en una región conservada; este cambio podría estar afectando la función catalítica del gen *βLCY* y, por ende, la coloración de las pulpas de las sandías. Trujillo-Hernández y colaboradores (2016) encontraron una variación alélica significativa del gen *BoβLCY1* (gen en *Bixa orellana* L.), identificando 8 SNPs, de los cuales 3 se encuentran en un dominio conservado provocando un cambio de aminoácidos en la secuencia primaria de la enzima, que podrían estar afectando la función de la proteína al interferir con la unión a la membrana del cloroplasto. Sin embargo, es necesario continuar trabajando en la exploración de una segunda ciclasa, que, de acuerdo a la literatura, podría estar más relacionada con los tejidos no fotosintéticos.

Así mismo un trabajo también relacionado con carotenoides en maíz realizado por Harjes y colaboradores (2008), mostró que las variaciones polimórficas del gen *εLYC* tuvieron el mayor efecto sobre la ruta de carotenoides dirigida, ya sea a la *β*-caroteno o la síntesis de *β*-criptoxantina. En 9 haplotipos se realizaron análisis polimórficos del gen *εLYC*, que consta de 10 exones que abarcan un tamaño de 3640 pb, seleccionando 4 regiones en donde encontraron un gran cambio puntual en el promotor y una sustitución de aminoácidos en el exón 1, capaces de explicar la mayor parte de la variación alélica. Un tercer cambio puntual en el 3' UTR también tiene un efecto significativo de 3.3 veces y contribuye a la variación no explicada por el polimorfismo del promotor. El cuarto polimorfismo mostró una variación significativa en la posición 2238 pb en el intrón 4. Estos polimorfismos significativos exhiben algunos desequilibrios de ligamiento (LD) y hubo un aumento de tres veces en la proporción de *β*-caroteno y *β*-criptoxantina con respecto a los haplotipos comunes. En consecuencia, los niveles de provitamina A predominante de compuestos beta- *β*-caroteno y *β*-criptoxantina fueron altamente asociados con la enzima epsilon ciclasa (LCYE).

En otras investigaciones, se ha estudiado a las variantes de *Carica papaya* L., cuyos fenotipos se diferencian en el color de la pulpa del fruto roja, en donde sus niveles de acumulación de licopeno son mayores, y variantes de pulpa amarilla, que tienen bajo contenido de licopeno (Yamamoto, 1964; Chandrika *et al.*, 2003). Se han descubierto inserciones y cambios puntuales en la secuencia del gen β LCY2, que codifica a una enzima asociada a los cromoplastos, y los cambios presentes en la secuencia nucleotídica conducen a una modificación, durante su traducción, en la secuencia de aminoácidos de la proteína, provocando que la enzima β -licopeno ciclasa-2 no sea funcional y haya acumulación de licopeno en las variantes de pulpa roja. Las variantes contrastantes de *Carica papaya* L. presentaron un cambio nucleotídico, C en las variantes de pulpa amarilla y A en las variantes de pulpa roja en la posición 607 pb de la secuencia nucleotídica; este cambio nucleotídico C/A induce a un cambio de un solo aminoácido en la secuencia peptídica. En cambio, la inserción del doble nucleótido TT en el gen β LCY2 en la posición 881 pb genera que haya un desplazamiento del marco de lectura provocando que en el proceso de traducción haya una terminación prematura, inactivando al gen y permitiendo que haya una mayor acumulación de licopeno en las variantes de pulpa roja (Devitt *et al.*, 2009).

JUSTIFICACIÓN

El achiote (*Bixa orellana* L.) es una planta cuya característica agronómica principal es la generación y acumulación del pigmento bixina en el arilo de sus semillas, siendo de vital importancia para las industrias farmacéutica, cosmética, textil y alimenticia, y de aquí su interés económico. Esta especie como tal, presenta variabilidad genética, provocando que las variedades de esta planta presenten distintos niveles cualitativos y cuantitativos en sus características fenotípicas como son: el color de la flor, color y dehiscencia de los frutos, y la acumulación de pigmentos carotenogénicos. En trabajos recientes del grupo de investigación de la Dra. Renata Rivera Madrid, se ha mostrado que la técnica SSCP es una herramienta adecuada para la detección de variaciones alélicas en los genes *pds* y *Boβlyc1*, que están involucrados en la síntesis de carotenoides, pues esta técnica permite identificar patrones polimórficos en fragmentos de DNA con tamaños entre 100 y 300 pb mediante la migración electroforética diferencial en geles de acrilamida no desnaturizante (Trujillo Hernández, 2013; Martín Rodríguez, 2010; Orita *et al.*, 1989). Por eso es deseable continuar estudiando las variaciones alélicas de los genes claves que participan en la biosíntesis de carotenoides y bixina permitiendo una búsqueda de marcadores moleculares que permitan seleccionar, en una población de achiote, a las variantes que presenten un mayor contenido de bixina en las semillas, para poder desarrollar programas de mejoramiento genético de la planta *Bixa orellana* L.

HIPÓTESIS

Se sabe que la actividad de la enzima del gen *BoBLYC1* esta asociada a tejidos fotosintéticos. En un trabajo previo se encontraron en este gen SNP's asociados a los fenotipos de color de flor, fruto, y mayor producción de bixina en *Bixa orellana* L. (achiote). Existe también un segundo gen *BoBLYC2* en *Bixa orellana* L., cuya enzima está más asociada con tejidos no fotosintéticos y, por lo tanto, se pensaría que en este gen podría presentar SNPs más contundentemente relacionados a los fenotipos ya mencionados, los cuales podrán ser utilizados como marcadores moleculares para la selección específica de plantas de achiote asociados con el contenido de bixina.

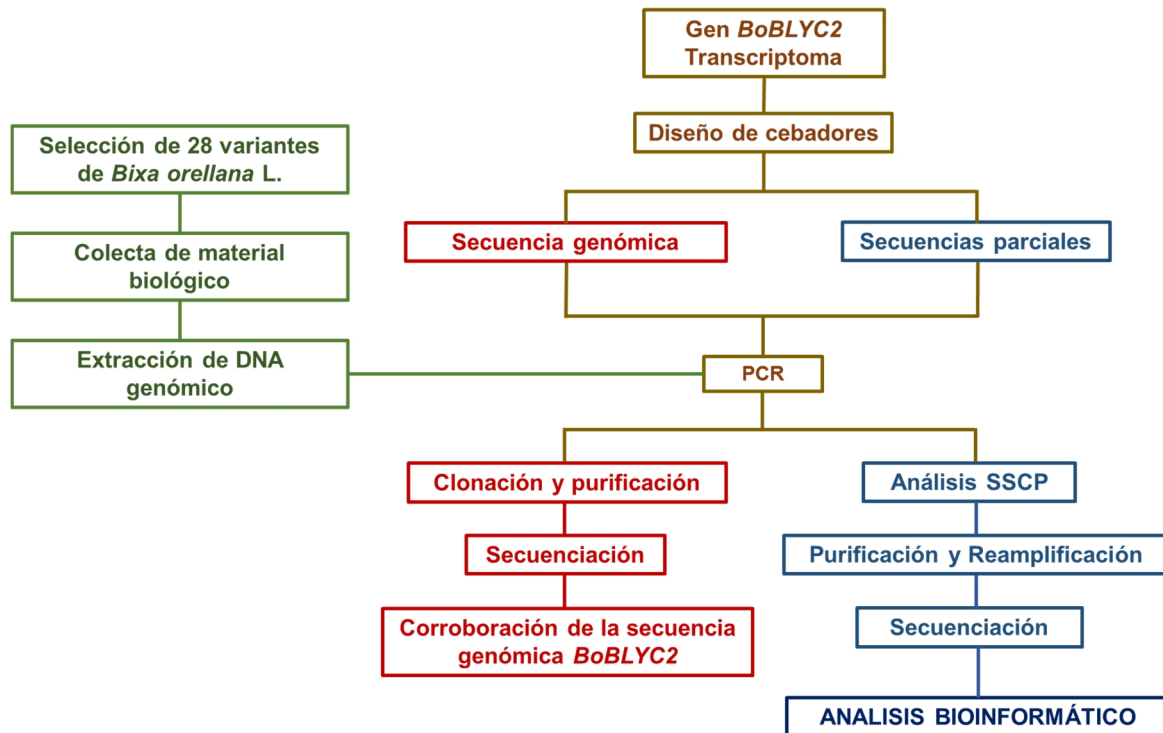
OBJETIVO GENERAL

Identificar marcadores moleculares en el gen carotenogénico β -licopeno ciclasa tipo 2 (*BoBLYC2*), para el mejoramiento genético de achiote (*Bixa orellana* L.).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Corroborar la secuencia del gen *BoBLYC2* aislada *in silico* en *Bixa orellana* L.
- Identificar la presencia de polimorfismos mediante la técnica de SSCP.
- Analizar las secuencias polimórficas de los patrones de bandeo obtenidos mediante secuenciación.
- Identificar la presencia de SNPs en las secuencias nucleotídicas de las diferentes accesiones de *Bixa orellana* L. para el gen *BoBLYC2*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

AISLAMIENTO GENÓMICO PARCIAL DEL GEN CAROTENOGÉNICO *BoBLYC2* EN 3 MORFOTIPOS DE *BIXA ORELLANA* L.

2.1. INTRODUCCIÓN

Previamente a este estudio, en 2015 se publicó el transcriptoma de *Bixa orellana* L. donde se han identificado 2 genes β licopeno ciclasa (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015). Posteriormente, el grupo de la Dra. Rivera Madrid, utilizando la información del transcriptoma, aisló el gen *BoBLYC1* (KU640956) a partir del DNA genómico con un tamaño de 1925 pb, presentando un intrón de 155pb en la región 5'UTR (Trujillo-Hernández *et al.*, 2016). Este capítulo aborda el aislamiento genómico del gen *BoBLYC2* y corroborar de esta forma su secuencia *in silico*, así como también caracterizar sus regiones UTRs, la región codificante (ORF), y la existencia de intrones en el gen de estudio.

Los genes β LYCs participan de manera crucial en la ramificación de la carotenogenesis. Estos genes codifican a la enzima funcional BLYC que cataliza los extremos terminales del compuesto licopeno, transformándolos en anillos beta para formar beta caroteno (Siva *et al.*, 2010). Se han estudiado los genes β LYC2, que son aquéllos que están expresados en tejidos no fotosintéticos, es decir, cuando ocurre una transición de cloroplastos a cromoplastos durante la maduración de los frutos (Bian *et al.*, 2011). Los genes β LYC2 han sido parte de resultados decisivos para el mejoramiento genético de las especies de tomate (Mohan *et al.*, 2016), *Citrus sinense* (Alquézar *et al.*, 2009), *Carica papaya* (Devitt *et al.*, 2009), *Citrullus lanatus* (Bang *et al.*, 2014) y *Crocus sativus* (Arhazem *et al.*, 2009), entre otros.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Selección de material biológico

Previamente, las accesiones de *Bixa orellana* L. se dividieron en 3 grupos, de acuerdo a sus características morfológicas: Morfotipo A, que corresponde a aquellas plantas que tienen frutos indehiscentes de color totalmente verde y flores de color blanco; Morfotipo B, son plantas con frutos semideshicentes de color roji-verde (verde en la base y rojo en las espinas) y flores de color rosa pálido; y Morfotipo C, son plantas con frutos dehiscentes de color totalmente rojo y los colores de las flores que van desde rosa intenso a lila (Fig 2.1).

Para este trabajo, se seleccionaron 2 accesiones por cada morfotipo caracterizado de *Bixa orellana* L. Las asecciones P37 y p24 pertenecen al Morfotipo A (MA); las asecciones N30 y 130 pertenecen al Morfotipo B (MB); y las asecciones N5 y N8p pertenecen al Morfotipo C (MC).

2.2.2. Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico de 6 muestras de tejido foliar joven (edad aprox. 2-5 días) se obtuvo empleando el DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN Cat. No. 6910).

2.2.3. Diseño de cebadores

Para obtener el gen parcial *BoBLYC2*, los cebadores BCROM2F 5'-CGGTGTTTTGCGTATTGC-3' y BCROM12R 5'-CTTGCATGGAACCGATGC-3' se diseñaron basándose en la secuencia del gen *BoBLYC2* (No. de accesoión GenBank.: KT359005) identificado a partir del transcriptoma de *Bixa orellana* L. (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015).

2.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction. PCR, siglas en inglés) se llevó a cabo utilizando los parámetros proporcionados por el kit FastStar con Taq DNA polimerase 5 U/μL Marca Roche No. catálogo 12032945001, cuyo volumen total de la reacción fue 15 μL; los reactivos utilizados fueron: 8.58 μL de agua bidestilada estéril (H₂O_{dd}), 0.6 μM de amortiguador de PCR 10x +MgCl₂, 0.3 μM de solución de PCR GC-

RICH 5x, 200 μ M de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP's), 1 μ M de cada cebador (BCROMF2 y BCROMR12), 0.6 unidades de la enzima FastStar Taq DNA y \sim 10 ng de DNA genómico. El equipo empleado fue MyCycler™ thermal cycler (BIO-RAD Laboratories, donde se utilizó el programa GRADBLYC2: 1 ciclo a 95°C por 4 min (desnaturalización); 35 ciclos a 90°C por 30 s, a 60.4°C por 30 s (hibridación de cebadores), y a 72°C por 1:50 min (elongación); y una extensión final a 72°C por 7 min.

2.2.5. Electroforésis

Para visualizar los fragmentos amplificados del gen *BoBLYC2*, se utilizó un volumen total de 25 mL al 1.5% de agarosa, con el amortiguador Tris-acetato-Etilendiaminoacético (TAE), y teñido con 0.5 μ L de GEL RED. El equipo empleado fue la HORIZON® 58 Horizontal Gel Electrophoresis System Cat. No 41060 LIFE TECHNOLOGIES™, donde se cargaron 3 μ L de producto de PCR con 1 μ L de Buffer 6X, y 4 μ L de Kb DNA Ladder. La electroforesis se llevó a cabo a 70 V/h.

2.2.6. Purificación y clonación

Los productos de PCR obtenidos, se purificaron con el QIAquick® PCR Purification Kit (250) Cat. No. 28106 de QIAGEN. Posteriormente, los productos purificados se clonaron en el pGEM®-T Easy Vector System I Cat.A1360 (Promega) y seguidamente se transformaron en las células One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (20) Cat. No. C404003 (Invitrogen™). Para confirmar la clonación se realizó una reacción de PCR, como se indica en el apartado 2.2.4; para visualizar la confirmación se llevo a cabo la electroforésis como se indica en el apartado 2.2.5.

2.2.7. Secuenciación

Los productos clonados y transformados exitosamente, se purificaron con el QIAquick® PCR Purification Kit (250) Cat. No. 28106 de QIAGEN. Estos productos purificados se enviaron a secuenciar en ambas direcciones, 5'-3' sentido y 5'-3' antisentido, al Clemson University Genomics Institute.

Morfotipo A



Morfotipo B



Morfotipo C



Figura 2.1 Agrupación de plantas. Grupos establecidos de acuerdo a sus características fenotípicas.

2.2.8. Análisis bioinformático

Para el análisis bioinformático se emplearon los programas Chromas Version 2.4.1 Copyright © 1998-2012 Technelysium Pty Ltd., para visualizar la calidad de las secuenciaciones; EditSeq 5.00 Copyright © 1989-2001 DNASTAR, para eliminar secuencias de los vectores; SeqMan 5.00 Copyright © 1989-2001 DNASTAR, para ensamblar las ambas direcciones de las secuencias (sentido y antisentido); ExPASy translate tool (Gasteiger *et al.*, 2003), para la traducción conceptual de los ORFs putativos; y el algoritmo de CLUSTALW (Hall,1999) implementado en el programa Bioedit Sequence Alignment Editor Copyright © 1997-2013 Tom Hall.

2.3 RESULTADOS

El objetivo de este capítulo es corroborar la secuencia genómica del gen *BoBLYC2 in silico*. Para ello, un fragmento de 1490 pb del gen *BoBLYC2* se logró amplificar a partir del DNA genómico de 6 plantas de *Bixa orellana* L. (Fig 2. 2). Posteriormente, estos fragmentos parciales genómicos se clonaron en el plásmido pGEM®-T Easy, corroborándose mediante una PCR con los cebadores correspondientes, BCROMF2 y BCROMR12 (Fig 2.3).

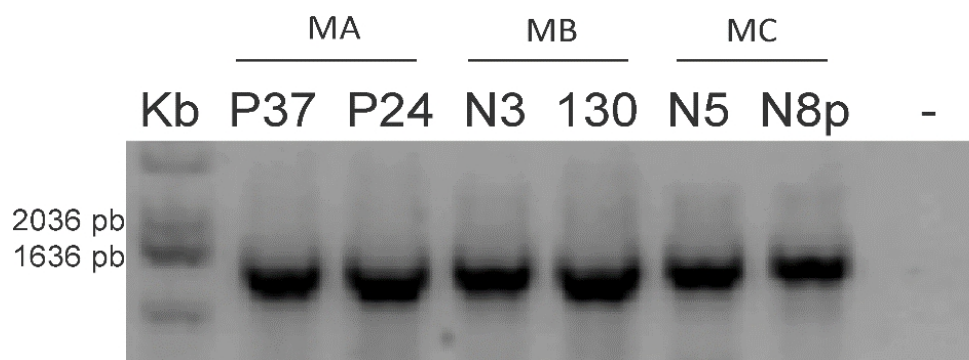


Figura 2.2 Gen *BoBLYC2* en DNA genómico de 3 morfotipos caracterizados de *Bixa orellana* L. Los fragmentos amplificados se obtuvieron mediante la combinación de cebadores BCROMF2-BCROMR12 y se aislaron y purificaron para su posterior ligación en el vector pGEM-T Easy. Gel de agarosa al 1.5% teñido con 0.5µL de GEL RED. MA: Morfotipo A, MB: Morfotipo B; MC: Morfotipo C.

Los fragmentos parciales fueron sometidos a un proceso preparativo para su secuenciación. En el análisis bioinformático, se obtuvieron 3 secuencias que contienen el ORF (marco de lectura abierto, siglas en inglés) del gen *BoBLYC2*: *BLYC2-1* [1497pb], *BLYC2-2* [1497pb] y *BLYC2-3* [1948 pb] (FigS 2.1).

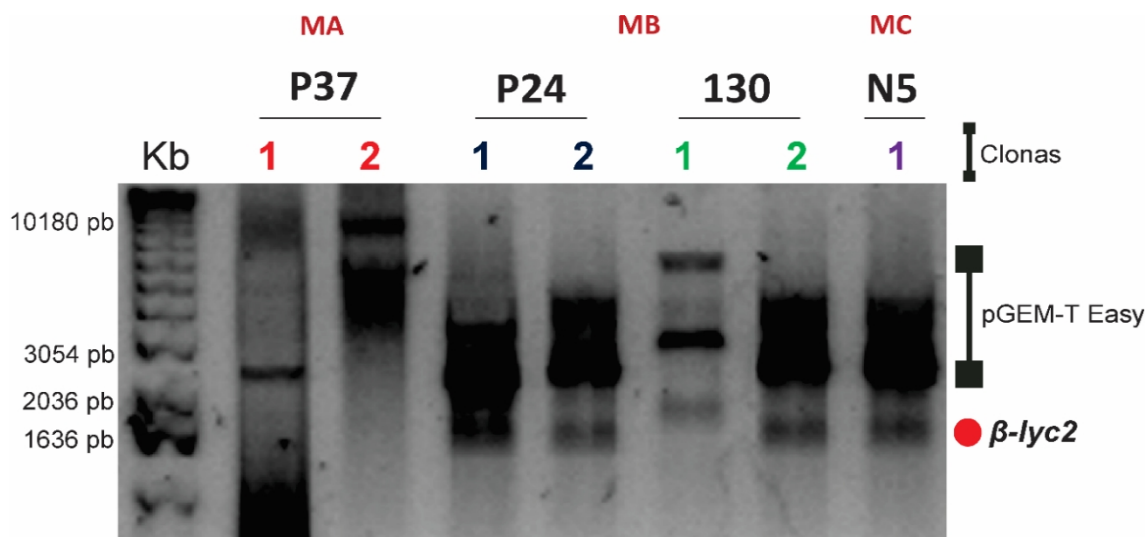


Figura 2.3 Gen *BoBLYC2* de 3 morfotipos caracterizados de *Bixa orellana* L., clonados en el vector pGEM-T Easy. Gel de agarosa al 1.5% teñido con 0.5 μ l de GEL RED; Kb: DNA Ladder. MA: Morfotipo A, MB: Morfotipo B; MC: Morfotipo C.

La secuencia *BLYC2-1* presentó 2 cambios puntuales, 1041A>G y 1048G>A, con respecto a la secuencia KT359005. La secuencia *BLYC2-2* presentó solamente 1 cambio puntual, 1048G>A, idéntica a la secuencia *BLYC2-1*. En la secuencia *BLYC2-3* se presentó una inserción de T en la posición 52 pb; también se observaron 5 cambios puntuales, 142A>G, 784A>G, 863C>T, 1048G>A y 1472G>A. (FigS 2.1). El cambio 1041A>G de la secuencia *BLYC2-1*, provoca cambio de aminoácido 353Q>R, que es la substitución de una Q (Glutamina, polar, sin carga) por una R (Arginina, básico, con carga positiva) (FigS 2.2). La inserción T en la posición 52pb de la secuencia *BLYC2-3*, provoca un desplazamiento del marco de lectura generando un codón de terminación prematuro en la posición 205 pb de la secuencia de nucleótidos (69D>*) (FigS 2.1 y Fig S 2.2).

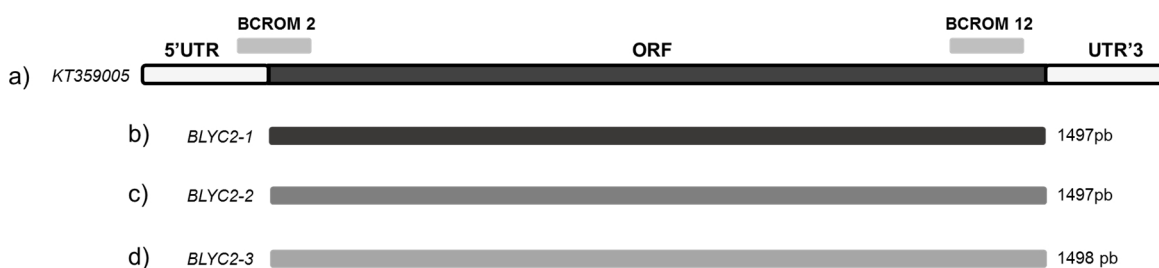


Figura 2.4 Representación gráfica de los fragmentos parciales obtenidos de la secuenciación del gen *BoBLYC2*. a) La secuencia del gen *BoBLYC2* (KT359005), con los cebadores BCROMF2 y BCROMR12, que flanquean la región ORF (Marco de Lectura Abierto). b) Fragmento parcial *BLYC2-1* con un tamaño de 1497pb. c) Fragmento parcial *BLYC2-2* con un tamaño de 1497pb. d) Fragmento parcial *BLYC2-3* con un tamaño de 1498pb.

	50	55	205	210	785	1040	1045	1050	1470

KT359005	'AAA~TTT'		TGATCTG		AGAT	TCAGAATGTGTTG			CTGGG
	K F		D L		D	Q N V L			L G
<i>BLYC2-1</i>	'AAA~TTT'		TGATCTG		AGAT	TCGGAATGTATTG			CTGGG
	K F		D L		D	R N V L			L G
<i>BLYC2-2</i>	'AAA~TTT'		TGATCTG		AGAT	TCAGAATGTATTG			CTGGG
	K F		D L		D	Q N V L			L G
<i>BLYC2-3</i>	'AAA~TTT'		TGATCTG		GGAT	TCAGAATGTATTG			CTGAG
	K F		* S		G	S E C I			A E

Figura 2.5 Cambios puntuales involucrados con el cambio de aminoácidos de la traducción de los fragmentos parciales del gen *BoBLYC2* obtenidos de *Bixa orellana* L. Los cambios que fueron marcados con relleno amarillo, son los cambios puntuales que presentaron los fragmentos parciales; los marcados con relleno azul celeste, son aminoácidos diferentes a la secuencia traducida de la secuencia KT39005; los marcados con relleno verde, son inserciones de nucleótidos que se presentaron; y los marcados con negro, son los codones de terminación que se generaron en la traducción. Alineamiento mediante el algoritmo CLUSTALW implementado en el programa BioEdit.

2.4 DISCUSIÓN

En este CAPITULO II, el objetivo primordial fue corroborar la secuencia *BoBLYC2* (KT359005) obtenida *in silico* usando como templatado DNA genómico de varias accesiones de *Bixa orellana* L.

El licopeno representa un punto de regulación para la síntesis de carotenoides y, probablemente, sea el precursor principal de la biosíntesis de bixina en *Bixa orellana* L. El gen *BoBLYC* es el encargado de codificar a la enzima β -LYC que cataliza al licopeno transformando sus extremos en anillos beta terminales para generar la molécula β -caroteno, llevando la ruta hacia la producción de xantofilas (Siva *et al.*, 2010). En 2015, en un transcriptoma de *Bixa orellana* L. se identificaron 2 copias del gen β licopeno ciclasa, *BoBLYC1* y *BoBLYC2* (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015). Posteriormente en 2016, un estudio filogenético reveló que el gen *BoBLYC1* expresa mRNA que son traducidos a proteínas beta ciclasas que son preferentemente codificadas en tejidos fotosintéticos, mientras que el gen *BoBLYC2* codifica enzimas beta ciclasas específicas para los tejidos no fotosintéticos, los cromoplastos (Trujillo-Hernández *et al.*, 2016). Trujillo-Hernández y colaboradores (2016) corroboraron al gen *Bo β lyc1* con una identidad de 99.2% con respecto a la secuencia KT359004 (*BoBLYC1*) del transcriptoma de *Bixa orellana* L., logrando aislar una secuencia genómica (KU640956) que se utilizó para otros estudios posteriores. Continuando con el estudio de los genes *BoBLYCs*, en esta tesis se planteó el objetivo de aislar el gen *BoBLYC2*. A partir de la secuencia KT359005 (*BoBLYC2*) de 1,726 bp, logramos obtener 3 fragmentos genómicos parciales cuyas secuencias corresponden al ORF del gen (1497pb) identificado transcriptómicamente: *BLYC2-1* (1497pb), *BLYC2-2* (1497pb) y *BLYC2-3* (1948pb). Con estos resultados, observamos que las secuencias genómicas obtenidas presentan una ausencia de intrones dentro de la región del ORF, similar al ORF de la secuencia genómica del *BoBLYC1* (Trujillo-Hernández *et al.*, 2016). Para algunos genes, los intrones claramente separan dominios funcionales o estructurales de las proteínas codificadas por los exones (Brinster *et al.*, 1988). No obstante, no se conoce si en las regiones UTRs de este gen de estudio exista la presencia de intrones, que quizás, podrían regular la producción de licopeno. Como en el caso de los cultivares de arroz, se observó que un empalme aberrante de un intrón en la región 5'UTR del gen *waxy* (almidón sintasa unido a gránulos de almidón) puede ocasionar un bajo nivel de producción de la enzima

funcional y, por ende, bajos niveles de contenido de amilosa (Cai *et al.*, 1998). Los intrones situados en las regiones UTRs de los genes requieren la acción de los Complejos de unión de Exon (EJCs); estos mismos facilitan la interacción de los mRNA con los ribosomas, resultando en una traducción adecuada (Chung *et al.*, 2006; Nott *et al.*, 2004; Wiegand *et al.*, 2003). Chung y colaboradores, en 2006, demostraron que no sólo la presencia de un intrón en el 5'UTR puede mejorar significativamente la expresión génica en al menos un gen, sino también la longitud de un intrón puede influir en el nivel de expresión génica. Por eso es necesario continuar con el aislamiento genómico del gen *BoBLYC2*, para identificar si existen o no, intrones en las regiones UTRs de este gen de estudio que podrían influir en el nivel de traducción de la enzima funcional, así como los niveles de contenido de licopeno.

Por otra parte, las secuencias de los fragmentos parciales fueron analizadas, encontrando cambios puntuales que podrían estar afectando al proceso de traducción para obtener una proteína funcional. El fragmento genómico *BLYC2-3* (1948 pb) presentó una inserción del nucleótido T en la posición 52 pb, que, en la traducción a aminoácidos, provoca un desplazamiento del marco de lectura en la cual se finaliza el proceso de traducción, ya que genera un codón de terminación prematuro en la posición 205 pb de la secuencia de nucleótidos (69 de la secuencia de amino ácidos). Un suceso similar ocurre en el gen *CpBLYC2* de las variantes de pulpa roja de la papaya, en donde una inserción de TT en la posición 881 pb provoca un desplazamiento en el marco de lectura, induciendo a una terminación prematura de la traducción, que, quizás, genere una enzima no funcional que permita la acumulación de licopeno en las variantes de pulpa roja (Devitt *et al.*, 2009). Esta inserción en el fragmento genómico *BLYC2-3* podría estar asociado a un grupo morfológicos de *Bixa orellana* L., pudiéndose emplear como un marcador molecular para la identificación de accesiones con características morfológicas idénticas.

CAPÍTULO III**IDENTIFICACIÓN DE SNPs EN EL GEN CAROTENOGÉNICO *BoBLYC2*
APLICANDO LA TÉCNICA SSCP EN 28 ACCESIONES DE *BIXA ORELLANA L.*****3.1. INTRODUCCIÓN**

El objetivo de este capítulo, es la detección de SNPs en el gen *BoBLYC2*, aplicando la metodología SSCP desarrollada por Orita y colaboradores (1989). Esta técnica ha sido empleada para detectar variaciones alélicas en genes que pertenecen a la carotenogénesis de las plantas, como el gen *PSY* en *Brassica napus* L. (Cardenas *et al.*, 2012), y en los genes *PDS* y *BoBLYC1* de nuestro modelo de estudio, *Bixa orellana* L. (Trujillo Hernández, 2013; Trujillo-Hernández *et al.*, 2016). También se ha aplicado la técnica SSCP para el estudio de la mutagénesis en mutantes de tomate tolerantes a sal, en donde se identificaron 57 loci polimórficos, mostrando que la variabilidad genética se ha producido a nivel de DNA en 26 materiales tolerantes a sal, que fueron inducidos por el etilmetano sulfonato (EMS) (Bin *et al.*, 2016). Otro caso, es el del control de las enfermedades en los cultivos de uvas, cuya aplicación de la técnica SSCP está enfocado en la determinación secuencias dominantes de virus de la uva A (VGA, siglas en inglés) que infectan a las plantas herbáceas y viñedos (Goszczyński y Jooste, 2015).

Por ello, en este trabajo se continuó con los estudios en el gen *BoBLYC2*, que esta asociado a la carotenogénesis en los cromoplastos, para ampliar la generación de marcadores moleculares que permitan asociarse a los fenotipos de *Bixa orellana* L. que acumulan mayor contenido de bixina.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Selección de material biológico

Se seleccionaron 28 accesiones, de las cuales 10 variantes son provenientes de los terrenos del Centro Regional Universitario de la Península de Yucatán (CRUPY), en la subcomisaría Temozón Norte, Mérida, Yucatán; 15 variantes provienen de Chicxulub Pueblo, Yucatán; y 2 variantes seleccionadas de los invernaderos del CICY.

Estas plantas se caracterizaron en 3 grupos: Morfotipo A, Morfotipo B y Morfotipo C (Ver CAPÍTULO II).

3.2.2. Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico de 28 muestras de tejido foliar joven (edad aprox. 2-5 días) se obtuvo empleando el DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN Cat. No. 6910).

3.2.3. Diseño de cebadores

12 juego de cebadores (Tabla 3.1) se diseñaron basándose en la secuencia *BoBLYC2* (No. de accesión GenBank.: KT359005) del transcriptoma de *Bixa orellana* L. (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015).

3.2.4. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction. PCR, siglas en inglés) se llevó a cabo utilizando los parámetros proporcionados por el kit FastStar con Taq DNA polimerase 5 U/ μ L Marca Roche No. catálogo 12032945001, cuyo volumen total de la reacción fue 15 μ L; los reactivos utilizados fueron: 8.58 μ L de agua bidestilada estéril (H_2O_{dd}), 0.6 μ M de amortiguador de PCR 10x +MgCl₂, 0.3 μ M de solución de PCR GC-RICH 5x, 200 μ M de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP's), 1 μ M de cada cebador (BCROMF2 y BCROMR12), 0.6 unidades de la enzima FastStar Taq DNA y ~10 ng de DNA genómico. El equipo empleado fue MyCycler™ thermal cycler (BIO-RAD Laboratories, donde se utilizó el programa GRADBLYC2: 1 ciclo a 95°C por 4 min (desnaturalización); 35 ciclos a 90°C por 30 s, a n°C (Ver °Tm de cada juego de cebador, Tabla 1.3) por 30 s (hibridación de cebadores), y a 72°C por 1:50 min (elongación); y una extensión final a 72°C por 7 min.

Tabla 3.1 Características de los cebadores diseñados para amplificar los fragmentos parciales de 150-200pb del gen *BoBLYC2*, para el análisis polimórfico mediante la técnica SSCP. La letra “F” corresponde a la secuencia sentido (Forward, en inglés); la letra “R” corresponde a la secuencia antisentido (Reverse, en inglés).

Nombre	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Tm°	Longitud pb
BCROM 2	BCROM2F	CGGTGTTTTGCGTATTGC	55.6	195
	BCROM2R	GATGAGTCTTCCTTGAGGTC	54.89	
BCROM 3	BCROM3F	CACTCCATTTACTTCTGC	50.34	191
	BCROM3R	GTGCCGATGACGATCACATC	59.19	
BCROM 4	BCROM4F	TGATCCATCCCATGAGCG	56.47	167
	BCROM4R	ACTCATCTACCCAGACAC	52.41	
BCROM 5	BCROM5F	ACCACTTTCCATGTGGTC	54.36	202
	BCROM5R	GTTGACGTGCAGGACTC	58.16	
BCROM 6	BCROM6F	GTACTGTCGTGTCAGTAG	51.5	184
	BCROM6R	AATCCACTCGCATCGACG	57.6	
BCROM 7	BCROM7F	CCATAATCGAGTGTGACG	52.69	206
	BCROM7R	GCCAAATGGGAATCTCTC	52.68	
BCROM 8	BCROM8F	CGATTTGGACAAGATGGT	52.21	183
	BCROM8R	TTCACCTCCATGTACGGC	56.65	
BCROM 9	BCROM9F	GAAACTTCTCTGGTCGGTCG	58.3	183
	BCROM9R	AGAATTCCCTCCCATCGC	56.36	
BCROM 10	BCROM10F	CTCCCTCAGAATGTGTTG	52.24	179
	BCROM10R	AGTCCGTTCCAAACTCTCCG	59.68	
BCROM 11	BCROM11F	GAGTGTTTGGGTTTCGACG	56.08	191
	BCROM11R	CATTGATAAGGATCCAGC	49.75	
BCROM 12	BCROM12F	GCTGAATCTCGATTTGGC	53.96	157
	BCROM12R	CTTGCATGGAACCGATGC	56.86	

3.2.5. Electroforésis

Para visualizar los fragmentos amplificados del gen *BoBLYC2*, se utilizó un volumen total de 25 mL al 1.5% de agarosa, con el amortiguador Tris-acetato-Etilendiaminoacético (TAE), y teñido con 0.5 μ L de GEL RED. El equipo empleado fue la HORIZON® 58 Horizontal Gel Electrophoresis System Cat. No 41060 LIFE TECHNOLOGIES™, donde se cargaron 3 μ L de producto de PCR con 1 μ L de Buffer 6X, y 4 μ L de Kb DNA Ladder. La electroforesis se llevó a cabo a 70 V/h.

3.2.6. Análisis SSCP

La técnica SSCP se realizó en electroforesis de DNA en geles de acrilamida no desnaturalizante (tamaño aprox. 31 cm de ancho por 38.5cm de largo con 4mm de grosor), mediante el equipo GIBCO BRL Sequencing System Model S2 de LIFE TECHNOLOGIES™. La composición del gel consiste en acrilamida al 10% (49:1) a un volumen de 65 ml utilizando el DCode™ Electrophoresis Reagents Kit Cat. 170-9177 (BIO-RAD Laboratories, Inc). Los geles se tiñeron mediante la técnica de tinción de plata de acuerdo al protocolo establecido por Bassam y colaboradores (1991) en donde se observaron bandas monomórficas y polimórficas. Para registrarlos como imagen, los geles teñidos se capturaron mediante el escáner ScanJet 6300C (Hewlett-Packard).

3.2.7. PCR-SSCP

Por cada producto de PCR se utilizó un volumen de 3 μ L con 3 μ L de 2X SSCP gel loading dye (BIO-RAD) y se desnaturalizaron en un termociclador a 94°C por 5 min; rápidamente se incubaron en hielo por 5 min. Las condiciones de electroforesis fueron 200 V, 15 mA y 5W por 20 horas a 23 °C, usando TBE 1X como buffer de corrida.

3.2.8. Secuenciación

Las bandas polimórficas obtenidas del SSCP, se aislaron mediante el método de extracción Crush and Soak (Maxam y Gilbert, 1980) y se purificaron con el QIAquick® PCR Purification Kit (250) Cat. No. 28106 de QIAGEN. Las bandas purificadas obtenidas se re-amplificaron (apartado 3.2.4) y posteriormente se enviaron a secuenciar 1 muestra de 2 variantes por cada Morfotipo (MA, MB y MC), en la dirección 5'-3' sentido, al Clemson University Genomics Institute.

2.2.8. Análisis bioinformático

Para el análisis bioinformático se emplearon los programas Chromas Version 2.4.1 Copyright © 1998-2012 Technelysium Pty Ltd., para visualizar la calidad de las secuencias obtenidas; EditSeq 5.00 Copyright © 1989-2001 DNASTAR, para eliminar errores de la secuenciación; ExPASy translate tool (Gasteiger *et al.*, 2003), para la traducción conceptual de los ORFs putativos; y el algoritmo de CLUSTALW (Hall,1999) implementado en el programa Bioedit Sequence Aligment Editor Copyright © 1997-2013 Tom Hall, para la búsqueda de cambios, inserciones o deleciones de nucleótidos.

3.3 RESULTADOS

En este capítulo, el DNA genómico de 28 accesiones de *Bixa orellana* L. fue sometido a un análisis de detecciones polimórficas mediante la técnica SSCP, con la finalidad de localizar SNPs que pudiesen ser empleados como indicadores asociados a las características morfológicas para el mejoramiento genético del achiote.

3.3.1. Diseño de cebadores para el análisis con la técnica SSCP en 28 accesiones de *Bixa orellana* L.

Inicialmente, se seleccionó una gran variedad de plantas cuyas características fenotípicas fueran contrastantes, y a su vez, fueran establecidas dentro de las agrupaciones mencionadas en el CAPITULO II. Conjuntamente a la selección de las accesiones, la secuencia KT359005 del transcriptoma de *Bixa orellana* L. se estableció como template para el diseño de 11 juegos de cebadores que flanquearon regiones de entre 150 y 200 pb de longitud sobre la misma (Fig 3.1, Tabla 3.1), evitando la probabilidad de obtener falsos positivos ya que, entre mayor sea el tamaño de la cadena nucleotídica, mayores serán las interacciones azarosas independientemente de la información que el fragmento de DNA presente (Hayasi, 1991).

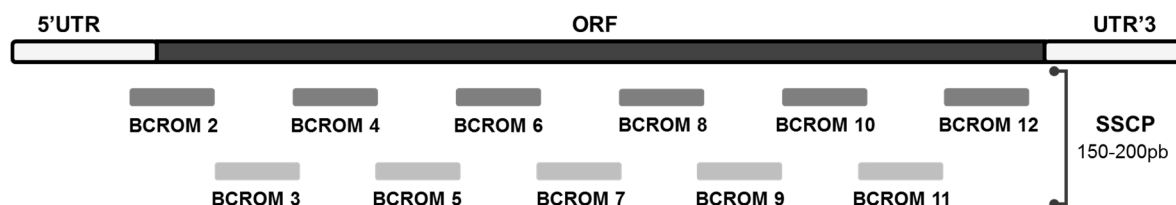


Figura 3.1 Representación gráfica del diseño de cebadores a lo largo del gen *BoBLYC2* (KT359005) para obtener fragmentos parciales para el análisis polimórfico mediante SSCP. 11 juegos de cebadores fueron empleados, designado como BCROM2, BCROM3, BCROM4, BCROM 5, BCROM6, BCROM 7, BCROM 8, BCROM 9, BCROM 10, BCROM 11 y BCROM 12, diseñados para amplificar fragmentos que constan de 150-200pb (rectángulos grises y grises pálidos) del gen *BoBLYC2*, que codifica a una enzima beta licopeno ciclasa perteneciente a la ruta de biosíntesis de carotenoides, de la especie *Bixa orellana* L.

Por consiguiente, las muestras de DNA genómico fueron aisladas de 28 muestras de tejido foliar joven, cuya integridad se verificó mediante una electroforesis, del cual no se observaron indicios de degradación, pero con la posibilidad de presentar concentraciones de metabolitos secundarios que podrían interferir en las reacciones de PCR (Fig 3.2).

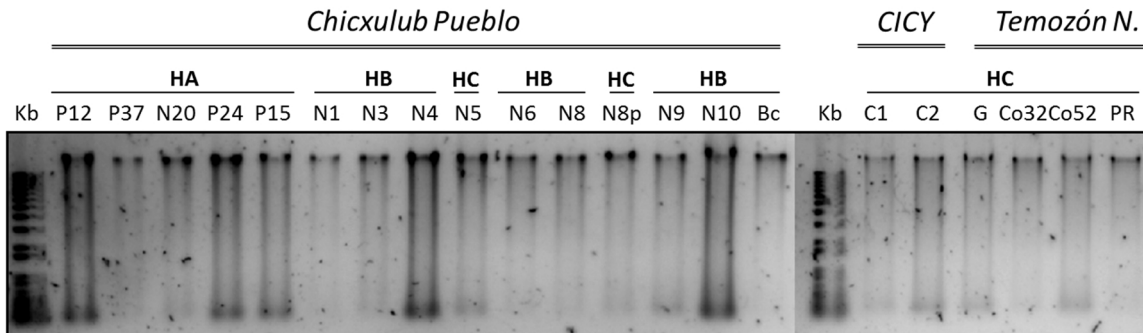


Figura 3.2 DNA genómico extraído de muestras de hojas jóvenes obtenidas de 28 accesiones ya caracterizadas de 3 poblaciones de *Bixa orellana* L. Gel de agarosa al 1% teñido con 0.5 μ L de BrEt; Kb: Plus DNA Ladder. HA: Haplotipo A; HB: Haplotipo B; HC: Haplotipo C.

3.3.2. PCR con cebadores para la técnica SSCP en 28 accesiones de *Bixa orellana* L.

Al utilizar como plantillas a estas muestras de DNA genómico para llevar a cabo la PCR con los cebadores proporcionados (Fig 3.1, Tabla 3.1), se observó que en la mayoría de las reacciones se obtuvieron las amplificaciones correspondientes a los tamaños esperados (Fig 3.3). Prosiguiendo con los resultados, para el juego de cebadores BCROM 2 se observó que 19 reacciones de PCR, de 25 reacciones, lograron amplificar fragmentos de ~195 pb; mientras que las 6 reacciones restantes, una accesión del MA [P15] y 5 accesiones del MC [N5, N8p, G, C1 y C2], no presentaron amplificación alguna (Fig 3. 3a BCROM 2). Para el juego de cebadores BCROM 3, 23 reacciones de PCR produjeron un fragmento de ~191 pb; 2 accesiones, P24 del MA y N8 del MB, no mostraron indicios de amplificación (Fig 3.3a BCROM 3). Los juegos de cebadores BCROM 4, BCROM 7, BCROM 9 y BCROM 11, presentaron los 25 productos de PCR, aunque algunos tenues [BCROM 4], con los tamaños esperados ~167 pb, ~206 pb, ~183 pb y ~191 pb, respectivamente (Fig 3.3a). Para el juego de cebadores BCROM 5, 23 reacciones de PCR produjeron un fragmento de ~191 pb, en donde 9 reacciones dieron una amplificación tenue con respecto a las demás; 2 accesiones, P24 del MA y N5 del MC, no mostraron indicios de amplificación (Fig 3.3a BCROM 5). En la Fig 3.3b observamos que para el juego de cebadores BCROM 6, sólo 3 accesiones, P12 y P24 del MA y N5 del MC, no presentaron amplificación alguna; en el caso del juego de cebador BCROM 8, sólo una reacción de PCR, accesión 17 del grupo F1, no logró su cometido; para el juego de cebadores BCROM10 se lograron obtener 21 amplificaciones con el tamaño esperado, considerando de que 4 reacciones, 4 accesiones del MA, mostraron un resultado tenue; en el juego de cebadores BCROM 12, 20 reacciones de PCR lograron su cometido, el obtener una amplificación de ~157 pb y, 5 reacciones, una accesión del MA [P24] y 4 accesiones del MC [N5, G, C1 y C2] no presentaron alguna amplificación.

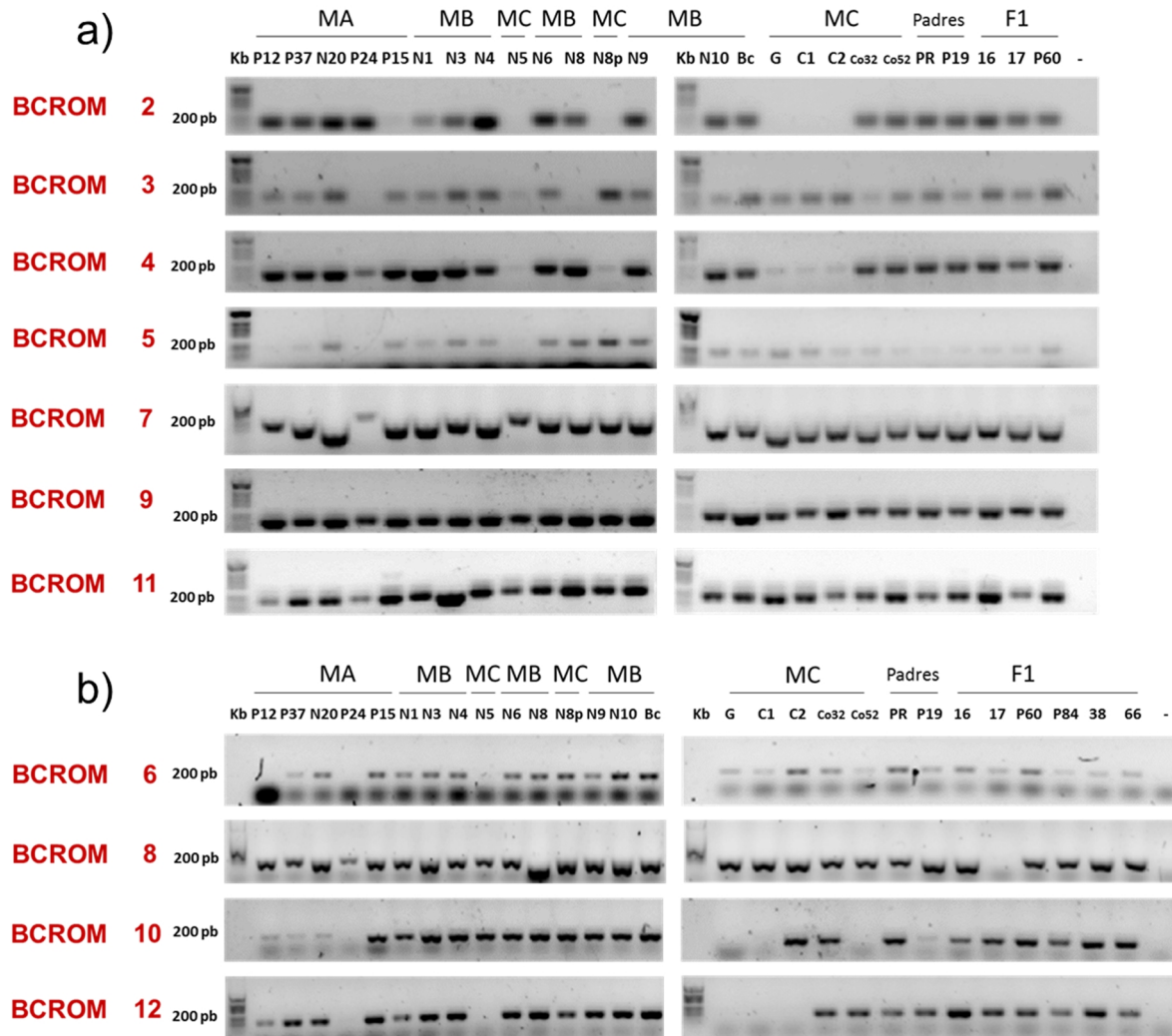


Figura 3.3 PCR con los juegos de cebadores BCROM2 hasta BCROM12 en 28 variantes de *Bixa orellana* L. a) Productos de PCR obtenidos de los fragmentos parciales del gen *BoBLYC2* en 25 accesiones de *Bixa orellana* L., empleando los cebadores BCROM 2, 3, 5, 7, 9 y 11. b) Productos de PCR obtenidos de los fragmentos parciales del gen *BoBLYC2* en 28 accesiones de *Bixa orellana* L., empleando los cebadores BCROM 6, 8, 10 y 12. MA: Morfotipo A, MB: Morfotipo B; MC: Morfotipo C; Padres: variantes de achiotos cruzadas (polinización artificial) para la generación de una población F1; Hijas F1: Primera descendencia de la cruce Padres. Gel de agarosa al 1.2% teñido con 0.5µL de GEL RED; Kb: Plus DNA Ladder.

3.3.3. Análisis mediante PCR-SSCP del gen *BoBLYC2* de 28 accesiones de *Bixa orellana* L.

Todos los fragmentos parciales del gen *BoBLYC2* obtenidos a través de una PCR convencional, fueron sometidos a experimentos realizados con la técnica SSCP. Los resultados exhibieron 2 tipos de perfiles: los perfiles monomórficos y los perfiles polimórficos.

Los perfiles monomórficos son aquéllos fragmentos cuyo número de bandas y migración electroforética son idénticos en todas las muestras examinadas. Los perfiles polimórficos son fragmentos de una secuencia cuyo número de bandas son disímiles, o bien, pueden presentar número de bandas idénticas pero una migración electroforética diferencial entre las bandas de las muestras examinadas.

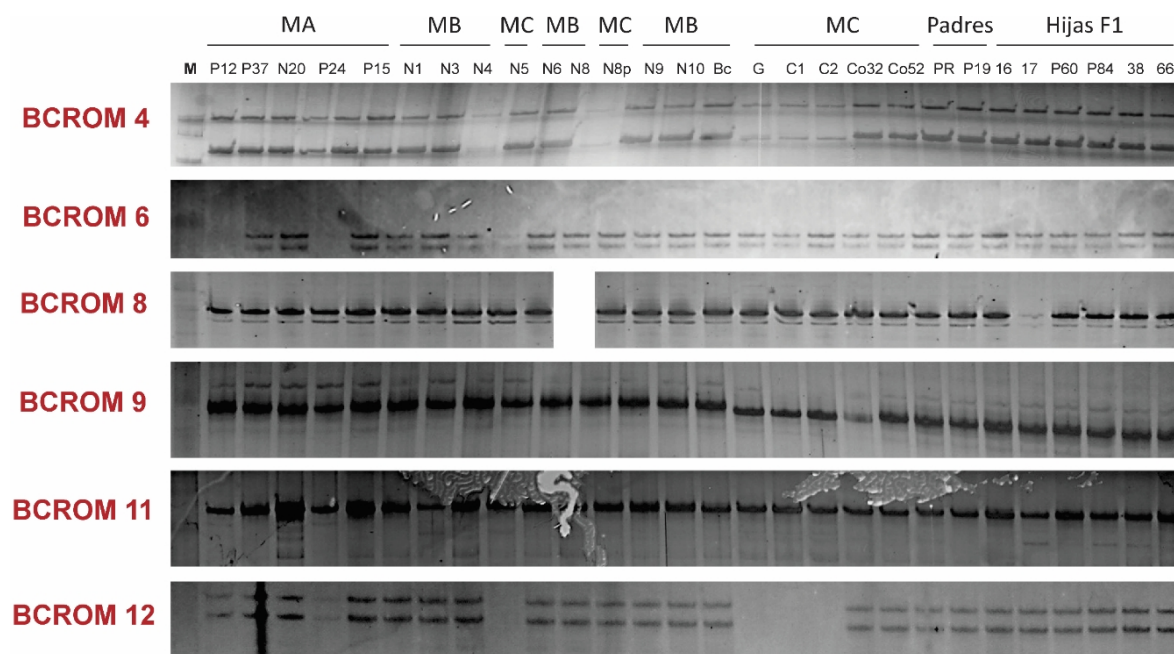


Figura 3.4 Perfiles monomórficos en 7 fragmentos parciales del gen *BoBLYC2*, obtenidos mediante la técnica SSCP de 28 accesiones de *Bixa orellana* L. Se realizó el análisis SSCP a las muestras amplificadas con los cebadores BCROM4, BCROM6, BCROM8, BCROM9, BCROM11 y BCROM12. Se obtuvo el mismo perfil (2 bandas) en los juegos BCROM4, BCROM6, BCROM8, BCROM11, BCROM12. Gel de Poliacrilamida (49:1) al 10%.

Siete fragmentos parciales del gen *BoBLYC2* presentaron perfiles monomórficos (Fig 3.4). Las 28 accesiones analizadas con los juegos cebadores BCROM 4 BCROM6, BCROM8, BCROM9, y BCROM12, mostraron el mismo patrón de bandeo, en donde se aprecian 2 bandas, pero, entre los juegos de cebadores, el mismo perfil se presentó en distintas migraciones electroforéticas (Fig 3.4); mientras que, el juego de cebador BCROM 11 exhibió un patrón de bandeo particular, 4 bandas, en todas las accesiones analizadas de este CAPITULO III (Fig 3.4 BCROM11). Cabe resaltar que las accesiones pertenecientes al grupo MC [N5, G, C1, C2] del juego de cebador BCROM12 (Fig 3.4 BCROM 12) no mostraron amplificación alguna, dando lugar, junto con los resultados de la PCR convencional (Fig 3.3b BCROM 12), a una posible presencia de polimorfismos en este fragmento parcial del gen que pudiesen ocasionar problemas en la unión de los cebadores BCROM 12 sobre la misma secuencia.

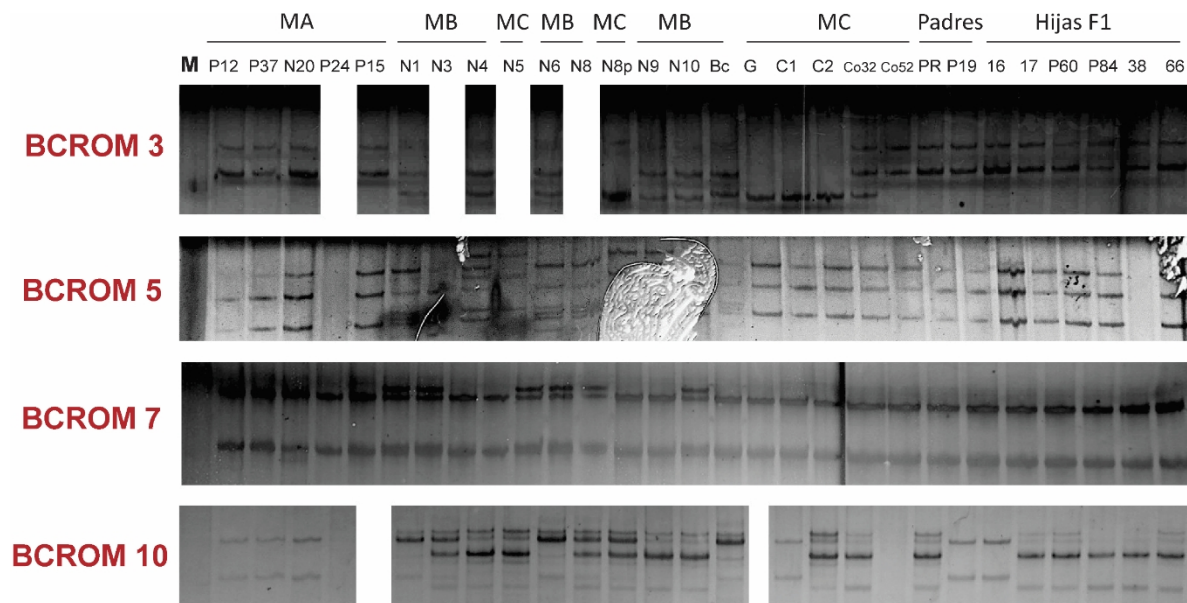


Figura 3.5 Perfiles polimórficos en 4 fragmentos parciales del gen *BoBLYC2*, obtenidos mediante la técnica SSCP de 28 accesiones de *Bixa orellana* L. Se realizó el análisis SSCP a las muestras amplificadas con los cebadores BCROM3, BCROM5, BCROM7 y BCROM10. BCROM3. Gel de Poliacrilamida (49:1) al 10%.

Los perfiles polimórficos se presentaron en 4 fragmentos parciales del gen *BoBlyc2* (Fig 3.5). El fragmento parcial obtenido con el juego de cebador BCROM 3, presentó 3 patrones de bandeo: patrón de bandeo A, patrón de bandeo B y patrón de bandeo C (Fig 3.6a). En el patrón A (línea verde) se aprecia que las accesiones del MA, del grupo Padres y del grupo Hijas F1, están identificados por la presencia de 2 bandas con la misma distancia electroforética (flechas verdes); la accesión Co52 del MC, exhibió de igual manera las mismas características electroforéticas. El patrón de bandeo B (línea roja pálida) se identifica mediante la presencia de 3 bandas (flechas rojas pálidas) y, las accesiones que presentan esta característica polimórfica son las accesiones del MB y la accesión Co32 del MC. Por último, el patrón de bandeo C (línea morada) agrupa a 4 accesiones del MC [N8p, G, C1 y C2], y están identificadas por la presencia de 2 bandas (flechas moradas), cuya distancia migratoria es diferencial con respecto al patrón de bandeo A (Fig 3.6a).

Para el fragmento parcial obtenido con el juego de cebador BCROM5, se presentan 4 patrones de bandeo (Fig 3.6b). El primer patrón, denominado A (línea verde), se identifica por la presencia de 3 bandas (flechas verdes), el cual las accesiones del MA, del grupo Padres y del grupo Hijas F1 presentan este comportamiento electroforético. El patrón de bandeo B (línea roja pálida) está identificado por la presencia 6 bandas (flechas rojas pálidas), característica polimórfica que solo presentan 5 accesiones del MB [N1, N3, N6, N8, Bc]. El siguiente patrón de bandeo, patrón C (línea naranja), nos presenta que sólo las accesiones N4 Y N9 del MC están identificados por la presencia de 6 bandas (flechas naranjas) con diferentes migraciones electroforéticas con respecto al patrón de bandeo B (flechas rojas pálidas). Y, por último, el patrón de bandeo D (línea morada) se identifica por presentar 3 bandas cuya migración electroforética es diferencial con respecto al patrón de bandeo A (flechas verdes); sólo las variantes N5 y N8p presentan este comportamiento electroforético.

Continuando con los resultados, en el fragmento parcial obtenido con el juego de cebador BCROM7 solamente se observan 2 patrones de bandeo (Fig 3.6c). El patrón de bandeo A (línea verde) agrupa a las accesiones del MA, 3 accesiones del MB [N4, N9 y N10], 6 accesiones del MC [N5, G, C1, C2, Co32 y Co52], del grupo Padres y del grupo Hijas F1, siendo identificadas por la presencia de 2 bandas con la misma distancia electroforética (flechas verdes). Y el patrón de bandeo B (línea roja pálida), está representada por la presencia de 3 bandas (flechas rojas pálidas) en 4 accesiones del MB [N1, N3, N6, N8 y Bc] y la accesión N8p del MC.

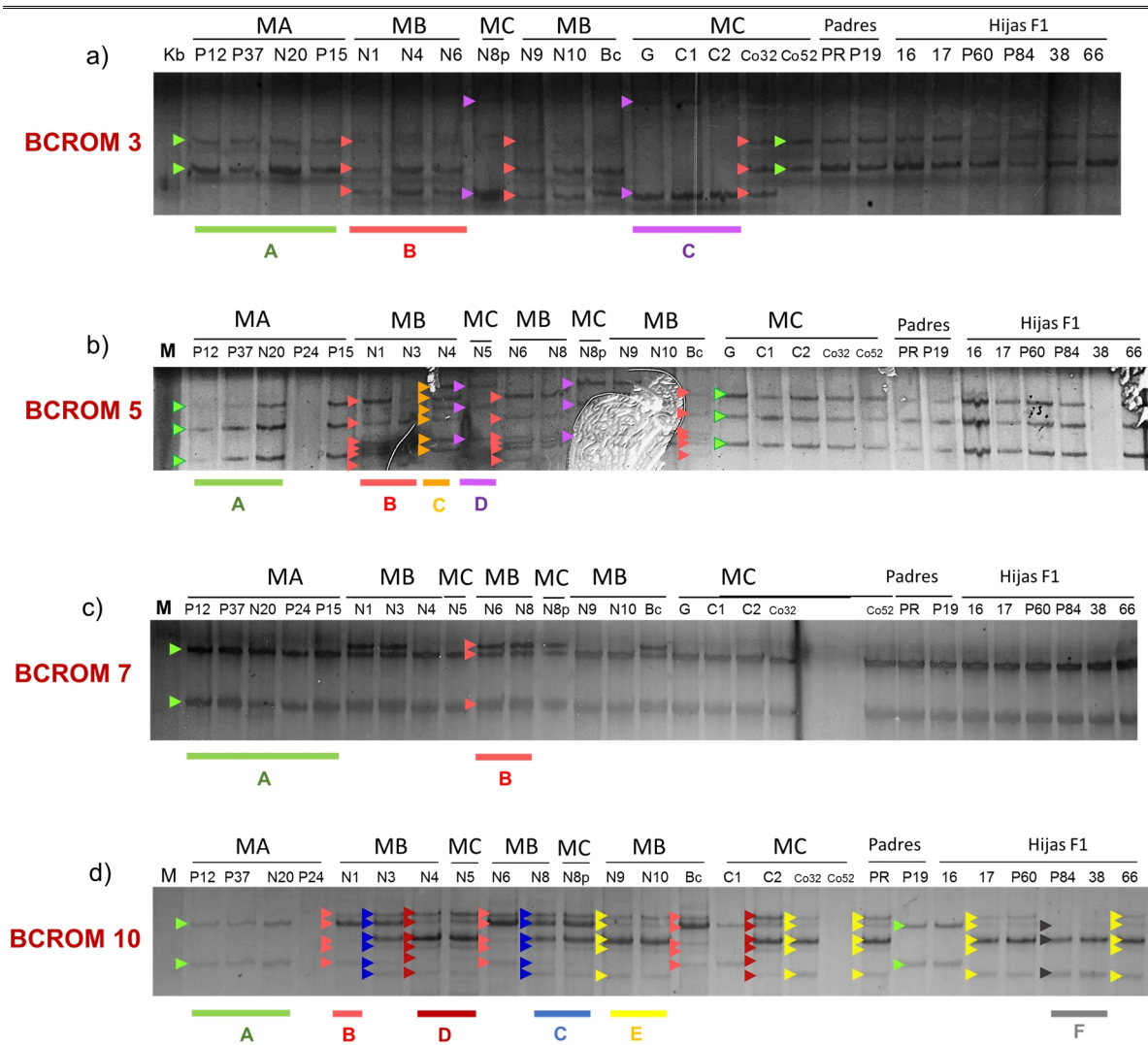


Figura 3.6 Perfiles polimórficos descritos en 4 fragmentos parciales del gen *BoBLYC2*, obtenidos mediante la técnica SSCP de 28 accesiones de *Bixa orellana* L. Se realizó el análisis SSCP a las muestras amplificadas con los cebadores BCROM3, BCROM5, BCROM7 y BCROM10. BCROM3: se obtuvieron 3 perfiles polimórficos; BCROM5: se obtuvieron 4 perfiles polimórficos; BCROM7: se obtuvieron 2 perfiles polimórficos; BCROM10: se obtuvieron 6 perfiles polimórficos. Gel de Poliacrilamida (49:1) al 10%.

En el último fragmento parcial que presentó polimorfismos, obtenidos con el juego de cebador BCROM10, se observaron 6 patrones de bandeo (Fig 3.6d). En el primer patrón, patrón de bandeo A (línea verde), agrupa a las accesiones del MA y a la accesión C1 del MC que se identifican por la presencia de 2 bandas (flechas verdes). El segundo patrón de bandeo, B (línea roja pálida), está identificado por presentar 5 bandas (flechas rojas pálidas), agrupando a las accesiones N1, N6 y Bc del MB. Siguiendo con el patrón de bandeo C (línea azul), este se representa por 6 bandas (flechas azules), quienes las accesiones N3 y N8 del MB (y N8p del MC poseen esa representación polimórfica. Con el cuarto patrón de bandeo, D (línea roja), podemos apreciar que agrupa a la accesión N4 del MB, N5 y C2 del MC; este patrón de bandeo tiene la característica de exhibir 6 bandas (flechas rojas) con un comportamiento de migración diferencial a las obtenidas con el patrón de bandeo C. En el penúltimo patrón de bandeo, E, se observan 5 bandas (flechas amarillas) y, agrupa a 2 accesiones del grupo Hijas F1 [17 y P60], 3 accesiones del MB [N9, N10 y 66] y 2 accesiones del MC [Co32 y PR]. Por último, el patrón de bandeo F (línea gris oscuro) se caracteriza por tener la presencia de 3 bandas (flechas grises oscuras), y estas se presentan sólo en las variantes P84 y 38 del grupo Hijas F1.

3.3.4 Análisis bionfórmico de 4 regiones polimórficas del gen *BoBLYC2*

Conociendo los resultados obtenidos a través de la técnica SSCP, existen 4 regiones polimórficas de la secuencia del gen *BoBLYC2* que podrían presentar cambios puntuales e importantes en la cadena nucleotídica, existiendo la posibilidad de asociarse a las características fenotípicas de las accesiones analizadas en este estudio. Para ello, aislamos por duplicado a las bandas polimórficas de cada patrón de bandeo obtenidos de los juegos de cebadores BCROM 3, BCROM 5, BCROM 7 y BCROM 10. 83 muestras fueron enviadas a su secuenciación.

3.3.4.1 Fragmento polimórfico BCROM 3 del gen *BoBLYC2*

En el fragmento parcial obtenido mediante los cebadores BCROM 3, se identificaron 11 cambios de nucleótidos con respecto a la secuencia del gen *BoBLYC2* [KT359005] (Fig 3.7). En la posición 314 pb la secuencia KT359005 presenta el nucleótido A, las accesiones del MB exhiben el mismo nucleótido (Fig 3.7b), mientras que las accesiones del MA ostentan el nucleótido C al igual que las accesiones del MC (Fig 3.7a, c). En la posición 329 pb de KT359005 arroja el nucleótido A, pero las accesiones MA y MC presentan el nucleótido G (Fig 3.7a, c), mientras que las accesiones del MB exhiben la presencia de los nucleótidos A/G (Fig 3.7b). En la posición 332 pb las accesiones de los MA, MB y MC presentan el cambio puntual C, con respecto a la secuencia KT359005 que tiene el nucleótido T. Prosiguiendo, en la posición 339 pb la secuencia KT359005 presenta el nucleótido A, mismo que ostentan las accesiones del MA y MB, mientras que las accesiones del MC exhiben el nucleótido G. En la posición 348 pb de KT359005 se presenta el nucleótido A, el cual las accesiones del MA exhiben el mismo nucleótido, mientras que las accesiones del MC arrojan el nucleótido G y las accesiones del MB los nucleótidos A/G. En la posición 362 pb la secuencia KT359005 presenta el nucleótido T, mismo nucleótido que ostentan las accesiones del MA y MC, aunque las accesiones del MB presentan A/T. En la posición 369 pb la secuencia KT359005 presenta el nucleótido G, mismo que ostentan las accesiones del MA y MC; sin embargo, las accesiones del MB presentan el nucleótido C. En la posición 395 pb las accesiones de los MA, MB y MC exhiben el cambio puntual G, con respecto a la secuencia KT359005 que tiene el nucleótido T. En la posición 401 pb las accesiones del MB y MC arrojan el nucleótido G, mismo que presenta la secuencia KT359005; las accesiones del MA exhiben el nucleótido T.

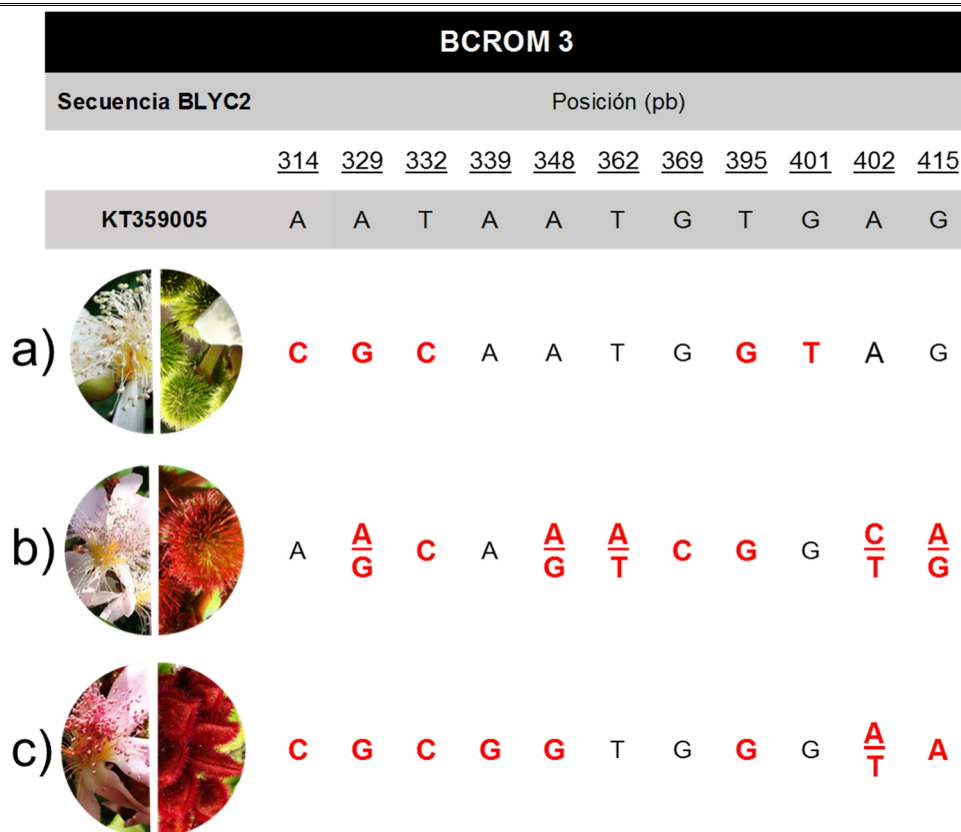


Figura 3.7 SNPs presentados en el fragmento polimórfico BCROM 3 del gen *BoBLYC2*. Se identificaron 11 SNPs enumerados de acuerdo a su posición en la secuencia nucleotídica del gen *BoBLYC2* (KT359005), siendo marcados en Negrita y color rojo. a) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MA (plantas con frutos verde y flores blancas). b) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MA (plantas con frutos roji-verdes y flores rosas pálidas). c) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MC (plantas con frutos rojos y flores rosas-lilas).

En la penúltima posición, 402 pb, la secuencia KT359005 presenta A, mismo que presentan las accesiones del MA; no obstante, las accesiones del MB presentan los cambios C/T y, las accesiones del MC arrojan A/T. En la última posición, 415 pb, la secuencia KT359005 presenta G, mismo que presentan las accesiones del MA; mientras que, las accesiones del MB presentan los cambios A/G y, las accesiones del MC arrojan el nucleótido A.

3.3.4.2 Fragmento polimórfico BCROM 5 del gen *BoBLYC2*

Con los cebadores BCROM 5, el fragmento parcial exhibió 35 cambios puntuales (Fig. 3.8). Las accesiones del MA presentaron cambios en las posiciones 607 pb (T), 610 pb (T), 612

pb (A), 614 pb (T), 623 pb (T), 628 pb (G), 629 pb (C), 636 pb (G/T), 638 pb (G), 640 pb (C/T), 641 pb (T), 652 pb (G/T), 553 pb (C/T), 656 pb (T), 657 pb (C), 658 pb (T), 667 pb (C/T), 680 pb (C), 681 pb (T), 689 pb (A/T) y 690 pb (C) con respecto a la secuencia KT359005 (Fig 3.8a). Las accesiones del MB ostentaron cambios en las posiciones 607 pb (T), 610 pb (T), 611 pb (C), 612 pb (A), 614 pb (T), 636 pb (T), 637 pb (A/G) 638 pb (T), 639 pb (C), 640 pb (T), 641 pb (A), 653 pb (T), 654 pb (C), 656 pb (T), 657 pb (C/G), 658 pb (T), 678 pb (C), 681 pb (T), 689 pb (C) y 690 pb (C) con respecto a la secuencia KT359005 (Fig 3.8b). Por último, las accesiones del MC exhibieron cambios puntuales en las posiciones 607 pb (T), 610 pb (T), 611 pb (C), 612 pb (A), 614 pb (T), 636 pb (T), 637 pb (A/G), 638 pb (T), 639 pb (C), 640 pb (T), 641 pb (A), 653 pb (T), 654 pb (C), 656 pb (T), 657 pb (C/G), 658 pb (T), 678 pb (C), 681 pb (T), 689 pb (C) y 690 pb (C) con respecto a la secuencia KT359005 (Fig 3.8c).

3.3.4.3 Fragmento polimórfico BCROM 7 del gen *BoBLYC2*

En el fragmento parcial obtenido con los cebadores BCROM 7, se identificaron 15 cambios puntuales con respecto a la secuencia del gen *BoBlyc2* [KT359005] (Fig 3.9). Las accesiones del MA mostraron sólo 5 cambios puntuales, cuyos nucleótidos están en las posiciones 881 pb (C), 902 pb (A), 904 pb (A), 920 pb (C) y 938 pb (C) alineados contra la secuencia KT359005 (Fig 3.9a). También 5 cambios puntuales se observaron en las accesiones del MB, pero los cambios se ubican en las posiciones 881 pb (C), 902 pb (A), 904 pb (A), 920 pb (C) y 938 pb (C) alineados contra la secuencia KT359005 (Fig 3.9b). Las accesiones del MC presentaron 12 cambios de nucleótido en las posiciones 874 pb (A), 875 pb (G), 876 pb (T), 87 pb (A), 879 pb (C), 881 pb (T), 882 pb (C), 902 pb (T), 904 pb (A), 908 pb (C/G), 909 pb (T) y 938 pb (C/G) alineados respecto a la secuencia KT359005 (Fig 3.9b).

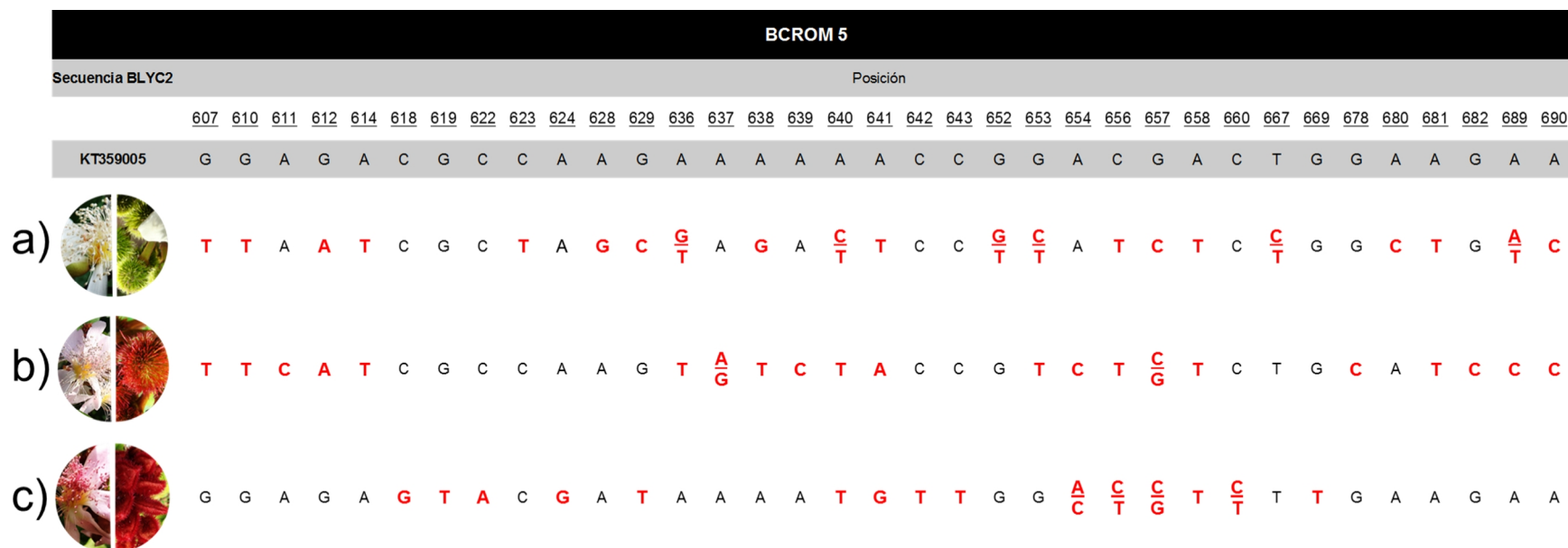


Figura 3.8 SNPs presentados en el fragmento polimórfico BCROM 5 del gen *BoBLYC2*. Se identificaron 35 SNPs enumerados de acuerdo a su posición en la secuencia nucleotídica del gen *BoBLYC2* (KT359005), siendo marcados en Negrita y color rojo. a) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MA (plantas con frutos verde y flores blancas). b) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MA (plantas con frutos roji-verdes y flores rosas pálidas). C) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MC (plantas con frutos rojos y flores rosas-lilas).

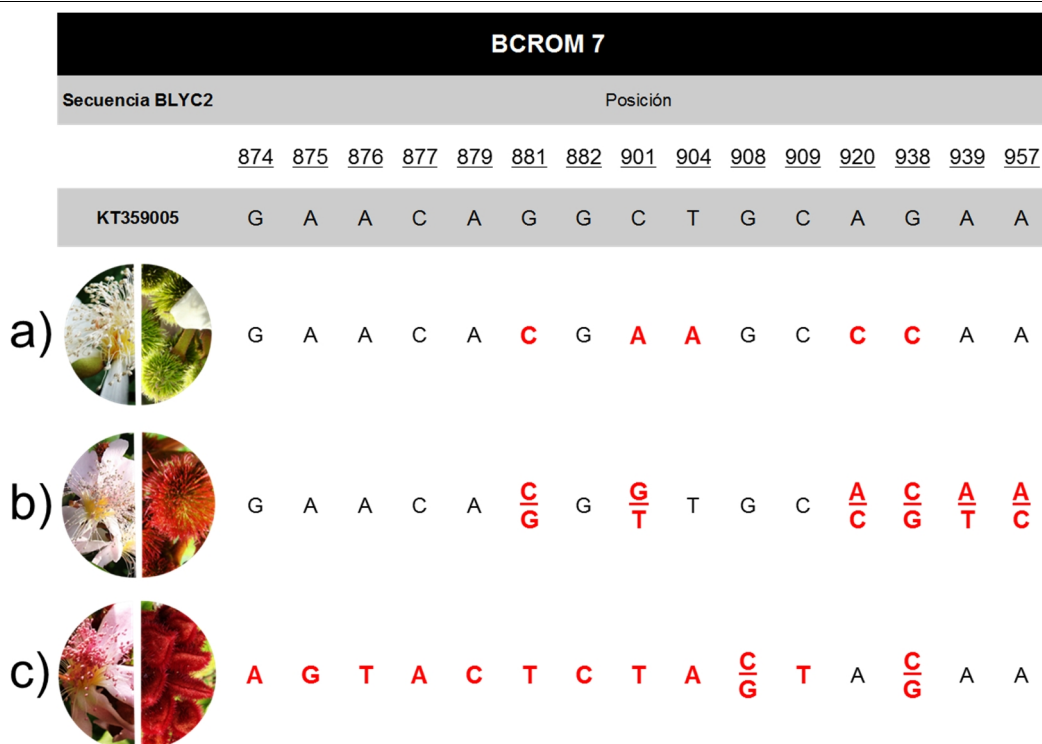


Figura 3.9 SNPs detectados en el fragmento polimórfico BCROM 7 del gen *BoBLYC2*. Se identificaron 15 SNPs enumerados de acuerdo a su posición en la secuencia nucleotídica del gen *BoBLYC2* (KT359005), siendo marcados en Negrita y color rojo. a) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MA (plantas con frutos verde y flores blancas). b) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MA (plantas con frutos roji-verdes y flores rosas pálidas). c) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MC (plantas con frutos rojos y flores rosas-lilas).

3.3.4.4 Fragmento polimórfico BCROM 10 del gen *BoBLYC2*

En el último fragmento parcial que presentó polimorfismos, obtenidos con el juego de cebadores BCROM10, se identificaron 14 cambios puntuales y 3 deleciones (Fig 3.10). En las accesiones del MA se observaron cambios puntuales en las posiciones 1272 pb (C) y 1324 pb (C), y una deleción en la posición 1273 pb, que, en la secuencia KT359005 presenta G (Fig 3.10a). Las accesiones del MB evidenciaron la presencia de dos nucleótidos en las posiciones 1264 pb (A/G), 1271 pb (C/G), 1272 pb (C/G), 1285 pb (C/T), 1288 pb (C/G), 1304 pb (C/T), 1321 pb (A/T), 1323 pb (C/T), 1234 pb (C/T), 1236 pb (C/T) y 1331 pb (C/T), mientras que la posición 1273 pb presentó el nucleótido C; se observó que las accesiones del MB presentaron deleciones en las posiciones 1305 pb (C) y 1320 pb (C)

de la secuencia KT359005 (Fig 3.10b). En las accesiones del MC se observaron que 8 posiciones tuvieron la presencia de 2 posibles nucleótidos: 1263 pb (A/C), 1264 pb (A/G), 1273 pb (C/G), 1321 pb (A/T), 1323 pb (C/T), 1234 pb (C/T), 1236 pb (C/T) y 1331 pb (C/T); 3 cambios fueron de un nucleótido, en la posición 1271 pb (C); también se observó una delección en la posición 1305 pb, que, en la secuencia KT359005 presenta C (Fig 3.10c).

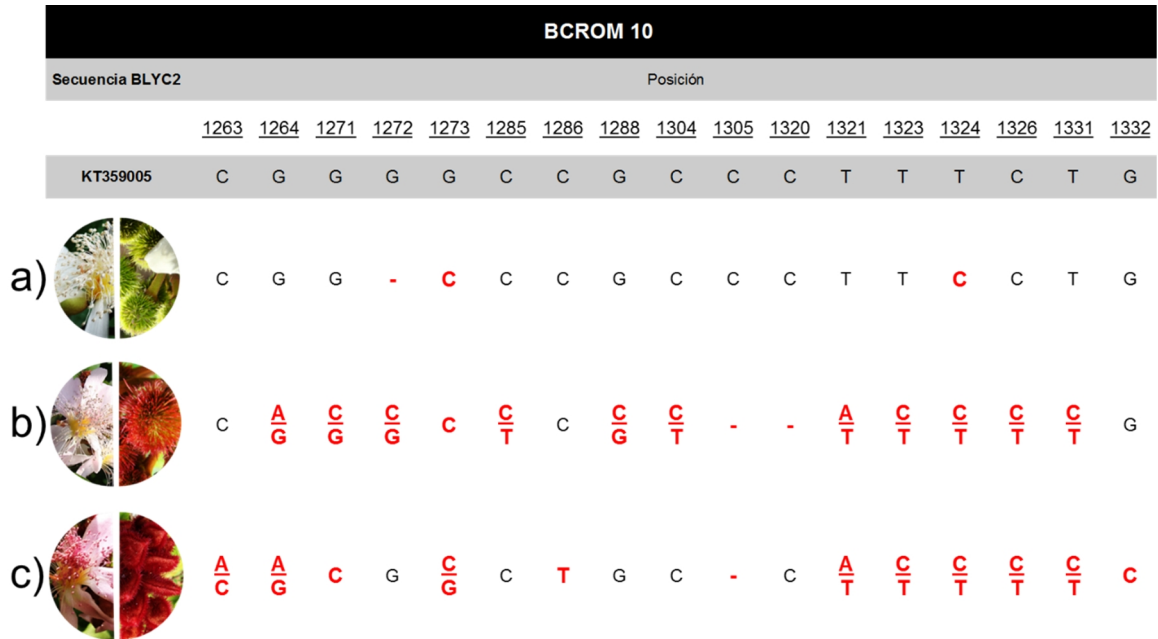
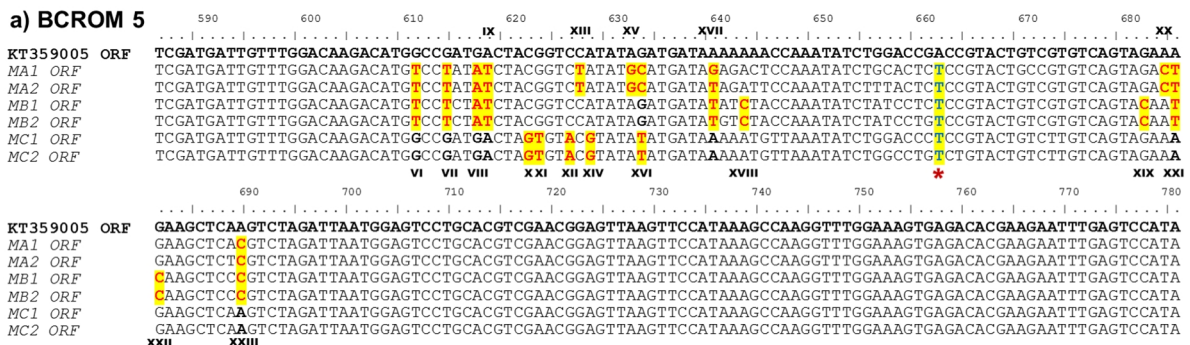
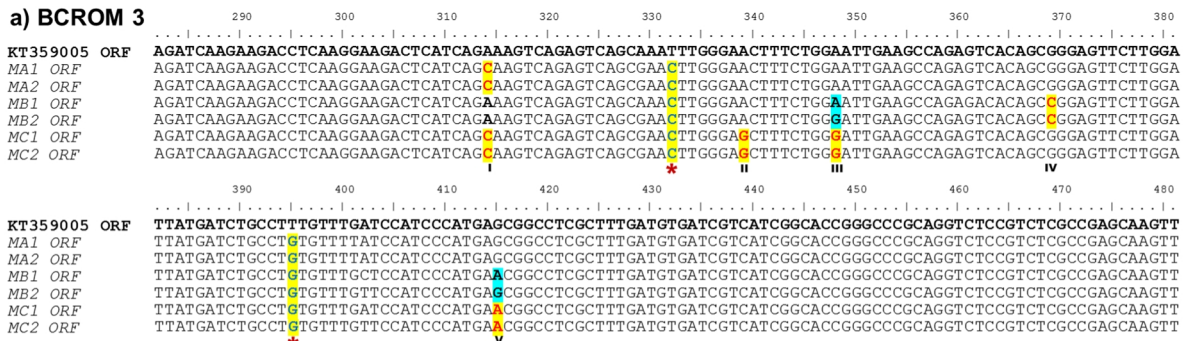


Figura 3.10 SNPs detectados en el fragmento polimórfico BCROM 10 del gen *BoBLYC2*. Se identificaron 17 SNPs enumerados de acuerdo a su posición en la secuencia nucleotídica del gen *BoBLYC2* (KT359005), siendo marcados en Negrita y color rojo. a) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MA (plantas con frutos verde y flores blancas). b) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MA (plantas con frutos roji-verdes y flores rosas pálidas). c) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MC (plantas con frutos rojos y flores rosas-lilas).

3.3.5. Detección de SNPs significativos en 4 fragmentos polimórficos del gen *BoBLYC2*

Con la información del análisis de las secuencias de los fragmentos polimórficos, se conocieron 75 cambios puntuales y 5 deleciones (FigS 3.1). También, cada morfotipo evidenció la presencia de 2 formas alélicas del gen *BoBLYC2*, debido a la presencia de polimorfismos heterocigotos en el análisis mediante la técnica de SSCP (Fig 3.11). No obstante, Las secuencias del ORF del gen *BoBLYC2* de los tres morfotipos mostraron sustituciones representativas en las posiciones 332 pb , 395 pb Y 658 pb con respecto a la secuencia KT359005 (Fig. 3.11, asteriscos rojos), siendo en el primero C sustituyendo a T, el segundo G sustituyendo a T y en la tercera posición T sustituye a A; además, estos cambios ocasionan sustituciones de aminoácidos (Fig 3.16, asteriscos rojos) en la cadena polipeptídica de la proteína *BoBLYC2*: C (posición 332 pb) provoca la sustitución de F (fenilalanina, aromático e hidrofóbico) por una L(leucina, alifático aromático) en la posición 51 pb de la cadena de aminoácidos; G(posición 395 pb) provoca la sustitución de L por un V (valina, alifático apolar) en la posición 72 de la cadena de aminoácidos; y T (posición 658 pb) provoca, en conjunto con otros cambios puntuales, la sustitución de R (arginina) por: S (serina) en el MA, S/C (cisteína) en el MB y C/P (prolina) en el MC.



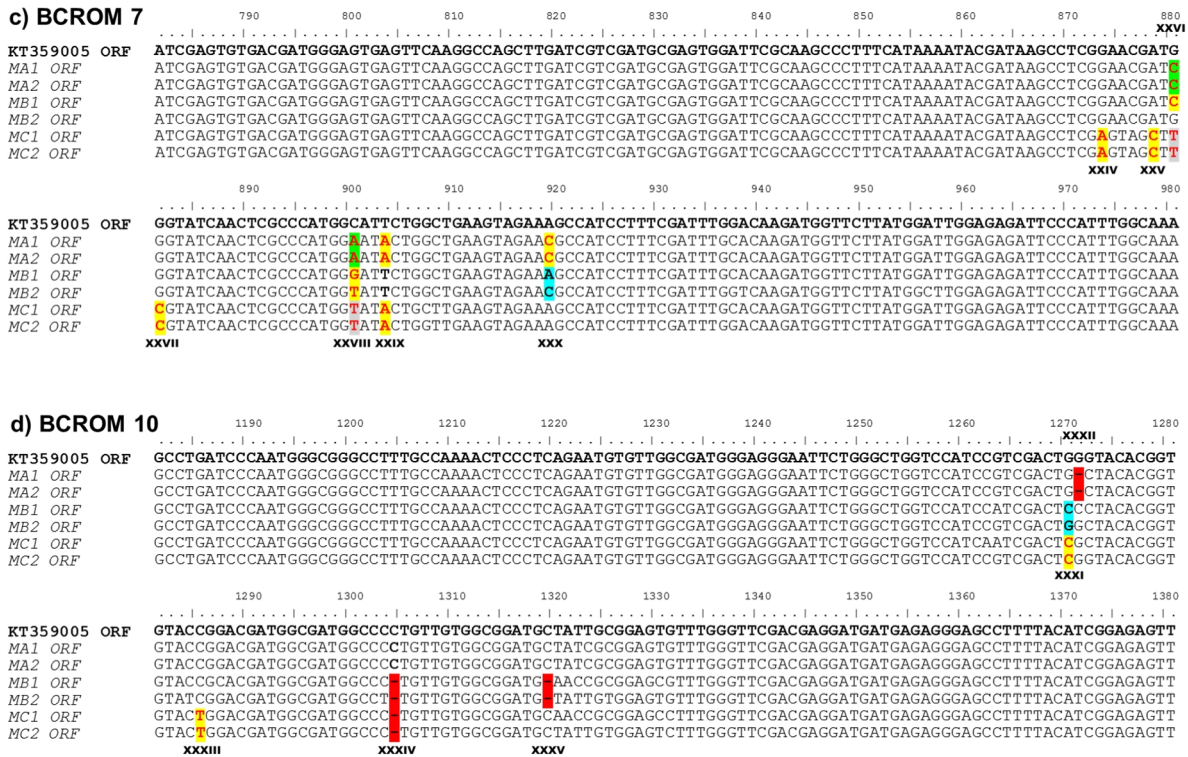


Figura 3.11 Localización de los SNPs significativos en 4 fragmentos polimórficos obtenidos del gen *BoBLYC2*. 35 SNPs significativos asociados a las características fenotípicas de las accesiones de *Bixa orellana* L. fueron localizados dentro de las regiones ORF del gen *BoBLYC2* de los 3 morfotipos establecidos en este estudio. a) EL fragmento BCROM 3 presenta los SNPs I hasta el V. b) El fragmento BCROM 5 presenta los SNPs VI hasta el XXIII. c) El fragmento BCROM 7 presenta los SNPs XXIV hasta el XXX. d) El fragmento BCROM 10 presenta los SNPs XXXI hasta el XXXV. Los cambios presenten en los tres morfotipos establecidos, están marcados con Negrita color azul, relleno amarillo y señalados con asterisco rojo. Los nucleótidos conservados con la posibilidad de ser utilizado como marcador molecular, están marcados con Negrita. Los SNPs marcados con relleno rojo, son las deleciones que se presentaron en dichas posiciones. Los SNPs que presentan cambios diferentes en cada versión de un solo morfotipo, están marcados con Negrita y relleno azul celeste. Los SNPs que presentan diferentes cambios entre los 3 morfotipos, están marcados con Negrita color rojo, relleno amarillo (MA), relleno gris (MC). Alineamiento mediante el algoritmo CLUSTALW implementado en el programa BioEdit.

El objetivo de esta investigación, como ya se mencionó en párrafos anteriores, es la búsqueda de marcadores moleculares que nos permitan asociar las características genotípicas a las características fenotípicas de las accesiones analizadas. Por ello, se han detectado 35 SNPs significativos que nos permite establecer agrupaciones de plantas con características fenotípicas idénticas, con la posibilidad de desarrollar una selección específica de plantas de achiote asociados con el contenido de bixina. Los SNPs detectados se localizan en el marco de lectura abierto de las secuencias, en motivos conservados entre las ciclasas.

3.3.5.1 SNPs significativos en el fragmento polimórfico BCROM 3 del gen *BoBLYC2*

Los primeros 5 SNPs están posicionados en el fragmento parcial obtenido con los cebadores BCROM 3 (Fig. 3.11a). El SNP I se localiza en la posición 314 pb (A/C), donde el nucleótido A predomina solamente en las accesiones del MB y, C en las accesiones del MA y MC (Fig. 3.12, I); C ocasiona un cambio de aminoácido en los MA y MC que sustituye a K (lisina, carga positiva y polar), presente en el MB, por Q (glutamina, neutro polar) (Fig. 3.16, I). El SNP II se encuentra en la posición 339 pb (A/G) donde el nucleótido A predomina en las accesiones del MA y MB y, G en las solamente en el MC (Fig 3.12, II); G ocasiona un cambio de aminoácido en el MC que sustituye a N (asparagina, pequeño y polar), presente en los MA y MB, por S (serina, neutro polar) (Fig. 3.16, I). El SNP III lo ubicamos en la posición 348 pb (A/G), en la cual el MA conserva el nucleótido A, mientras que el MC lo sustituye por G (Fig 3.12, III); G provoca un cambio de aminoácido en el MC sustituyendo a E (ácido glutámico, carga negativa y polar), conservado en el MA, por G (glicina, aminoácido apolar) (Fig. 3.16, III). El SNP IV ha sido localizado en la posición 369 pb (G/C), donde el nucleótido C existe en las accesiones del MB y, G en las accesiones del MA y MC (Fig 3.11a, IV); C ocasiona un cambio de aminoácido en el MB que sustituye a R (arginina, positiva y polar), presente en el MA y MC, por P (prolina, alifático y apolar) (Fig. 3.16, IV). El quinto SNP, SNP V, se ubica en la posición 415 pb (G/A), en la cual el MA conserva el nucleótido G, mientras que el MC lo sustituye por A (Fig 3.12a, V); el cambio puntual no origina ninguna sustitución en la secuencia de aminoácidos, manteniendo E en las secuencias polipeptidas (Fig. 3.16, V).




BCROM 3							
Secuencia BLYC2	Posición (pb) / (a.a)						
	<u>314/45</u>	<u>332/51</u>	<u>339/53</u>	<u>348/56</u>	<u>369/63</u>	<u>395/72</u>	<u>415/78</u>
KT359005	A / K	T / F	A / N	A / E	G / R	T / L	G / E
	SNP I		SNP II	SNP III	SNP IV		SNP V
a) 	C / Q	C / L	A / N	A / E	G / R	G / V	G / E
b) 	A / K	C / L	A / N	A / G / E / G	C / P	G / V	A / G / E / E
c) 	C / Q	C / L	G / S	G / G	G / R	G / V	A / E

Figura 3.12 SNPs significativos obtenidos del fragmento polimórfico BCROM 3 del gen *BoBLYC2*. Se identificaron 5 SNPs significativos (Negrita y color rojo) que generan cambios de aminoácidos (Negrita y color rojo), asociados a las características fenotípicas de las accesiones de *Bixa orellana* L.; los cambios marcados con Negrita y color azul, son SNPs que representan a los 3 Morfotipos establecidos en este trabajo de *Bixa orellana* L. a) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MA (plantas con frutos verde y flores blancas). b) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MA (plantas con frutos roji-verdes y flores rosas pálidas). c) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MC (plantas con frutos rojos y flores rosas-lilas).

3.3.5.2 SNPs significativos en el fragmento polimórfico BCROM 5 del gen *BoBLYC2*

En el fragmento parcial obtenido con los cebadores BCROM 5, se han localizado 18 SNPs (Fig 3.11b). Las accesiones del MA presentaron 3 SNPs específicos que pueden ser asociados a sus características fenotípicas, ya que los SNP XIII, XV y XX arrojaron cambios puntuales en las posiciones 623 pb (T), 628 pb (G) y 680 pb (C) que corresponden solo para el MA (Fig 3.13, XIII, XV, XX). De la misma manera, 3 SNPs pueden asociarse específicamente a las accesiones del MB, siendo los SNP XVIII, XIX y XXII cambios puntuales solo para el MB, en las posiciones 639 pb (C), 678 pb (C) y 682 pb (C) (Fig 3.13, XVIII, XIX, XXII). 12 SNPs pueden ser potencialmente utilizados para asociarlos con las características fenotípicas de las accesiones del MC, puesto que los SNPs VI, VII, XVIII, IX,

XXI, XVII y XXIII conservan los nucleótidos G (607 pb), G (610 pb), G (613 pb), A (614 pb), A (681 pb), A (636 pb) y A (690 pb) respectivamente, en las secuencias del MC (Fig 3.13, VI, VII, XVIII, IX, XXI, XVII, XXIII); los SNP X (G, posición 618 pb), XI(T, posición 619 pb), XII(A, posición 622 pb) y XIV(G, posición 624 pb) son cambios puntuales que corresponden solamente para el MC (Fig 3.13, X, XI, XII, XIV). El SNP XVI presenta cambios puntuales específico para cada morfotipo, siendo C para las accesiones del MA, G para el MB y T para el MC (Fig 3.13, XVI).




		BCROM 5																	
Secuencia BLYC2		Posición (pb) / (a.a)																	
KT359005		607/142	610/143	613/144	614/145	618/146	619/146	622/147	623/148	624/148	628/149	629/150	636/152	639/153	678/166	680/167	681/167	682/167	690/170
		G/W	G/P	G/M	A/T	C/T	G/T	C/V	C/H	A/H	A/I	G/D	A/K	A/K	G/R	A/K	A/K	G/K	A/K
		SNP VI	SNP VII	SNP VIII	SNP XIX	SNP X	SNP XI	SNP XII	SNP XIII	SNP XIV	SNP XV	SNP XVI	SNP XVII	SNP XVIII	SNP XIX	SNP XX	SNP XXI	SNP XXII	SNP XXIII
a)		T/C	T/P	A/L	T/S	C/T	G/T	C/V	T/Y	A/H	G/M	C/H	G/T	A/D	G/R	C/L	T/L	G/L	C/S
b)		T/C	T/P	A/L	T/S	C/T	G/T	C/V	C/H	A/H	A/I	G/D	T/I	C/S	C/T	A/I	T/I	C/I	C/P
c)		G/W	G/P	G/M	A/T	G/S	T/S	A/V	C/H	G/R	A/I	T/Y	A/K	A/N	G/R	A/K	A/K	G/K	A/K

Figura 3.13 SNPs significativos obtenidos del fragmento polimórfico BCROM 5 del gen *BoBLYC2*. Se identificaron 18 SNPs significativos asociados a las características fenotípicas de las accesiones de *Bixa orellana* L. Los SNPs que conservan el mismo nucleótido y el mismo aminoácido con Negrita y color negro; Los SNPs que generan cambio de aminoácido están marcados con Negrita y color rojo. a) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MA (plantas con frutos verde y flores blancas). b) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MA (plantas con frutos roji-verdes y flores rosas pálidas). C) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MC (plantas con frutos rojos y flores rosas-lilas).

3.3.5.3 SNPs significativos en el fragmento polimórfico BCROM 7 del gen *BoBLYC2*

El fragmento parcial conseguido con los cebadores BCROM 7 presentó 7 SNPs (Fig 3.11c). Los SNP XXIV, XXV, XXVI y XXVII arrojaron cambios puntuales en las posiciones 874pb (A), 879 pb (C), 881 pb (T) 882 pb (C) que corresponden solo para las accesiones del MC (Fig 3.14, XXIV, XXV, XXVI, XXVII). El SNP XXVIII, ubicado en la posición 901 pb, tienen cambios puntuales G/T, que se presenta en las accesiones de los MB y MC; mientras que el

MA conserva el nucleótido A (Fig 3.14, XXVIII). El SNP XXIX, localizado en la posición 904 pb, tiene un cambio puntual, C, que se presenta en las accesiones de los MA y MC; mientras que el MB conserva el nucleótido T (Fig 3.14, XXIX). En el SNP XXX, ubicado en la posición 920 pb (A/C), conserva el nucleótido A en las accesiones del MC, mientras que en el MA se sustituye por C (Fig 3.14, XXX).




BCROM 7							
Secuencia BLYC2	Posición (pb) / (a.a)						
	<u>874/231</u>	<u>879/233</u>	<u>881/234</u>	<u>882/234</u>	<u>901/240</u>	<u>904/241</u>	<u>920/247</u>
KT359005	G / R	A / D	G / R	G / R	C / G	T / I	A / S
	SNP XXIV	SNP XXV	SNP XXVI	SNP XXVII	SNP XXVIII	SNP XXIX	SNP XXX
a) 	G / R	A / D	C / R	G / R	A / G	A / I	C / R
b) 	G / R	A / D	C / G / R	G / G	G / T / G	T / I	A / C / S / R
c) 	A / R	C / A	T / S	C / S	T / G	A / I	A / S

Figura 3.14 SNPs significativos obtenidos del fragmento polimórfico BCROM 7 del gen *BoBLYC2*. Se identificaron 7 SNPs significativos asociados a las características fenotípicas de las accesiones de *Bixa orellana* L. Los SNPs que conservan el mismo nucleótido y el mismo aminoácido con Negrita y color negro; Los SNPs que generan cambio de aminoácido están marcados con Negrita y color rojo. a) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MA (plantas con frutos verde y flores blancas). b) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MA (plantas con frutos roji-verdes y flores rosas pálidas). C) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MC (plantas con frutos rojos y flores rosas-lilas).

3.3.5.4 SNPs significativos en el fragmento polimórfico BCROM 10 del gen *BoBLYC2*

Los SNPs XXXI, XXXII, XXXIII, XXXIV y XXXV se encuentran localizados en el fragmento parcial obtenido mediante los cebadores BCROM10 (Fig 3.11d). El SNP XXXI ubicado en la posición 1271 pb (G/C), conserva el nucleótido G en las accesiones del MA, mientras que

en el MC se sustituye por C (Fig 3.15, XXXI). El SNP XXXII, es una delección en la posición 1272 pb que sólo se presenta en las accesiones de los MA, mientras que el MB presenta C/G y el MC conserva el nucleótido G (Fig 3.15, XXXII). El SNP XXXIII, localizado en la posición 1286 pb, tiene un cambio puntual (T) que se presenta en las accesiones del MC; mientras que los MA y MB conserva el nucleótido C (Fig 3.15, XXXIII). Las delecciones de los MB y MC en la posición 1305 pb, permite que pueda ser usado como marcador molecular (SNP XXXIV) para seleccionar a todas las accesiones que tengan características morfológicas del MA, ya que este morfotipo conserva el nucleótido C (Fig 3.15, XXXIV). El SNP XXXV, es una delección en la posición 1320 pb que sólo se presenta en las accesiones del MB, mientras que los MA y MC conservan el nucleótido C (Fig 3.15, XXXV).




BCROM 10						
Secuencia BLYC2		Posición (pb) / (a.a)				
KT359005		1271/364	1272/364	1286/369	1305/375	1320/380
		G / G	G / G	C / R	C / P	C / A
		SNP XXXI	SNP XXXII	SNP XXXIII	SNP XXXIV	SNP XXXV
a)		G / A	- / A	C / A	C / L	C / L
b)		C / G	P / G	C / R	- / L	- / N Y
c)		C / R	G / R	T / W	- / L	C / Q L

Figura 3.15 SNPs significativos obtenidos del fragmento polimórfico BCROM 10 del gen *BoBLYC2*. Se identificaron 5 SNPs significativos asociados a las características fenotípicas de las accesiones de *Bixa orellana* L. Los SNPs que generan cambio de aminoácido están marcados con Negrita y color rojo. a) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MA (plantas con frutos verde y flores blancas). b) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MA (plantas con frutos roji-verdes y flores rosas pálidas). C) SNPs presentados en las accesiones agrupadas en los MC (plantas con frutos rojos y flores rosas-lilas).

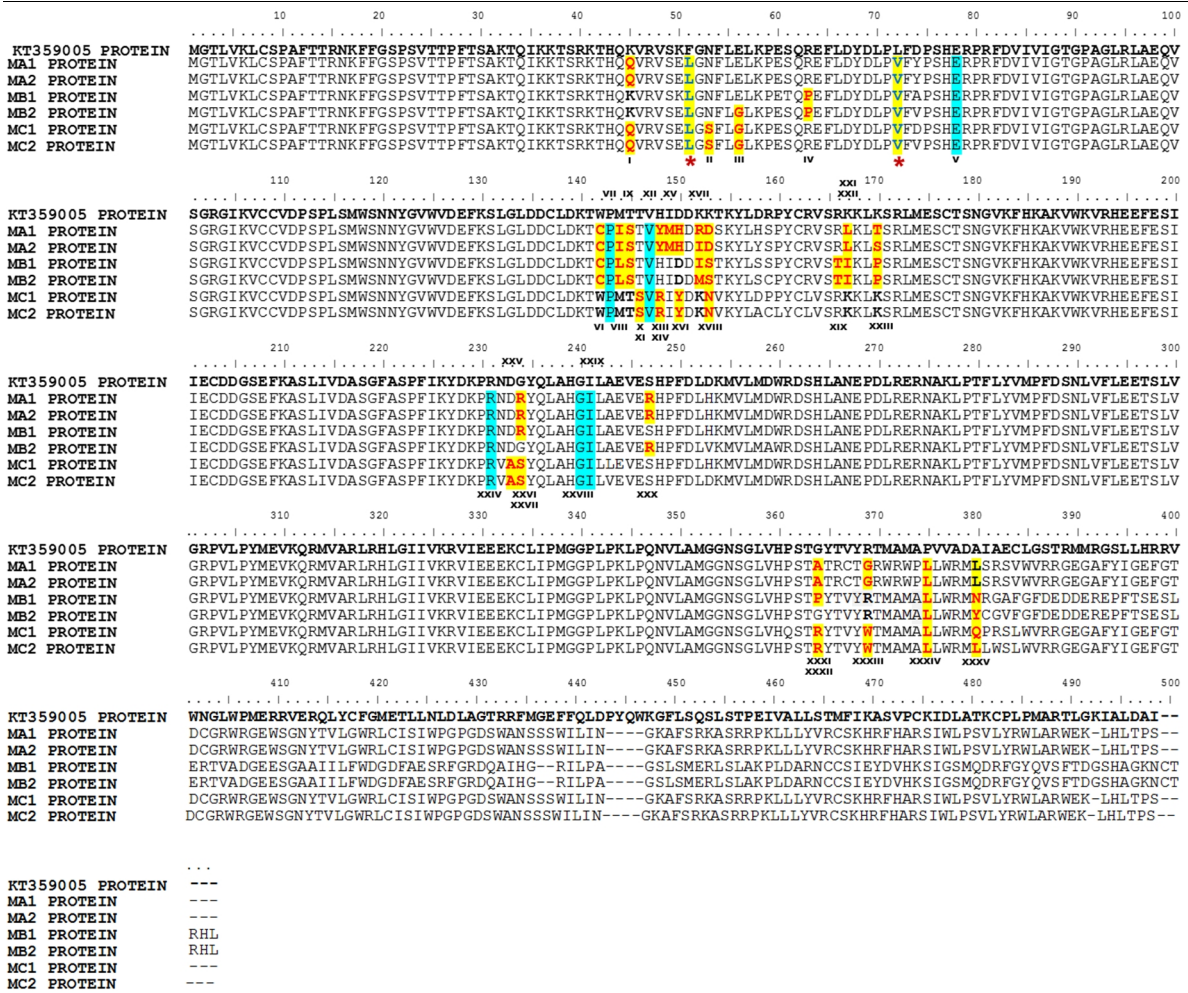


Figura 3.16 Localización de los SNPs significativos en la secuencia de aminoácidos de la proteína BoBLYC2. Los SNPs significativos asociados a las características fenotípicas de las accesiones de *Bixa orellana* L. fueron localizados dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína BoBLYC2 de los 3 morfotipos establecidos en este estudio. Los cambios presenten en los tres morfotipos establecidos, están marcados con Negrita color azul y relleno amarillo. Los SNP que provocan cambios de aminoácidos, fueron marcados con Negrita color rojo y relleno amarillo. Los aminoácidos conservados con la posibilidad de ser utilizado como marcador molecular, están marcados con Negrita. Los SNPs que no provocan cambios de aminoácidos diferentes en cada versión de un morfotipo, están marcados con relleno azul celeste. Alineamiento mediado por CLUSTALW con la matriz BLOSUM62, del programa BioEdit.

2.4 DISCUSIÓN

El desarrollo de la técnica SSCP, mediada por Orita y colaboradores (1989), surgió con la finalidad de observar polimorfismos en una secuencia de DNA de células humanas en donde se pudiesen detectar mutaciones puntuales significativas. Con el paso del tiempo, la técnica SSCP ha sido mejorada, estandarizada y comparada con otras herramientas de biología molecular cuya finalidad sean las detecciones polimórficas, debido a que no necesita grandes concentraciones de muestras y no requiere de equipamientos caros, demostrando ser eficiente (Aranceta *et al.*, 2011; Troggio *et al.*, 2008; Highsmith *et al.*, 1999).

La técnica SSCP ha sido empleada con éxito en la búsqueda de variaciones polimórficas y detecciones de SNPs en diferentes especies de plantas. En la especie *Vitis* spp., se analizaron 12 loci (ESTs) de 6 cultivares de uvas, cuyos resultados fueron 4 variaciones alélicas en donde se detectaron 12 SNPs (Troggio *et al.*, 2008). También en alfalfa (*Medicago sativa*) se pudieron detectar 9 alelos del gen *MsPGIP2* (proteína inhibidora de poligalacturonasa), identificando 18 sitios SNP que pudiesen ser utilizados como marcadores asistidos para el mejoramiento genético de especies autoploiploides (Gui *et al.*, 2014). Recientemente en 2016, Trujillo Hernández y colaboradores han descubierto 2 alelos diferentes del gen *BoBLYC1* de la especie *Bixa orellana* L., detectando 3 sitios SNP como excelentes marcadores moleculares para la selección de plantas con mayor contenido de bixina durante el desarrollo temprano de las plantas de *Bixa orellana* L. En este CAPITULO III, se decidió analizar el gen *BoBLYC2* (asociado a cromoplastos) con la técnica SSCP en 28 accesiones de *Bixa orellana* L. para incrementar el desarrollo de programas de mejoramiento genético de la especie, continuando con la búsqueda de marcadores moleculares que se asocien a los fenotipos con mayor producción del colorante natural bixina. Los experimentos de este estudio dieron como resultado que el gen *BoBLYC2* presenta 4 fragmentos polimórficos, detectándose 35 SNPs significativos. 2 fragmentos que presentaron polimorfismos, BCROM 3 y BCROM 10, corresponden a regiones conservadas entre las secuencias de aminoácidos de las betas licopeno ciclasas en plantas superiores (Alquézar *et al.*, 2009; Arhazem *et al.*, 2009; Cunningham *et al.*, 1996; Hugueney *et al.*, 1995). EL fragmento BCROM3 está situado sobre la región conservada entre las ciclasas, y el fragmento BCROM10 está ubicado sobre el motivo ciclase II y el primer sitio transmembranal (Trujillo Hernández *et al.*, 2016; Cunningham *et al.*, 1996; Hugueney *et al.*, 1995) Los SNPs detectados en estas regiones conservadas podrían estar afectando a la

actividad catalítica de ciclación o, de modificar el plegamiento hacia las membranas de los plastidios (Trujillo Hernández, 2013; Cunningham *et al.*, 1996; Hugueney *et al.*, 1995). Sin embargo, en este estudio, sobresale la detección de SNPs que se asocian con los grupos de plantas con características morfológicas establecidas en este trabajo. 6 SNPs permiten diferenciar a las accesiones del MA (plantas con frutos verde y flores blancas) de los MB y MC. 7 SNPs están asociados específicamente a las características de las accesiones del MB (plantas con frutos roji-verdes y flores rosas pálidas). Y 19 SNPs detectados están asociados a las accesiones del MC (plantas con frutos rojos y flores rosas-lilas) que permiten diferenciarlo de los MA y MB. En otras especies también se han determinado hallazgos en los genes *BLYCs* para mejoramiento genético. En *Citrullus lanatus*, lograron discernir la existencia de un SNP en el ORF del *BLYC*, causante del reemplazo de un aminoácido en una región conservada, provocando una probable alteración en la actividad funcional de la enzima B-LYC (Bang *et al.*, 2007). Con estos datos, Bang y colaboradores desarrollaron un marcador CAPS, siendo un determinante genético para distinguir entre 2 variedades de sandías contrastantes, en una etapa de desarrollo temprano. Un trabajo similar presentó Trujillo Hernández y colaboradores (2016) para el gen *BoBLYC1*, mencionado al principio de este párrafo. En especies como *Crocus sativus*, *Carica papaya* L., *Citrus sinensis* y en un clado de tomate, se ha analizado al gen β *BLYC2*, que esta específicamente asociado a los cromoplastos (tejidos no fotosintéticos). En *Crocus sativus*, analizaron la expresión del gen β *BLYC2*, influyendo potencialmente en la alta acumulación de β -caroteno debido a su alta expresión en los tejidos de los estigmas florales, sugiriendo que este gen *BLYC2* sea un punto de regulación a nivel transcripcional de la carotenogénesis en los tejidos de estigmas florales (Arhazem *et al.*, 2009). La especie *Carica papaya* L., estudiada por Devitt y colaboradores (2009), presenta variedades de plantas que difieren en los contenidos de carotenos en la pulpa de sus frutos. Devitt y colaboradores analizaron el gen *BLYC2*, detectando una inserción de dos T en la secuencia codificante, induciendo a un desplazamiento del marco de lectura de la secuencia, lo que provoca la generación de un codón de paro prematuro. Este hallazgo importante es propuesto para el mejoramiento genético de los frutos de la papaya, ya que influye en la acumulación del compuesto licopeno en las variantes de pulpa roja (Devitt *et al.*, 2009). Alquézar y colaboradores, en el 2009, observaron una expresión específica del gen *CsBLYC2* en tejidos no fotosintéticos de cáscara y pulpa del género *Citrus*, correlacionado con la acumulación de β -xantofilas en naranjas y licopeno en toronjas. En un análisis más profundo, se identificaron 2 alelos del gen *CsBLYC2*, en donde se detectaron 16 sitios SNPs

entre los dos alelos del gen que producen 3 cambios de aminoácidos que pueden alterar la actividad ciclasa de la enzima funcional, es decir, la capacidad de introducir uno o dos anillos en la molécula de licopeno (Alquézar *et al.*, 2009). Recientemente en un estudio evolutivo del gen *BLYC2* en especies de tomate, encontraron varios SNPs y deleciones en la secuencia codificante (identificados en 33 haplotipos de tomates) y en la región promotor (identificados en 44 haplotipos de tomates). 10 SNPs fueron exclusivos para especies de tomate que presentan fenotipos de frutos verdes mientras que una baja diversidad de SNPs están asociados a especies de tomates con accesiones de frutos rojo (Mohan *et al.*, 2016). No obstante, los SNPs asociados a los frutos verdes no tuvieron efecto sobre la función de la proteína; sin embargo, los SNPs asociados a los frutos rojos, causan un cambio de aminoácido que provoca una terminación prematura de la enzima B-LYC, así como cambios de aminoácidos (sustitución de alanina, lisina y arginina por glutamato) en una región altamente conservada, suprimiendo a la actividad catalítica de la enzima B-LYC (Mohan *et al.*, 2016).

Los SNPs detectados en este trabajo, amplían los hallazgos descritos por Trujillo Hernández y colaboradores (2016). La utilización de estos SNPs está enfocado a la generación de marcadores moleculares para la selección de plantas que produzcan una mayor cantidad del compuesto bixina y así poder identificar la producción potencial de bixina en una etapa temprana, considerando que esto representaría una gran ventaja debido a que las plantas de *Bixa orellana* L. exhiben su primera floración hacia los tres años de edad (Rivera Madrid *et al.*, 2006).

CAPÍTULO V**CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS****5.1 CONCLUSIONES**

Los fragmentos genómicos amplificados del gen *BoBLYC2* (expresado en cromoplastos) corresponden a la región codificante (ORF). Para esta especie en particular presenta una ausencia de intrones dentro de la misma.

La técnica SSCP es una opción viable para la detección de polimorfismos en el gen *BoBLYC2* (cromoplastos) de *Bixa orellana* L.

El fragmento polimórfico BCROM 3 se localiza sobre la región conservada entre las ciclasas donde se lleva a cabo la actividad catalítica de ciclación de anillos beta en extremos terminales del licopeno. El fragmento BCROM10 está ubicado sobre el motivo ciclasa II y el primer sitio transmembranal, asociado con el plegamiento hacia las membranas subcelulares de los plastidios.

Se detectaron 35 sitios SNPs que están asociados a tres morfotipos con características morfológicas contrastantes, establecidas a partir de 28 accesiones de *Bixa orellana* L.

Los SNPs V 401G>T, XIV 623C>T, XVI 628A>G, XXI 680A>C, XXIX 901C>A y XXXIV 1305C>DEL, permiten diferenciar a las accesiones del MA (plantas con frutos verde y flores blancas) de los MB y MC.

Los SNPs I 314A, IV 369G>C, XIX 639A>C, XX 678G>C, XXIII 682G>C, XXX 904T y XXXV 1320C>DEL, están asociados específicamente a las características de las accesiones del MB (plantas con frutos roji-verdes y flores rosas pálidas).

Los SNPs II 339A>G, VII 607G, VIII 610G, IX 613G, X 614A, XXII 681A, XVIII 636A, XXIV 690A, XI 618C>G, XII 619G>T, XIII 622C>A, XV 624A>G, XXV 874G>A, XXVI 879A>C, XXVII 881G>T, XXVIII 882G>C, XXXI 920A y XXXIII 1286C>T, están asociados a las accesiones del MC (plantas con frutos rojos y flores rosas-lilas) que permiten diferenciarse de los MA y MB.

5.2 PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se aborda a la generación de marcadores CAPs o marcadores SNPs para programas de mejoramiento genético de *Bixa orellana* L., útiles para la asociación selectiva en etapas tempranas de desarrollo de plantas cuyas características fenotípicas se correlacionan con la acumulación de bixina en sus semillas.

Por otro lado, seguir explorando los genes beta ciclasas, *BoBLYC1* (cloroplastos) y *BoBLYC2* (cromoplastos), nos podría generar nuevas hipótesis acerca de su relación evolutiva, así como la comprensión de la transición celular de los cloroplastos hacia los cromoplastos y su relación en la acumulación del pigmento bixina. Por ello es necesario experimentar con futuros ensayos bioquímicos con las enzimas beta licopeno ciclasas y sus alelos correspondientes, con la finalidad de conocer las interacciones de sus actividades catalíticas que ocurren en el proceso de transformación de un tejido fotosintético a otro no fotosintético. No obstante, los estudios moleculares se pueden realizar paralelamente, en donde aislar las secuencias genómicas completas del gen nos podrían proporcionar mas información del gen *BoBLYC2*, puesto que no presentó intrones en la secuencia ORF mientras en las regiones UTRs se desconoce la presencia o ausencia de intrones, los cuales pueden influir en las interacciones de los empalmes alternativos con el proceso de traducción a la proteína funcional.

Establecer la comparación de genomas de variantes de *Bixa orellana* L. de interés agronómico, nos proveería nuevas investigaciones acerca de su regulación génica, genética y epigenética, pudiéndose detectar SNPs significativos en genes claves de la carotenogénesis, que servirían como herramientas genético moleculares para el fitomejoramiento de esta especie. No obstante, la técnica SSCP es una herramienta en la cuál puede ser requerida para estudiar variaciones alélicas en genes de interés, ya sean involucrados en la biosíntesis de carotenoides, en la síntesis de bixina o en aquellos implicados en la dehiscencia de los frutos de las accesiones de *Bixa orellana* L.

BIBLIOGRAFIA

- Agner, A. R., Barbisan, L. F., Scolastici, C., & Salvadori, D. M. F. (2004). Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. *Food and Chemical Toxicology*, 42(10), 1687-1693.
- Akshatha, V., Giridhar, P., & Ravishankar, G. A. (2011). Morphological diversity in *Bixa orellana* L. and variations in annatto pigment yield. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 86(4), 319-324.
- Allard, R. W. (1999). *Principles of plant breeding*. John Wiley & Sons.
- Alquézar, B., Zacar as, L., & Rodrigo, M. J. (2009). Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene β -cyclase from *Citrus* and its relation to lycopene accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1783-1797.
- Aranceta-Garza, F., Perez-Enriquez, R., & Cruz, P. (2011). PCR-SSCP method for genetic differentiation of canned abalone and commercial gastropods in the Mexican retail market. *Food Control*, 22(7), 1015-1020.
- Arce, J. (1984). Caracterización de 81 plantas de achiote de (*Bixa orellana* L.) de la colección del CATIE procedentes de Honduras, Guatemala, y propagaci n vegetativa por estacas. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, UCR-CATIE. p. 149.
- Asins, M. J. (2002). Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breeding*, 121(4), 281-291.
- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., López, R. C., & Gómez-Gómez, L. (2009). The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors. *Journal of Experimental Botany*, erp283.
- Bang, H., Kim, S., Leskovar, D., & King, S. (2007). Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in lycopene β -cyclase (LCYB) gene. *Molecular Breeding*, 20(1), 63-72.

-
- Bang, H., Yi, G., Kim, S., Leskovar, D., & Patil, B. S. (2014). Watermelon lycopene β -cyclase: promoter characterization leads to the development of a PCR marker for allelic selection. *Euphytica*, 200(3), 363-378.
- Barrera, L. C., & Aliphat, M. (2006). Cacao, vanilla and annatto: Three production and exchange systems in the southern Maya lowlands, XVI-XVII centuries. *Journal of Latin American Geography*, 5(2), 29-52.
- Bassam, B. J., Caetano-Anollés, G., & Gresshoff, P. M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196(1), 80-83.
- Bedolla, C., Sanmartí, Torres, Mingo, Fernández, Boixaderas, De la Rubia, Rodríguez, Pinto, & Gullón (2002). Reproducción. *Biología 2*. Ediciones VICENS VIVES, Barcelona España, 125-129.
- Bian, W., Barsan, C., Egea, I., Purgatto, E., Chervin, C., Zouine, M., ... & Pech, J. C. (2011). Metabolic and molecular events occurring during chromoplast biogenesis. *Journal of Botany*, 2011, 1-13.
- Bin, W., Shengqun, P., Haixing, M., & Lijuan, Y. (2016). SSCP Identifying the Salt-tolerant Mutants of the Processing Tomato Induced by EMS. *Molecular Plant Breeding*, 1, 028.
- Blair, S. y Madrigal B. (2005). Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa pacífica colombiana. Universidad de Antioquia, 94-97.
- Bouvier, F., Dogbo, O., & Camara, B. (2003). Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science*, 300(5628), 2089-2091.
- Brinster, R. L., Allen, J. M., Behringer, R. R., Gelinas, R. E., & Palmiter, R. D. (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(3), 836-840.
- Britton, G., & Young, A. J. (1993). Methods for the isolation and analysis of carotenoids. In *Carotenoids in photosynthesis* (pp. 409-457). Springer Netherlands.
- Brown, T. (2008). *Genomas/Genome*. Ed. Médica Panamericana.

-
- Cabrera, L., Sánchez, J., Cabrera, A. L., & Sánchez, A. H. (2006). Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Elsevier.
- Cai, X. L., Wang, Z. Y., Xing, Y. Y., Zhang, J. L., & Hong, M. M. (1998). Aberrant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5' UTR and decreased expression of waxy gene in rice cultivars of intermediate amylose content. *The Plant Journal*, 14(4), 459-465.
- Cárdenas-Conejo, Y., Carballo-Uicab, V., Lieberman, M., Aguilar-Espinosa, M., Comai, L., & Rivera-Madrid, R. (2015). De novo transcriptome sequencing in *Bixa orellana* L. to identify genes involved in methylerythritol phosphate, carotenoid and bixin biosynthesis. *BMC genomics*, 16(1), 877.
- Caso Barrera, L., & Aliphath, M. (2006). Cacao, Vanilla and Annatto: Three Production and Exchange Systems in the Southern Maya Lowlands, XVI-XVII Centuries. *Journal of Latin American Geography*, 5(2), 29–52.
- Castillo, R., Fernández, J. A., & Gómez-Gómez, L. (2005). Implications of carotenoid biosynthetic genes in apocarotenoid formation during the stigma development of *Crocus sativus* and its closer relatives. *Plant Physiology*, 139(2), 674-689.
- Cazzonelli, C. I. (2011). Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Functional Plant Biology*, 38(11), 833-847.
- Chandrika, U. G., Jansz, E. R., Wickramasinghe, S. M. D., & Warnasuriya, N. D. (2003). Carotenoids in yellow-and red-fleshed papaya (*Carica papaya* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(12), 1279-1282.
- Chiste, R. C., Yamashita, F., Gozzo, F. C., & Mercadante, A. Z. (2011). Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. *Journal of Chromatography A*, 1218(1), 57-63.
- Chung, B. Y., Simons, C., Firth, A. E., Brown, C. M., & Hellens, R. P. (2006). Effect of 5'UTR introns on gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 7(1), 1.

-
- Cleveland, D. A., Daniela, S., & Smith, S. E. (2000). A biological framework for understanding farmers' plant breeding. *Economic Botany*, 54(3), 377-394.
- Correa Navarro, Pedro J. (1999). Principales procesos productivos agrícolas de Yucatán. El Achiote. CRUPY - UACH. Publicación Interna.
- Cubero I. J. (2002). Marcadores y Mapas Genéticos. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. 2ª Edición, Mundi-Prensa, Madrid, 3, 67-100.
- Cunningham, F. X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K. A., DellaPenna, D., & Gantt, E. (1996). Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *The Plant Cell*, 8(9), 1613-1626.
- DellaPenna, D., & Pogson, B. J. (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 711-738.
- de Quirós, A. R. B., & Costa, H. S. (2006). Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2), 97-111.
- De Smet, I., Signora, L., Beeckman, T., Inzé, D., Foyer, C. H., & Zhang, H. (2003). An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 33(3), 543-555.
- Devitt, L. C., Fanning, K., Dietzgen, R. G., & Holton, T. A. (2009). Isolation and functional characterization of a lycopene β -cyclase gene that controls fruit colour of papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 33-39.
- Farooq, S., & Azam, F. (2002). Molecular markers in plant breeding-I: Concepts and characterization. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5(10), 1135-1140.
- Fernández, J. P., Fernández A. M. P., Santos J. H. A. y González J. J. A. (2002). Variación Genética. Genética. 1a Edición, Ariel Ciencia, 295-320.
- Flint-Garcia, S. A., Thuillet, A. C., Yu, J., Pressoir, G., Romero, S. M., Mitchell, S. E., ... & Buckler, E. S. (2005). Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *The Plant Journal*, 44(6), 1054-1064.

-
- Fonnegra, F. G., & Jiménez, J. R. (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquia.
- Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 228-265.
- Galpaz, N., Ronen, G., Khalfa, Z., Zamir, D., & Hirschberg, J. (2006). A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus. *The Plant Cell*, 18(8), 1947-1960.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3784-3788.
- Giuliano, G., Rosati, C., & Bramley, P. M. (2003). To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. *TRENDS in Biotechnology*, 21(12), 513-516.
- Gomez-Ortiz, N. M., Vázquez-Maldonado, I. A., Pérez-Espadas, A. R., Mena-Rejón, G. J., Azamar-Barrios, J. A., & Oskam, G. (2010). Dye-sensitized solar cells with natural dyes extracted from achiote seeds. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 94(1), 40-44.
- Goodwin, T. (2012). *The biochemistry of the carotenoids: volume I plants*. Springer Science & Business Media.
- Goszczynski, D. E., & Jooste, A. E. C. (2015). The application of single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for the analysis of molecular heterogeneity of grapevine virus A. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 41(2), 77.
- Gui, Z., Liu, H., Wang, Y., Yuan, Q., Xin, N., Zhang, X., ... & Gao, J. (2014). Detection of the genetic variation of polygalacturonase-inhibiting protein gene 2 in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using an improved SSCP technique. *Genetics and Molecular Research*, 13, 10184-10193.
- Gupta, P. K., Roy, J. K., & Prasad, M. (2001). Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Curr Sci*, 80(4), 524-535.

-
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series. 41(41), 95-98.
- Hanson, L., McMahon, K. A., Johnson, M. A., & Bennett, M. D. (2001). First nuclear DNA C-values for another 25 angiosperm families. *Annals of Botany*, 88(5), 851-858.
- Harjes, C. E., Rocheford, T. R., Bai, L., Brutnell, T. P., Kandianis, C. B., Sowinski, S. G., ... & Yan, J. (2008). Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science*, 319(5861), 330-333.
- Hayashi, K. (1991). PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *Genome Research*, 1(1), 34-38.
- Highsmith, W. E., Nataraj, A. J., Jin, Q., O'Connor, J. M., El-Nabi, S. H., Kusukawa, N., & Garner, M. M. (1999). Use of DNA toolbox for the characterization of mutation scanning methods. II: Evaluation of single-strand conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis*, 20(6), 1195-1203.
- Huguene, P., Badillo, A., Chen, H. C., Klein, A., Hirschberg, J., Camara, B., & Kuntz, M. (1995). Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *The Plant Journal*, 8(3), 417-424.
- Jako, C., Coutu, C., Roewer, I., Reed, D. W., Pelcher, L. E., & Covello, P. S. (2002). Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* L. (*Bixaceae*) through expressed sequence tag analysis. *Plant Science*, 163(1), 141-145.
- JECFA (2003). Evaluation of certain food additives and contaminants. Sixty-first meeting Report of the joint FAP/WHO expert committee on food additives. Technical Report Series. 683.
- Kujur, A., Bajaj, D., Upadhyaya, H. D., Das, S., Ranjan, R., Shree, T., ... & Gowda, C. L. L. (2015). Employing genome-wide SNP discovery and genotyping strategy to extrapolate the natural allelic diversity and domestication patterns in chickpea. *Frontiers in Plant Science*, 6, 162.

-
- Kumaran, K. (2014). Production potential of annatto (*Bixa orellana* L.) as a source of natural edible dye. Invited lecture presented in the International Workshop on Natural Dyes March 5-7 2014 at Hyderabad (www.iwnd2014.com)
- Kumar, G. R., Sakthivel, K., Sundaram, R. M., Neeraja, C. N., Balachandran, S. M., Rani, N. S., ... & Madhav, M. S. (2010). Allele mining in crops: prospects and potentials. *Biotechnology Advances*, 28(4), 451-461.
- Leal, F., & de Clavijo, C. M. (2010a). ACERCA DE LA HISTORIA, TAXONOMÍA, BOTÁNICA Y USOS DE *Bixa orellana* L. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*, 28.
- Leal, F., & Clavijo, C. M. (2010b). Annatto: A natural dye from the tropics. *Chronica Horticulturae*, 50(3), 34-36.
- León, J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales*. 3 ra ed. Editorial IICA. Costa Rica.
- Li, F., Vallabhaneni, R., & Wurtzel, E. T. (2008). PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiology*, 146(3), 1333-1345.
- Liu, Z. J., & Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238(1), 1-37.
- Lombello, R. A., & Pinto-Maglio, C. A. F. (2014). Cytogenetics and Reproductive Biology of *Bixa orellana* L. (*Bixaceae*). *Cytologia*, 79(3), 379-386.
- Luque, J (2006). *Diversidad del genoma: polimorfismo*. *Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*. ELSIEVER, Madrid, 26, 365-377.
- Madrigal, B. (2005). *Plantas antimaláricas de Tumaco: costa pacífica colombiana*. Universidad de Antioquía.
- Martín-Rodríguez M. E. (2010). *Uso de Genes Involucrados en la Síntesis de Carotenoides como Marcadores Moleculares de Pigmentos en Achiote*, Tesis de Maestría en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), 32-73.

-
- Mercadante, A. Z., Steck, A., Rodriguez-Amaya, D., Pfander, H., & Britton, G. (1996). Isolation of methyl 9' Z-apo-6'-lycopenoate from *Bixa orellana* L. *Phytochemistry*, 41(4), 1201-1203.
- Moreira, P. A., Lins, J., Dequigiovanni, G., Veasey, E. A., & Clement, C. R. (2015). The domestication of annatto (*Bixa orellana* L.) from *Bixa urucurana* in Amazonia. *Economic Botany*, 69(2), 127-135.
- Mohan, V., Pandey, A., Sreelakshmi, Y., & Sharma, R. (2016). Neofunctionalization of Chromoplast Specific Lycopene Beta Cyclase Gene (CYC-B) in Tomato Clade. *PloS one*, 11(4), e0153333.
- Nambara, E., & Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, 165-185.
- Niyogi, K. K. (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 333-359.
- Nott, A., Le Hir, H., & Moore, M. J. (2004). Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes & Development*, 18(2), 210-222.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., & Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8), 2766-2770.
- Park, H., Kreunen, S. S., Cuttriss, A. J., DellaPenna, D., & Pogson, B. J. (2002). Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. *The Plant Cell*, 14(2), 321-332.
- Patiño, V. (1964). *Plantas cultivadas y animales domésticos en América equinoccial*. Colombia, Imp. Departamental.
- Pittier, H. (1978). *Plantas Usuales de Costa Rica*. Ed. Costa Rica. Costa Rica. 330 p.

-
- Preston, H. D., & Rickard, M. D. (1980). Extraction and chemistry of annatto. *Food Chemistry*, 5(1), 47-56.
- 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., Escobedo-Gm, R. M., Balam-Galera, E., Vera-Ku, M., & Harries, H. (2006). Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). *Scientia Horticulturae*, 109(2), 165-172.
- Rizza, F., Karsai, I., Morcia, C., Badeck, F. W., Terzi, V., Pagani, D., ... & Stanca, A. M. (2016). Association between the allele compositions of major plant developmental genes and frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) germplasm of different origin. *Molecular Breeding*, 36(11), 156.
- Rodrigues, L. M., Alcazar-Alay, S. C., Petenate, A. J., & Meireles, M. A. A. (2014). Bixin extraction from defatted annatto seeds. *Comptes Rendus Chimie*, 17(3), 268-283.
- Satyanarayana, A., Prabhakara Rao, P. G., & Rao, D. G. (2003). Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). *Journal of food Science and Technology*, 40(2), 131-141.
- Schwartz, S. H., Tan, B. C., McCarty, D. R., Welch, W., & Zeevaart, J. A. (2003). Substrate specificity and kinetics for VP14, a carotenoid cleavage dioxygenase in the ABA biosynthetic pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1619(1), 9-14.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Cierre de la producción agrícola por cultivo, 2015. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
- Shuhama, I. K., Aguiar, M. L., Oliveira, W. P., & Freitas, L. A. P. (2003). Experimental production of annatto powders in spouted bed dryer. *Journal of Food Engineering*, 59(1), 93-97.

-
- Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y Agricultura (SINAREFI). 2015. http://www.sinarefi.org.mx/redes/red_achiote.html&gws_rd=cr&ei=RhRHVZ-6Os7IsAS494DICg
- Siva, R., Doss, F. P., Kundu, K., Satyanarayana, V. S. V., & Kumar, V. (2010). Molecular characterization of bixin—An important industrial product. *Industrial Crops and Products*, 32(1), 48-53.
- Solari, A. J. (2007). *Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina*. Ed. Médica Panamericana.
- Tian, L., Musetti, V., Kim, J., Magallanes-Lundback, M., & DellaPenna, D. (2004). The *Arabidopsis* LUT1 locus encodes a member of the cytochrome P450 family that is required for carotenoid ϵ -ring hydroxylation activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(1), 402-407.
- Torrades, S. A. N. D. R. A. (2002). Diversidad del genoma humano: los polimorfismos. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 21(5), 122-126.
- Troggio, M. I. C. H. E. L. A., Malacarne, G., Vezzulli, S. I. L. V. I. A., Faes, G. I. O. R. G. I. A., Salmaso, M. A. R. Z. I. A., & Velasco, R. I. C. C. A. R. D. O. (2008). Comparison of different methods for SNP detection in grapevine. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 47(1), 21.
- Trujillo Hernández, J. A. (2013). Caracterización de la variación alélica en genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides de *Bixa orellana* L. Directora: Renata Rivera Madrid. Tesis de Maestría inédita. Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. (CICY) Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP), Mérida, Yuc., Mx., 2013.
- Trujillo-Hdz, J. A., Cárdenas-Conejo, Y., Turriza, P. E., Aguilar-Espinosa, M., Carballo-Uicab, V., Garza-Caligaris, L. E., ... & Rivera-Madrid, R. (2016). Functional polymorphism in lycopene beta-cyclase gene as a molecular marker to predict bixin production in *Bixa orellana* L.(achiote). *Molecular Breeding*, 36(9), 135.

-
- Valdez-Ojeda, R., Quiros, C. F., de Lourdes Aguilar-Espinosa, M., & Rivera-Madrid, R. (2010). Outcrossing rates in annatto determined by sequence-related amplified polymorphism. *Agronomy Journal*, 102(5), 1340-1345.
- Vázquez de Agredos Pascual, M. L., Batista dos Santos, A. F., & Yusa Marco, D. J. (2010). Annatto in America and Europe. Tradition, treatises and elaboration of an ancient colour. In *Arché* (No. 4-5, pp. 97-102). Instituto Universitario de Restauración del Patrimonio de la UPV.
- Vishnevetsky, M., Ovadis, M., & Vainstein, A. (1999). Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends in Plant Science*, 4(6), 232-235.
- Walter, M. H., & Strack, D. (2011). Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Natural Product Reports*, 28(4), 663-692.
- Welsch, R., Wüst, F., Bär, C., Al-Babili, S., & Beyer, P. (2008). A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiology*, 147(1), 367-380.
- Wiegand, H. L., Lu, S., & Cullen, B. R. (2003). Exon junction complexes mediate the enhancing effect of splicing on mRNA expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11327-11332.
- World Health Organization. WHO Food Additives Series: 52. Annatto Extracts. (2006). 1-29.
- Yamamoto, H. (1964). Differences in carotenoid composition between red-and yellow-fleshed papaya. *Nature*, 201, 1049-1050.
- Zechmeister, L. (2014). Cis-trans isomeric carotenoids, vitamins A and arylpolyenes. First Part: Isoprenic Polyenes. *Carotenoids: Introduction*. Elsevier, 3-7.
- Zhu, C., Bai, C., Sanahuja, G., Yuan, D., Farré, G., Naqvi, S., ... & Christou, P. (2010). The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 504(1), 132-141.

ANEXOS

```

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
KT35905 ORF ATGGGAACCTCGTCAAGTTATGTTCCACGGCTTTTACAACCAAGGAACAAATTTTTTGGTTCACCCTCAGTACCACCTCCATTACTTCTGCAAAAAACC
BLYC2-1 ATGGGAACCTCGTCAAGTTATGTTCCACGGCTTTTACAACCAAGGAACAAATTTTTTGGTTCACCCTCAGTACCACCTCCATTACTTCTGCAAAAAACC
BLYC2-2 ATGGGAACCTCGTCAAGTTATGTTCCACGGCTTTTACAACCAAGGAACAAATTTTTTGGTTCACCCTCAGTACCACCTCCATTACTTCTGCAAAAAACC
BLYC2-3 ATGGGAACCTCGTCAAGTTATGTTCCACGGCTTTTACAACCAAGGAACAAATTTTTTGGTTCACCCTCAGTACCACCTCCATTACTTCTGCAAAAAACC

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
KT35905 ORF CAGATCAAGAAGACCTCAAGGAAGACTCATCAGAAGTCAGAGTCAGCAAAATTTGGAACTTCTGGAATTGAAGCCAGAGTCACAGCGGGAGTCTTTGG
BLYC2-1 CAGATCAAGAAGACCTCAAGGAAGACTCATCAGAAGTCAGAGTCAGCAAAATTTGGAACTTCTGGAATTGAAGCCAGAGTCACAGCGGGAGTCTTTGG
BLYC2-2 CAGATCAAGAAGACCTCAAGGAAGACTCATCAGAAGTCAGAGTCAGCAAAATTTGGAACTTCTGGAATTGAAGCCAGAGTCACAGCGGGAGTCTTTGG
BLYC2-3 CAGATCAAGAAGACCTCAAGGAAGACTCATCAGAAGTCAGAGTCAGCAAAATTTGGAACTTCTGGAATTGAAGCCAGAGTCACAGCGGGAGTCTTTGG

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
KT35905 ORF ATTATGATCTGCCTTTGTTTATCCATCCCATGAGCGGCCTCGCTTTGATGTGATCGTATCGGCACCAGGCTCCCGTCTCGCCGAGCAAGT
BLYC2-1 ATTATGATCTGCCTTTGTTTATCCATCCCATGAGCGGCCTCGCTTTGATGTGATCGTATCGGCACCAGGCTCCCGTCTCGCCGAGCAAGT
BLYC2-2 ATTATGATCTGCCTTTGTTTATCCATCCCATGAGCGGCCTCGCTTTGATGTGATCGTATCGGCACCAGGCTCCCGTCTCGCCGAGCAAGT
BLYC2-3 ATTATGATCTGCCTTTGTTTATCCATCCCATGAGCGGCCTCGCTTTGATGTGATCGTATCGGCACCAGGCTCCCGTCTCGCCGAGCAAGT

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
KT35905 ORF TTCTGGCCGTGGAATCAAGGTATGTTGCGTCGATCCCTACCACCTTCCATGTGGTCTAACAAATATGGTGTCTGGGTAGATGAGTTCAGAGCTTTGGGG
BLYC2-1 TTCTGGCCGTGGAATCAAGGTATGTTGCGTCGATCCCTACCACCTTCCATGTGGTCTAACAAATATGGTGTCTGGGTAGATGAGTTCAGAGCTTTGGGG
BLYC2-2 TTCTGGCCGTGGAATCAAGGTATGTTGCGTCGATCCCTACCACCTTCCATGTGGTCTAACAAATATGGTGTCTGGGTAGATGAGTTCAGAGCTTTGGGG
BLYC2-3 TTCTGGCCGTGGAATCAAGGTATGTTGCGTCGATCCCTACCACCTTCCATGTGGTCTAACAAATATGGTGTCTGGGTAGATGAGTTCAGAGCTTTGGGG

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
KT35905 ORF CTCGATGATGTTTGGACAAGACATGGCCGATGACTACGGTCCATATAGATGATAAAAAAACCAAAATATCTGGACCGCCGACTCTCGTGTTCAGTAGAA
BLYC2-1 CTCGATGATGTTTGGACAAGACATGGCCGATGACTACGGTCCATATAGATGATAAAAAAACCAAAATATCTGGACCGCCGACTCTCGTGTTCAGTAGAA
BLYC2-2 CTCGATGATGTTTGGACAAGACATGGCCGATGACTACGGTCCATATAGATGATAAAAAAACCAAAATATCTGGACCGCCGACTCTCGTGTTCAGTAGAA
BLYC2-3 CTCGATGATGTTTGGACAAGACATGGCCGATGACTACGGTCCATATAGATGATAAAAAAACCAAAATATCTGGACCGCCGACTCTCGTGTTCAGTAGAA

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
KT35905 ORF AGAAGCTCAAGTCTAGATTAATGGAGTCCTGCACGTGCAACGGAGTTAAGTTCATAAAGCCAAAGTTTGGAAAGTGAGACACGAAGAATTTGAGTCCAT
BLYC2-1 AGAAGCTCAAGTCTAGATTAATGGAGTCCTGCACGTGCAACGGAGTTAAGTTCATAAAGCCAAAGTTTGGAAAGTGAGACACGAAGAATTTGAGTCCAT
BLYC2-2 AGAAGCTCAAGTCTAGATTAATGGAGTCCTGCACGTGCAACGGAGTTAAGTTCATAAAGCCAAAGTTTGGAAAGTGAGACACGAAGAATTTGAGTCCAT
BLYC2-3 AGAAGCTCAAGTCTAGATTAATGGAGTCCTGCACGTGCAACGGAGTTAAGTTCATAAAGCCAAAGTTTGGAAAGTGAGACACGAAGAATTTGAGTCCAT

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
KT35905 ORF AATCGAGTGTGACGATGGGAGTGAGTTC AAGGCCAGCTTGATCGTCGATGCGAGTGGATTTCGCAAGCCCTTTCATAAAATACGATAAGCCTCGGAACGAT
BLYC2-1 AATCGAGTGTGACGATGGGAGTGAGTTC AAGGCCAGCTTGATCGTCGATGCGAGTGGATTTCGCAAGCCCTTTCATAAAATACGATAAGCCTCGGAACGAT
BLYC2-2 AATCGAGTGTGACGATGGGAGTGAGTTC AAGGCCAGCTTGATCGTCGATGCGAGTGGATTTCGCAAGCCCTTTCATAAAATACGATAAGCCTCGGAACGAT
BLYC2-3 AATCGAGTGTGACGATGGGAGTGAGTTC AAGGCCAGCTTGATCGTCGATGCGAGTGGATTTCGCAAGCCCTTTCATAAAATACGATAAGCCTCGGAACGAT

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
KT35905 ORF GGGTATCAACTCGCCCATGGCATTCTGGCTGAAGTAGAAAGCCATCCCTTCGATTGGACAAGATGGTTCCTATGGATTGGAGAGATTCCCAATTTGGCAA
BLYC2-1 GGGTATCAACTCGCCCATGGCATTCTGGCTGAAGTAGAAAGCCATCCCTTCGATTGGACAAGATGGTTCCTATGGATTGGAGAGATTCCCAATTTGGCAA
BLYC2-2 GGGTATCAACTCGCCCATGGCATTCTGGCTGAAGTAGAAAGCCATCCCTTCGATTGGACAAGATGGTTCCTATGGATTGGAGAGATTCCCAATTTGGCAA
BLYC2-3 GGGTATCAACTCGCCCATGGCATTCTGGCTGAAGTAGAAAGCCATCCCTTCGATTGGACAAGATGGTTCCTATGGATTGGAGAGATTCCCAATTTGGCAA

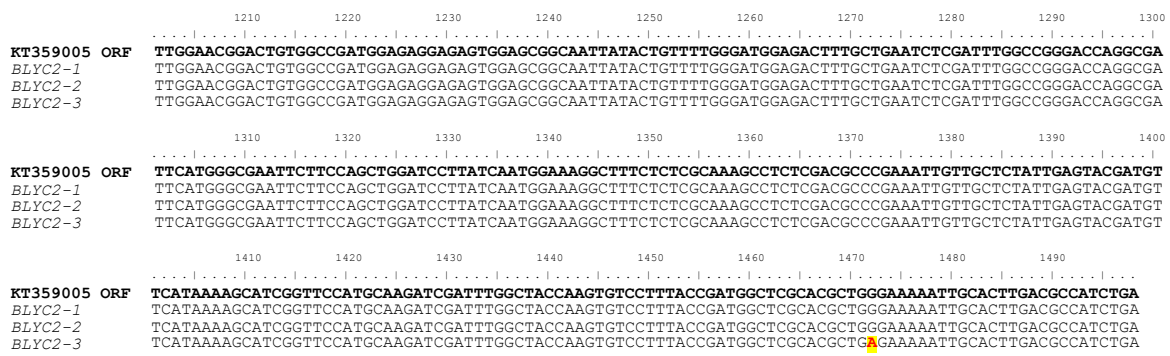
810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
KT35905 ORF ATGAGCCTGACTTACGGCAACGAAACGCAAAGCTCCCAACTTTTCTCTATGTAATGCCATTTCGATTTCGAATTTGGTGTCTTCTGGAAGAACTTCTCTGGT
BLYC2-1 ATGAGCCTGACTTACGGCAACGAAACGCAAAGCTCCCAACTTTTCTCTATGTAATGCCATTTCGATTTCGAATTTGGTGTCTTCTGGAAGAACTTCTCTGGT
BLYC2-2 ATGAGCCTGACTTACGGCAACGAAACGCAAAGCTCCCAACTTTTCTCTATGTAATGCCATTTCGATTTCGAATTTGGTGTCTTCTGGAAGAACTTCTCTGGT
BLYC2-3 ATGAGCCTGACTTACGGCAACGAAACGCAAAGCTCCCAACTTTTCTCTATGTAATGCCATTTCGATTTCGAATTTGGTGTCTTCTGGAAGAACTTCTCTGGT

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
KT35905 ORF CGGTCGACCCGTTCTGCCGTACATGGAGGTGAAACAGAGGATGGTGGCGAGGCTGAGGCATTAGGAATCATAGTGAAGAGAGTGATAGAAGAAGAAAA
BLYC2-1 CGGTCGACCCGTTCTGCCGTACATGGAGGTGAAACAGAGGATGGTGGCGAGGCTGAGGCATTAGGAATCATAGTGAAGAGAGTGATAGAAGAAGAAAA
BLYC2-2 CGGTCGACCCGTTCTGCCGTACATGGAGGTGAAACAGAGGATGGTGGCGAGGCTGAGGCATTAGGAATCATAGTGAAGAGAGTGATAGAAGAAGAAAA
BLYC2-3 CGGTCGACCCGTTCTGCCGTACATGGAGGTGAAACAGAGGATGGTGGCGAGGCTGAGGCATTAGGAATCATAGTGAAGAGAGTGATAGAAGAAGAAAA

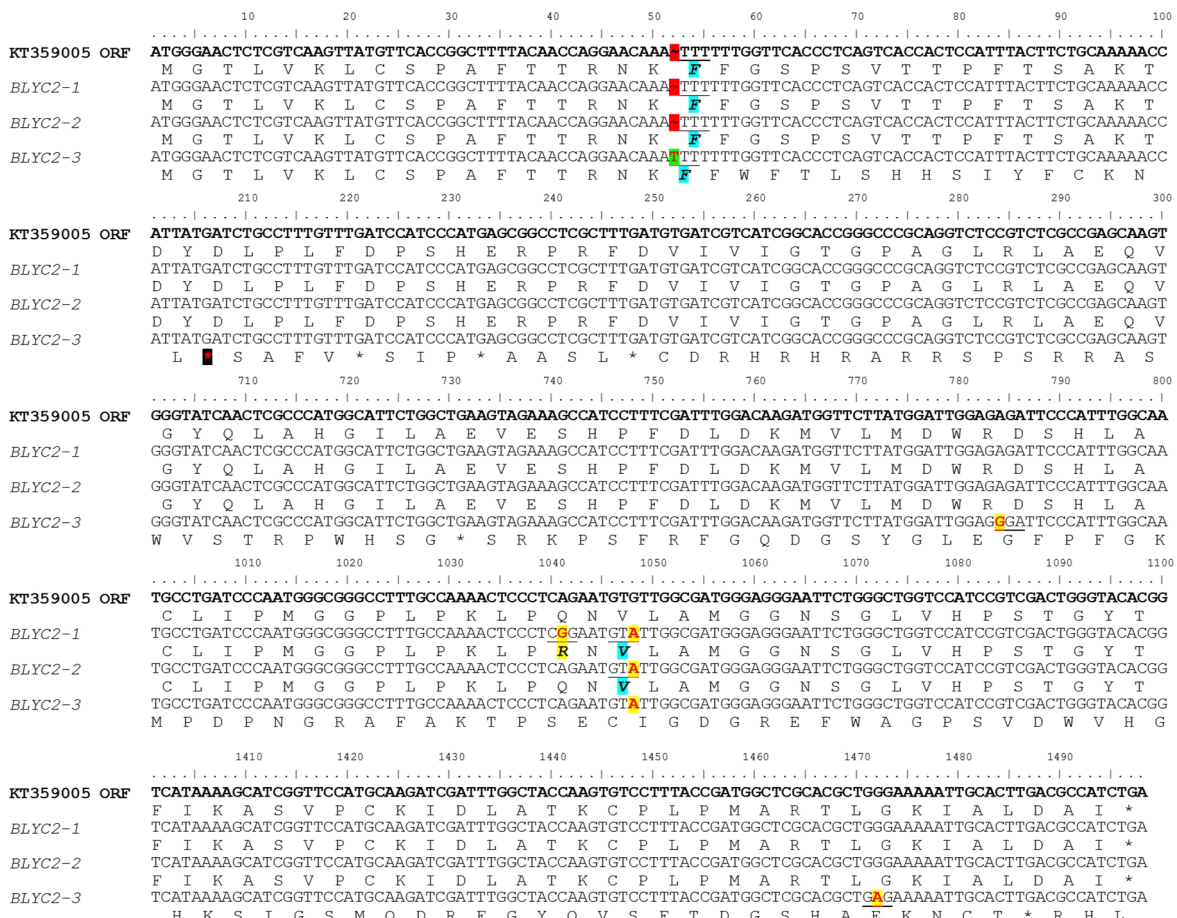
1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
KT35905 ORF TGCCGTATCCCAATGGGCGGGCCTTTGCCAAACCTCCCTCAGAATGTGTTGGCGATGGGAGGGAATTTGGGCTGGTCCATCCGTCGACTGGGTACACGG
BLYC2-1 TGCCGTATCCCAATGGGCGGGCCTTTGCCAAACCTCCCTCAGAATGTGTTGGCGATGGGAGGGAATTTGGGCTGGTCCATCCGTCGACTGGGTACACGG
BLYC2-2 TGCCGTATCCCAATGGGCGGGCCTTTGCCAAACCTCCCTCAGAATGTGTTGGCGATGGGAGGGAATTTGGGCTGGTCCATCCGTCGACTGGGTACACGG
BLYC2-3 TGCCGTATCCCAATGGGCGGGCCTTTGCCAAACCTCCCTCAGAATGTGTTGGCGATGGGAGGGAATTTGGGCTGGTCCATCCGTCGACTGGGTACACGG

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
KT35905 ORF TGTACCCGACGATGGCGATGGCCCTGTTGTGGCGGATGCTATTGCGGAGTGTTTGGGTTTCGACGAGGATGATGAGAGGGAGCCTTTTACATCGGAGAGT
BLYC2-1 TGTACCCGACGATGGCGATGGCCCTGTTGTGGCGGATGCTATTGCGGAGTGTTTGGGTTTCGACGAGGATGATGAGAGGGAGCCTTTTACATCGGAGAGT
BLYC2-2 TGTACCCGACGATGGCGATGGCCCTGTTGTGGCGGATGCTATTGCGGAGTGTTTGGGTTTCGACGAGGATGATGAGAGGGAGCCTTTTACATCGGAGAGT
BLYC2-3 TGTACCCGACGATGGCGATGGCCCTGTTGTGGCGGATGCTATTGCGGAGTGTTTGGGTTTCGACGAGGATGATGAGAGGGAGCCTTTTACATCGGAGAGT

```



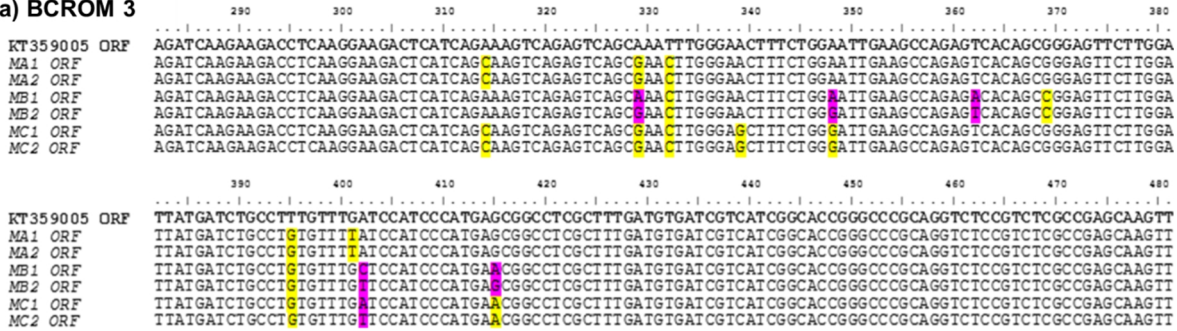
FiguraS 2.1 Alineamiento contra la secuencia de referencia KT359005 del ORF putativo del gen *BoBLYC2* de los 3 morfotipos caracterizados de *Bixa orellana* L. Los cambios puntales (SNPs) detectados por secuenciación, están marcados con relleno amarillo y fuente color rojo. Las inserciones de nucleótidos detectados por secuenciación, están marcadas con relleno verde y fuente color rojo. Alineamiento mediante el algoritmo CLUSTALW implementado en el programa BioEdit.



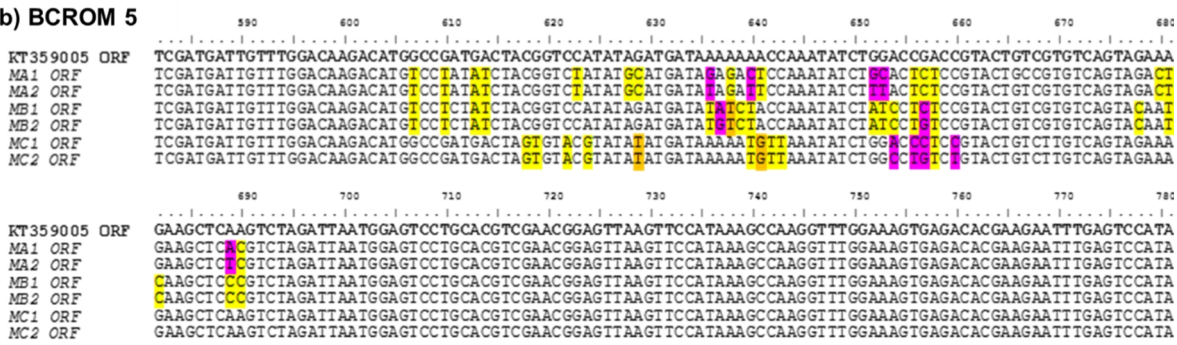
FiguraS 2.2 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína *BoBLYC2* de los 3 morfotipos caracterizados de *Bixa orellana* L. Los cambios

puntuales que provocan un cambio de aminoácido, están marcados con relleno amarillo y fuente color rojo. Los cambios puntuales que no provocan un cambio de aminoácido, están marcados con relleno azul celeste y fuente color rojo. Alineamiento mediado por CLUSTALW con la matriz BLOSUM 62, del programa BioEdit.

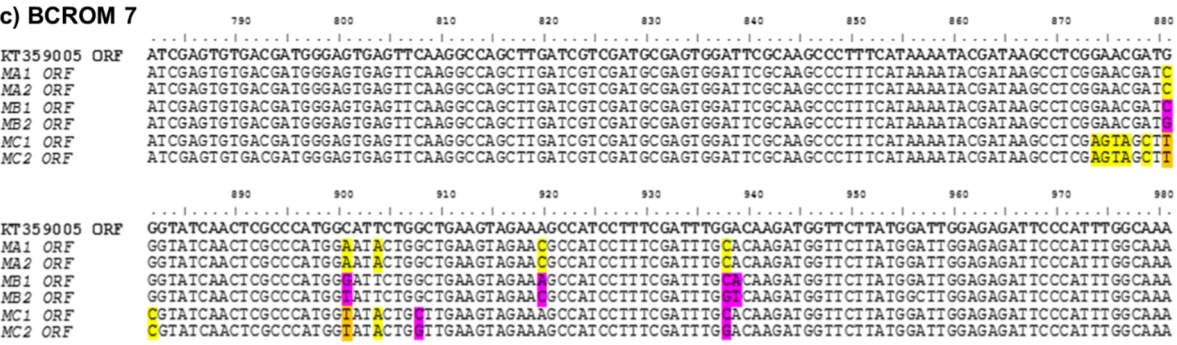
a) BCROM 3



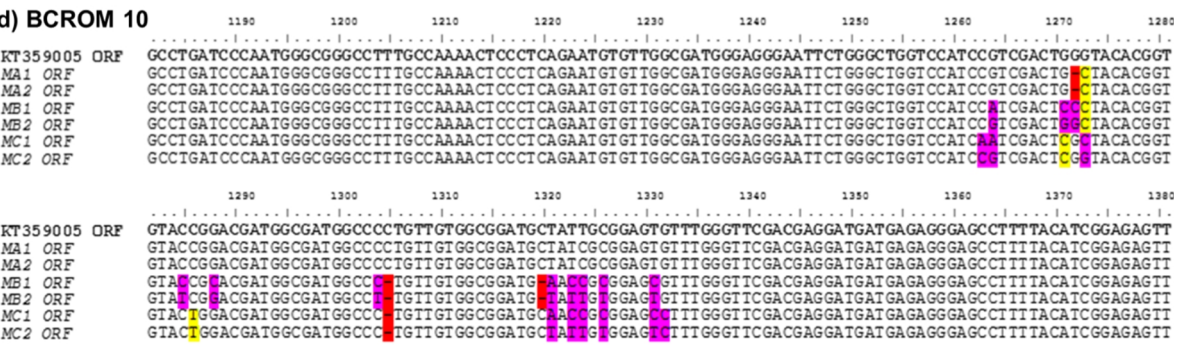
b) BCROM 5



c) BCROM 7



d) BCROM 10



FiguraS 3.1 Localización de los SNPs significativos en 4 fragmentos polimórficos obtenidos del gen *BoBLYC2*. 35 SNPs significativos asociados a las características fenotípicas de las accesiones de *Bixa orellana* L. fueron localizados dentro de las regiones ORF del gen *BoBLYC2* de los 3 morfotipos establecidos en este estudio. a) fragmento BCROM 3. c) El fragmento BCROM 7. d) El fragmento BCROM 10. Los SNP que fueron marcados con relleno amarillo, son aquellos que se presentan en las dos versiones de cada morfotipo; los marcados con relleno púrpura, son aquellos que presentan cambios diferentes en cada versión de un morfotipo; y los marcados con relleno rojo, son las deleciones que se presentaron en dichas posiciones. Alineamiento mediante el algoritmo CLUSTALW implementado en el programa BioEdit