

**POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE
PLANTAS**

**Análisis de la expresión de genes
involucrados en la biosíntesis de
carotenoides y bixina en *Bixa orellana* L.**

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias
presenta:

BIOL. NORMA LAURA RODRÍGUEZ ÁVILA

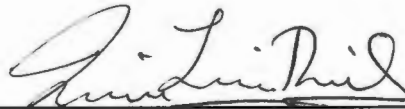
Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

**Mérida, Yucatán, México
2010**



Declaración de Propiedad

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



Norma Laura Rodríguez Ávila

**CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**



CICY

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Análisis de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides y bixina en *Bixa orellana* L.", fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biotecnología de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del (los) Dres. Renata Rivera Madrid y José Alberto Narváez Zapata, dentro de la Opción Biología Experimental, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,



Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela
Director Académico

DEDICATORIA

A quienes siempre han estado a mi lado, como una base sólida de apoyo en cada proyecto personal y profesional; brindándome palabras de aliento a cada momento; poniendo su hombro para que yo descanse y para que tome nuevos impulsos y por sobre todo, demostrándome que el amor que se tiene por un hijo, es invaluable e inquebrantable. A mis padres, Juan y Norma.

A una gran consejera, a quién le debo en mucho, ser la profesionista que ahora soy pues siempre alentó en mí, la importancia de la perseverancia y la paciencia en cada proyecto emprendido. A la Dra. Renata Rivera Madrid, un sentido agradecimiento.

A un gran guía que me ha acompañado desde hace muchos años por este camino del estudio y de la investigación y al que además agradezco su amistad sincera. Por tantas experiencias vividas y compartidas, horas de desvelo y temas para platicar que nunca terminan. ¡Gracias! Dr. José Alberto Narváez Zapata.

A mi compañera y gran amiga, apoyo invaluable en este difícil camino, por estar siempre a mi lado, brindarme sus experiencias y abrirme las puertas de su casa y su corazón. M. en C. Margarita Aguilar Espinosa ¡gracias por todo!

A quienes me acompañaron en esta gran aventura que fue el estudio del posgrado y que día con día me compartieron de su conocimiento, risas, llanto, un sinfín de experiencias y hermosos recuerdos. A ustedes, mis compañeros del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

A los porristas incansables en el largo trayecto de mi carrera como profesionista y como mujer, porque nunca me han dejado sola y sé que sin importar la fecha, la hora o el lugar, estarán siempre conmigo. Mis hermanos: Roxana y Octavio y mis tías Lulú y Esperanza, ¡los quiero mucho!

A ti, que desde que te conocí, te convertiste en parte esencial de mi ser, mi complemento. Tu apoyo inquebrantable y tu luz, iluminan mi vida día con día. Gracias por existir, gracias por estar siempre para mí. A mi futuro esposo ante Dios y ante los hombres, con todo mi amor: Roberto Castañeda Cortés.

Índice de Contenido

Resumen	XVII
Abstract	XX
Introducción general	1
Capítulo I	
1.1 Antecedentes Generales	5
1.1.1 <i>Bixa orellana</i> L.	5
1.1.2 DESCRIPCIÓN	5
1.1.3 LA BIXINA	7
1.1.3.1 USOS E IMPORTANCIA	7
1.1.3.2 DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS	7
1.1.4 ISOPRENOIDES	8
1.1.4.1 RUTAS DE BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES	9
1.1.5 CAROTENOIDES	17
1.1.5.1 DEFINICIÓN E IMPORTANCIA	17
1.1.5.2 PLASTIDIOS	17
1.1.5.3 RUTA DE SÍNTESIS	18
1.1.5.4 EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN CAROTENOGÉNESIS	21
1.1.6 APOCAROTENOIDES	22
1.1.7 BASES GENÉTICO-MOLECULARES DE LA BIOSÍNTESIS DE LA BIXINA	23
1.1.8 ENZIMAS Y GENES SELECCIONADOS EN ESTE ESTUDIO	26
1.2 Justificación	29
1.3 Hipótesis	31
1.4 Objetivos	33
1.4.1 OBJETIVO GENERAL	33
1.4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	33
1.5 Materiales y Métodos Generales	37
1.5.1 MATERIAL VEGETAL	37
1.5.2 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	38
1.5.3 OBTENCIÓN DE SONDAS MOLECULARES PARA LOS GENES INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE LA BIXINA	38
1.5.4 EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL	40
1.5.4.1 CUANTIFICACIÓN DEL ARN TOTAL	40

1.5.4.2	TRATAMIENTO CON <i>DNasa</i> I	40
1.5.4.3	SÍNTESIS DEL ADNc	40
1.5.5	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN POR RT-PCR	41
1.5.6	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN POR NORTHERN BLOT	41
1.5.7	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN POR RT-PCR <i>IN</i> <i>SITU</i>	41
1.5.8	CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS POR HPLC	43
1.5.9	CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	43
1.6	Referencias	44

Capítulo II: Regulation of pigment-related genes during flower and fruit development of *Bixa orellana*

Artículo publicado en *Plant Molecular Biology Reporter*. Por: Rodríguez-Ávila N.L., Narváez-Zapata J.A., Aguilar-Espinosa ML. and Rivera-Madrid R

2.1	Abstract	54
2.2	Keywords	54
2.3	Introduction	54
2.4	Materials and Methods	57
2.4.1	PLANT MATERIAL	57
2.4.2	ANALYSIS OF TOTAL CAROTENES, CHLOROPHYLL <i>a</i> AND ABA	57
2.4.3	ISOLATION OF CAROTENOID-RELATED PROBES	58
2.4.4	MEASUREMENT OF mRNA BY REVERSE TRANSCRIPTASE-MEDIATED PCR	59
2.5	Results	60
2.5.1	ANALYSIS OF TOTAL CAROTENES, CHLOROPHYLL <i>a</i> AND ABA	50
2.5.2	ISOLATION OF CAROTENOID-RELATED PROBES	62
2.5.3	CAROTENOID-RELATED GENE EXPRESSION	64
2.6	Discussion	66
2.6.1	DETERMINATION OF TOTAL CAROTENES, CHLOROPHYLL <i>a</i> AND ABA	66

2.6.2	CAROTENOID-RELATED GENE EXPRESSION PROFILES	66
2.7	Aknowledgments	68
2.8	References	69

**Capítulo III: Obtención de sondas moleculares
homólogas y análisis de los genes implicados en la
síntesis de bixina a partir de licopeno**

3.1	Introducción	74
3.2	Materiales y Métodos	75
3.2.1	OBTENCIÓN DE SONDAS MOLECULARES HOMÓLOGAS	76
3.2.2	ANÁLISIS DE SECUENCIAS E IDENTIDAD	76
3.3	Resultados	76
3.3.1	GEN DE LA LICOPENO BIXINA DIOXIGENASA	76
3.3.1.1	OBTENCIÓN DE SONDAS MOLECULARES HOMÓLOGAS	76
3.3.1.2	ANÁLISIS DE SECUENCIAS Y CONFIRMACIÓN DE IDENTIDAD	77
3.3.2	GEN DE LA BIXINA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA (<i>BoBADH</i>)	79
3.3.2.1	OBTENCIÓN DE SONDAS MOLECULARES HOMÓLOGAS	79
3.3.3	GEN DE LA NORBIXINA METILTRANSFERASA (<i>BonBMT</i>)	82
3.3.3.1	OBTENCIÓN DE SONDAS MOLECULARES HOMÓLOGAS	82
3.4	Discusión y Conclusiones	84
3.4.1	GEN DE LA LICOPENO BIXINA DIOXIGENASA	84
3.4.2	GEN DE LA BIXINA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA (<i>BoBADH</i>)	84
3.4.3	GEN DE LA NORBIXINA METILTRANSFERASA (<i>BonBMT</i>)	86
3.5	Referencias	88

**Capítulo IV: Caracterización de la dioxigenasa aislada de
Bixa orellana L.**

4.1	Introducción	90
------------	---------------------	-----------

4.2 Materiales y Métodos	91
4.2.1 ANÁLISIS DE IDENTIDAD	91
4.3 Resultados	91
4.3.1 ANÁLISIS DE IDENTIDAD DEL FRAGMENTO DE LA DIOXIGENASA AISLADA	91
4.3.2 ANÁLISIS DE LA POSIBLE FUNCIÓN EN LA SÍNTESIS DE BIXINA	95
4.3.2.1 DOMINIOS CONSERVADOS	95
4.3.2.2 FILOGENIA	96
4.4 Discusión y Conclusiones	97
4.4.1 ANÁLISIS DE IDENTIDAD DE LA CCD AISLADA	97
4.5 Referencias	98

Capítulo V: Expression profile of a new CCD isolated from *Bixa orellana* L. and its potential role in apocarotenoids accumulation

Artículo Sometido a *Journal of Experimental Botany*. Por: Rodríguez-Ávila N.L., Ramírez-Benítez J.E., Narváez-Zapata J.A., Aguilar-Espinosa M.L. and Rivera-Madrid R.

5.1 Abstract	102
5.2 Keywords	102
5.3 Introduction	102
5.4 Materials and Methods	104
5.4.1 PLANT MATERIAL	104
5.4.2 ASSESSMENT OF CAROTENOID CONTENT AND DISTRIBUTION	104
5.4.3 ISOLATION OF THE CCD PROBE	105
5.4.4 MEASUREMENT OF <i>Bo</i> CCD2 EXPRESSION LEVEL BY REVERSE TRANSCRIPTASE-MEDIATED PCR	106
5.4.5 ASSESSMENT OF <i>Bo</i> CCD2 mRNA LOCALIZATION BY <i>IN SITU</i> REVERSE TRANSCRIPTASE-MEDIATED PCR	106
5.5 Results	107
5.5.1 PIGMENT CONTENT IN ORGANS OF <i>B. orellana</i> PLANTS	107

5.5.2	PIGMENT HISTOLOGICAL ANALYSIS	108
5.5.3	BIOINFORMATIC ANALYSIS OF CLONED <i>BoCCD2</i> GENE	111
5.5.4	EXPRESSION OF <i>BoCCD2</i> GENE IN SEVERAL PLANT ORGANS AND DEVELOPMENTAL STAGES	111
5.5.5	<i>CCD</i> GENE LOCALIZATION	112
5.6	Discussion	117
5.7	Aknowledgements	120
5.8	References	121
	Discusión y Conclusiones Generales	125
	Perspectivas	129

**Anexo I: Full-length gene enrichment by using an
optimized ARN isolation protocol in *Bixa orellana* L.
recalcitrant tissues**

Artículo publicado en *Molecular Biotechnology* (2009), 42(1): 84-90, Por:
Rodríguez-Ávila N.L., Narváez-Zapata J.A., Aguilar-Espinosa M. and
Rivera-Madrid R.

Índice de Figuras

Capítulo I

Figura 1.1.	Órganos florales y de fructificación de <i>Bixa orellana</i> L., var. Urucurana (Willd) Standl. & L. O. Williams.	5
Figura 1.2.	Rutas de biosíntesis de IPP, precursor de todos los isoprenoides	11
Figura 1.3.	Síntesis de isoprenoides en plantas, mostrando las dos rutas productoras de IPP.	16
Figura 1.4.	Ruta general de biosíntesis de algunos carotenoides en plantas.	20
Figura 1.5.	Ruta propuesta para la biosíntesis de bixina a partir de IPP, y como precursor inmediato, licopeno.	25
Figura 1.6.	Estrategia experimental seguida en este trabajo.	35
Figura 1.7.	Plantas de <i>B. orellana</i> pertenecientes a las plantaciones de "La Extra", Chicxulub Pueblo, Yucatán.	37
Figura 1.8.	Tejidos de <i>Bixa orellana</i> colectados y analizados en este estudio	38
Figura 1.9.	Estadios de desarrollo de frutos inmaduros de <i>Bixa orellana</i> L. seleccionados para este estudio.	42

Capítulo II

Figure 2.1.	Simplified carotenoid biosynthetic pathway.	56
Figure 2.2.	Morphological characteristics and bixin production for floral and fructification organs in two annatto cultivars.	57
Figure 2.3.	Total carotenoids and specific carotenoid-related molecules in different plant tissues.	61
Figure 2.4.	Phylogenetic trees of obtained probes compared with related genes of different plants.	63
Figure 2.5.	Expression analysis of the <i>dxs</i> , <i>psy</i> , <i>pds</i> , β - <i>lcy</i> and ϵ - <i>lcy</i> genes by RT-PCR during plant development.	65

Capítulo III

Figura 3.1.	Amplificación y clonación de <i>BoLCD</i> .	77
Figura 3.2.	Secuencia parcial de la CCD aislada.	78
Figura 3.3.	Gel de agarosa al 1% de los productos de PCR a 60°C para los nueve pares de cebadores diseñados para la amplificación de <i>BoBADH</i> .	80
Figura 3.4.	Gel de agarosa al 1% de los productos de la digestión con EcoRI de plásmidos recombinantes portadores del fragmento de 1000 pb amplificado con los cebadores diseñados para el aislamiento del gen <i>BoBADH</i> .	81
Figura 3.5.	Geles de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos en un gradiente de temperatura de 55 a 60 °C, empleando los cebadores diseñados por Bouvier et al., (2003) para el aislamiento del gen <i>BoBADH</i> .	82
Figura 3.6.	Gel de agarosa al 1% de los productos de PCR a 64°C para los cuatro pares de cebadores diseñados para la amplificación de <i>BonBMT</i> a partir de su secuencia reportada.	83
Figura 3.7.	Geles de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos en un gradiente de temperatura de 55 a 60 °C y de 50 a 55 °C.	83

Capítulo IV

Figura 4.1.	Comparación de la secuencia parcial de la CCD aislada (<i>BoCCD2</i>) con fragmentos equivalentes presentes en otras dioxigenasas de plantas.	92
Figura 4.2.	Árbol filogenético obtenido mediante la aplicación del UPGMA de la CCD aislada (<i>BoCCD2</i>) con otras reportadas para plantas.	93
Figura 4.3.	Alineamiento de la secuencia polipeptídica correspondiente al fragmento de 168 aa de la dioxigenasa aislada con fragmentos equivalentes de las secuencias de las otras dioxigenasas ya reportadas para <i>Bixa orellana</i> .	94

Figura 4.4.	Dendograma de las dioxigenasas reportadas para <i>Bixa orellana</i> obtenido mediante la aplicación del UPGMA.	94
Figura 4.5.	Dominio catalítico característico de RPE65 para que el codifica parte de de la secuencia parcial de la CCD aislada de <i>Bixa orellana</i> L.	95
Figura 4.6.	Árbol filogenético generado con algunas de las secuencias del dominio conservado de CCDs (secuencias en aa) que guardan la mayor homología con la aislada (<i>BoCCD2</i>).	96

Capítulo V

Figura 5.1.	Histological analysis of different bixin accumulating <i>Bixa orellana</i> plant organs.	110
Figure 5.2.	Sequence analysis of the CCD gene probe isolated.	113
Figure 5.3.	<i>BoCCD2</i> expression through different organs of <i>B. orellana</i> plants.	114
Figure 5.4.	<i>BoCCD2</i> gene localization in seed preparations.	115
Figure 5.5.	CCD gene localization in stalk preparations.	116

Índice de Tablas

Capítulo II

Table 2.1.	Gene probes of carotenoid-related genes isolated from <i>Bixa orellana</i> L. and PCR conditions.	64
-------------------	---	-----------

Capítulo III

Tabla 3.1.	Comparación a nivel de aminoácidos de la CCD clonada de <i>B. orellana</i> , en base a las regiones de secuencia similares de otras dioxigenasas de plantas.	79
Tabla 3.2.	Comparación a nivel de nucleótidos de la secuencia reportada por Bouviers y cols (2003) para el gen <i>BoBADH</i> de <i>B. orellana</i> .	85
Tabla 3.3.	Comparación a nivel de nucleótidos de la secuencia reportada por Bouvier y cols. (2003) para el gen <i>BonBMT</i> de <i>B. orellana</i> .	86

Capítulo V

Table 5.1.	Carotenes and apocarotenoids accumulation during different development stages in <i>B. orellana</i> .	109
-------------------	---	------------

Abreviaturas

ABA: Ácido abscísico
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario
AMV: Ácido mevalónico
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
BSA: Albúmina de suero bovina
BoBADH: Bixina aldehído deshidrogenasa
BoLCD: Licopeno bixina dioxigenasa
BonBMT: Norbixina metiltransferasa.
CCD: Carotenoide dioxigenasa (Carotenoid Cleavage Dioxygenase)
CrtISO: Carotenoide isomerasa
CoA: Acetil coenzima A
DEPC: Dietilpirocarbonato
DIG: Digoxigenina
DMAPP: Dimetilalil difosfato
DOX/MEP: Desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa/2-C-metil-D-eritrol 4-fosfato
DXS: Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa
DXR: Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa
EDTA: Sal disódica del ácido tetra.acético etilén diamino
FPP: Farnesil difosfato
GGPP: Geranil geranil difosfato
GPP: Geranil difosfato
HMGR: 3-hidroxi-metilglutaril coenzima A reductasa
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
IPP: Isopentenil pirofosfato
LD-PCR: PCR de larga distancia
β-LCY: Beta licopeno ciclasa
ε-LCY: Epsilon licopeno ciclasa
MEP: 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato
MPTA: 2-(4-metilfenoxi) hidrocloreuro de trietilamina
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PDS: Fitoeno desaturasa
PSY: Fitoeno sintasa
PVPP: Polivinilpirrolidona
RT-PCR: PCR realizada a partir de ADNc generado por transcripción inversa
SDS: Dodecil sulfato de sodio
TE: Amortiguador con 10 mM Tris-HCl pH 8 y 1 mM EDTA
THF: Tetrahidrofurano

VDE: Violaxantina de-epoxidasa
ZDS: ξ -caroteno desaturasa
ZEP: Zeaxantina epoxidasa

Resumen

Bixa orellana L. se destaca por el pigmento que acumula en la cubierta de sus semillas, conocido como bixina. La bixina es un carotenoide muy demandado, por su amplia aplicación como colorante en las industrias alimentaria y cosmética, principalmente.

En estudios dirigidos a la elucidación de la ruta de biosíntesis de la bixina, se han identificado y caracterizado los genes y enzimas involucrados en los diversos pasos del proceso. Sin embargo, la función de dichos genes ha sido demostrada únicamente en sistemas heterólogos y se han realizado pocos estudios acerca del papel que éstos juegan en la síntesis de pigmentos en los tejidos de esta planta.

Por otro lado, variantes morfológicas de *B. orellana* L. presentan a su vez diferencias en la acumulación de bixina en la cubierta de sus semillas maduras. No obstante, hasta la fecha no se ha determinado si esta diferencia en la acumulación de pigmentos está relacionada con la variación en los niveles de expresión de estos genes o a otros factores.

Por lo tanto, el presente trabajo propone el aislamiento y análisis de la expresión de genes involucrados con la síntesis de carotenoides en general y de bixina en lo particular, en diferentes tejidos de *B. orellana* L. El contar con estos genes resultará fundamental para comprender cuáles son los factores que influyen en la acumulación diferencial de bixina.

Abstract

Bixa orellana L. is an economically important species due to its ability to produce bixin, a pigment which is accumulated in the surface of its seeds. This pigment is derived from the carotenoid pathway which is especially demanded due that it has a broad application mainly in the food and cosmetic industries.

In studies designed to elucidate the pathway of bixin biosynthesis, genes and enzymes involved in the different steps have been identified and characterized. However, the function of the genes has only been demonstrated in a heterologous system and only a few studies have been conducted about the role of the carotenoid genes and the pigment production on the plant tissues.

Likewise, it has been observed that morphologic variants of *B. orellana* L. also carry differences in the bixin concentrations observed in the surface of its mature seeds. However, to date it has not been determined if differences in the pigment accumulation could be related to the variation on the expression levels or to another factors.

Accordingly, in this work the isolation and analysis of expression of the genes involved in the carotenoids and bixin biosynthesis through different *B. orellana* L. plant tissues is proposed as an alternative to understand and determine some of the factors which could be accounting for the differential accumulation of bixin detected.

Introducción General

El achiote ha sido utilizado desde la época precolombina como colorante por los pueblos indígenas, como protector de la piel de los rayos del sol, para la cicatrización de heridas y contra picaduras de insectos, además de ser utilizado como condimento o especia por los colonizadores españoles (Arce, 1999; Bouvier *et al.*, 2003). Entre los carotenoides que produce esta planta, destacan los apocarotenoides bixina y norbixina, dadas las múltiples aplicaciones a nivel industrial de estos metabolitos. La bixina es el principal carotenoide de *B. orellana* L., acumulándose en el pericarpo de sus semillas. Se ha puesto un especial interés en la bixina como colorante natural, dadas las drásticas legislaciones que se han impuesto con respecto al empleo de colorantes sintéticos en la elaboración de productos dirigidos al consumo humano (Zotyen, 2002). Así, la bixina se emplea como colorante para una gran diversidad de productos, dentro de los que destacan una variedad de quesos, mantequillas, margarinas, helados, aderezos, salsas, bebidas y carnes, así como en cosméticos y en productos para el teñido de pieles (Mercadante *et al.*, 1997; Zotyen, 2002). Por tanto, la demanda de achiote ha aumentado a nivel internacional, resultando ser una importante fuente de recursos económicos para los países en los que es un cultivo tradicional.

Diversos estudios dirigidos a la elucidación de la ruta de biosíntesis de este importante pigmento se han llevado a cabo a través de la caracterización de las enzimas y genes involucrados en tales procesos. En dichos estudios se han logrado aislar algunos de los genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides (*dxs*, *pds*, *psy*, *β -lcy*, *ϵ -lcy*). Asimismo, Bouvier y cols. (2003) demostraron en un sistema heterólogo que en la ruta de biosíntesis de bixina, actuando el licopeno como precursor, participan tres enzimas: una licopeno dioxigenasa (*BoLCD*), una bixina aldehído deshidrogenasa (*BoBADH*) y, finalmente, una norbixina metil transferasasa (*BonBMT*) (Bouvier *et al.*, 2003).

De la misma manera, es posible observar una diferencia en la acumulación de pigmentos entre variantes morfológicas de *B. orellana* L. (Rivera-Madrid *et al.*, 2006), así como en los producidos en los diferentes órganos de la planta; sin embargo, no ha sido posible establecer si dichas diferencias están relacionadas con los niveles de expresión de los genes involucrados en su ruta de biosíntesis o si obedecen a la influencia de otros factores tales como el estrés ambiental o la intensidad luminosa incidente sobre las semillas en morfotipos de *B. orellana* que presentan frutos dehiscentes.

Dado lo anterior, en el presente trabajo se realizó análisis de la expresión de genes involucrados con la síntesis de carotenoides y bixina en diferente tejidos de variantes de *B. orellana* L. Esto permitirá sentar las bases genético moleculares que gobiernan la diversificación de la producción de pigmentos. Lo anterior contribuirá, a su vez, en el planteamiento de estrategias genético moleculares en programas de mejoramiento genético del cultivo.

Referencias

1. Arce J (1999). *El achiote Bixa orellana L. Cultivo promisorio para el trópico*. Primera Edición. Editorial Earth, Costa Rica. 49 p.
2. Bouvier F, Dogbo O, Camara B (2003). Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annato). *Science*, 300 (5628), 2089-2091.
3. Mercadante A, A Steck and H Pfander (1997). *Isolation and identification of new apocarotenoids from annato (Bixa orellana) seeds*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1050-1054.
4. Rivera-Madrid R, RM Escobedo-Gracia Medrano, E Balam-Galera, M Vera-Ku and H Huges (2006). *Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (Bixa orellana L.)*. *Scientia Horticulturae*, 109(2), 165-172.
5. Zotyen QA (2002). *Compendio. Cultivo del achiote Bixa orellana L.* División de Agronegocios, DGEA. Ministerio de Agricultura y Ganadería. El Salvador. pp. 87.

Capítulo I

1.1 Antecedentes Generales

1.1.1 *Bixa orellana* L.

Bixa orellana L. es una planta dicotiledónea arbustiva que pertenece a la Familia Bixaceae, del Orden de las Guttiferales (Arce, 1999); esta especie es conocida comúnmente como achiote, aunque también suele denominarse como anato, bija, changerica, onoto o urucu, entre otros (Zotyen, 2002).

El achiote es originario de las regiones centrales de América Tropical, se ha difundido ampliamente hasta la India, Filipinas y las islas Hawai; sin embargo, la mayor producción se concentra en los países de América Latina y el Caribe: Perú, Ecuador, Colombia, República Dominicana y Jamaica (Zotyen, 2002).

1.1.2 DESCRIPCIÓN

Bixa orellana L. es un arbusto que puede alcanzar de tres a cinco metros de altura, con un tallo principal que presenta ramificación desde la base, con corteza parda y ramas delgadas que tienden a ser leñosas en la etapa adulta; las hojas son simples, alternas y acorazonadas en la base, coriáceas; las flores son hermafroditas y se agrupan en inflorescencias dispuestas en ramilletes terminales; pueden ser de color blanco, rosado o moradas, dependiendo de la variedad cultivada, actinomorfas, con cinco pétalos y sépalos y múltiples estambres (Arce, 1999).

Los frutos se presentan como una cápsula en forma de esferas cónicas, redondeadas, ovoides y generalmente cubiertas de espinas. Son dehiscentes y al madurar se separan en dos valvas de simetría bilateral, aunque también pueden encontrarse hasta de tres valvas y variantes indehiscentes. Presentan un color verde o rojo, según las variedades y al madurar, las cápsulas se tornan a un color pardo-rojo oscuro. Las semillas son de forma cónica, en número de 30 a 50 por cápsula y cubiertas por un tegumento de color rojizo (Zotyen, 2002). La combinación de las diferentes características del fruto, especialmente en lo que corresponde a su forma y color, permiten la distinción de los diferentes morfotipos de achiote (Arce, 1999).

Cabe señalar que debido a que los morfotipos de *Bixa orellana* L. no han sido objeto de un estudio sistemático, no existen variedades agrícolas y se han nombrado más bien por su origen. De este modo, se cuentan con pocas variedades caracterizadas (Zotyén, 2002; Valdez-Ojeda *et al.*, 2008). Cabe señalar que, sólo se han determinado dos variedades o descriptores taxonómicos basados en la morfología del fruto: *Bixa orellana* L. var. *leiocarpa* (Kuntze) Standl. & L. Williams, la cual se caracteriza por presentar frutos sin espinas en la cubierta y *Bixa orellana* L. var. *urucurana* (Willd) Kuntze ex Pilger, Pflanzereich, la cual presenta frutos globulares cubiertos de espinas largas y flexibles (Standley y Williams, 1961) (Figura 1.1).



Figura 1.1. Órganos florales y de frutificación de *Bixa orellana* L., var. *Urucurana* (Willd) Standl. & L. O. Williams. A) flor, B) cápsulas frutales con semillas inmaduras, mostrando las características espinosidades presentes en esta variedad, C) cápsulas frutales ya maduras y D) semillas maduras, mostrando en su pericarpo el importante pigmento rojo-naranja denominado *bixina*, tradicionalmente conocido como *achiote* o *anato*.

En México, el achiote suele cultivarse principalmente en huertos familiares y con pobre manejo agronómico, principalmente en los Estados de Veracruz, Tabasco, Campeche, Oaxaca, Chiapas y Yucatán (Arce, 1999).

La importancia de *Bixa orellana* L. se debe al pigmento que acumula principalmente en sus semillas maduras, llamado bixina.

1.1.3 LA BIXINA

1.1.3.1 USOS E IMPORTANCIA

La bixina, es un producto natural de gran relevancia económica y cultural, ya que se emplea como especia en la elaboración de una gran variedad de alimentos como pigmento natural desde la época precolombina, además de servir como colorante en la industria principalmente para la elaboración de alimentos de origen lácteo; también se emplea en la producción de cosméticos e incluso en la industria farmacéutica. De hecho, es el segundo colorante natural más empleado en las industrias a nivel internacional y su demanda va incrementando anualmente, debido a las diversas legislaciones que se han desarrollado en tiempos recientes acerca del empleo de colorantes sintéticos en la elaboración de productos destinados para el consumo humano (Bouvier *et al.*, 2003; Giuliano *et al.*, 2003).

Por otro lado, se ha determinado que la bixina no produce reacciones alérgicas en los seres humanos. La importancia de empleo de colorantes de origen natural en la elaboración de productos destinados para el consumo humano ha despertado un especial interés que ha abierto la posibilidad de fomentar el cultivo de achiote en beneficio directo de agricultores e industriales (Arce, 1999). En Latinoamérica se produce cerca del 60% de bixina a nivel mundial, seguida por África (27%) y Asia (12%). Cabe señalar que el precio de las semillas es proporcional a su contenido de bixina, el cual, por normatividad debe ser mayor al 2.7% de su peso seco (Giuliano *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha observado que diferentes morfotipos de *B. orellana* L. presentan variaciones en la cantidad de bixina acumulada en sus semillas, hecho que se traduce en una disminución de la producción de este pigmento (Rivera-Madrid *et al.*, 2006)

1.1.3.2 DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

La bixina es un colorante rojo-naranja que está constituido por 25 carbonos. Su formación es a partir de carotenos de 40 carbonos (Mercadante *et al.*, 1996). Este pigmento ($C_{25}H_{30}O_4$) posee en su estructura un ácido carboxílico y un monometil éster como grupos terminales (Bittencourt *et al.* 2005). Se produce en la cubierta de las semillas de *Bixa orellana* L. y constituye el pigmento más importante de dicha planta, representando en algunas variantes hasta más del 80% de los carotenos totales (Mercadante *et al.*, 1996). La diferencia en la concentración de bixina observada entre

variantes de esta especie, es la causal principal de que las demandas de este pigmento natural no sean satisfechas por los productores. Además de la bixina, en extractos de semillas de *B. orellana* L. se ha identificado la norbixina, que representa menos del 2.5 % de los carotenoides totales (Johnson & Peterson, 1974), así como otros componentes como β -caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina y metil-bixina (Tirimana, 1981; Mercadante *et al.*, 1997), terpenos (all-E-geranilgeraniol, farnesil-acetona, geranil-geranil octadecanoato, geranil-geranil formato, ξ -tocotrienol) y otros apocarotenoides (metil 9'Z-apo-6'-oato, metil (9Z)-apo-8'-licopenoato y (all-E)-apo-8'-licopenoato) (Jondiko & Pattenden, 1989; Mercadante *et al.*, 1996).

Entre las características químicas de la bixina se encuentra su solubilidad en aceites, grasas, cloroformo, piridina, ácido acético glacial y propilenglicol (Arce, 1999), además de su facilidad para absorberse a los pH alcalinos en la mayoría de los alimentos así como su capacidad para convertirse en una sal más estable, la norbixina (Freund, 1985). Es relativamente estable al congelamiento y a la maceración. En presencia de vitamina C previene los cambios de sabor en los alimentos y su estabilidad como colorante no se altera (Ávila *et al.*, 1982). Asimismo, la bixina es susceptible a degradación por luz y temperaturas superiores a los 80°C; es estable en presencia de bajas concentraciones de oxígeno y resistente a ácidos y álcalis, por lo que no es afectada por metales como hierro, aluminio y zinc (Johnson & Peterson, 1974).

La bixina es un pigmento de tipo carotenoide que se deriva del metabolismo de los isoprenoides.

1.1.4 ISOPRENOIDES

Los isoprenoides son metabolitos que pertenecen a una gran familia de productos naturales de gran relevancia a nivel biológico ya que cumplen una gran cantidad de funciones a nivel celular. Por ejemplo, pueden actuar en la estabilización de las membranas celulares y como precursores de las hormonas esteroidales, del ácido abscísico, de giberelinas y de las cadenas prenil de las clorofilas que actúan en los complejos fotosintéticos, las ubiquinonas y las plastoquinonas requeridas para las cadenas de transporte de electrones (Bach, 1987; Bach *et al.*, 1990; Rohmer, 1999).

La molécula base para la formación de los diferentes compuestos isoprenoides es el isopentenil pirofosfato (IPP). Así, los isoprenoides se van formando por la adición de moléculas de IPP; dicho proceso es catalizado

por diferentes enzimas conocidas como prenil transferasas, de las cuales se han caracterizado al menos 16 tipos que catalizan los pasos que involucran desde la formación del geranyl pirofosfato (de 10 carbonos), hasta la producción de caucho (de más de 5000 carbonos) (Ogura & Koyama, 1998). La gran diversidad estructural característica de los isoprenoides se origina gracias a la intervención de diferentes terpenociclasas (Wedlt & Schulz, 1998).

1.1.4.1 RUTAS DE BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES

Todos los isoprenoides son sintetizados por la condensación consecutiva de monómeros de isopentenil pirofosfato (IPP) de 5 carbonos. Hasta hace algunos años, se pensaba que el isopentenil pirofosfato se derivaba exclusivamente a partir de la unión de tres moléculas de acetil coenzima A (CoA) a través de una ruta conocida como del ácido mevalónico o mevalonato (MVA) debido a que en ésta dicho compuesto es el primer intermediario para la biosíntesis de IPP. Esta ruta opera en el citosol y en el retículo endoplásmico de las células de plantas, así como en animales, levaduras, arqueobacterias, algas, hongos y protozoarios. La ruta MVA consiste de seis enzimas: acetil-CoA tiolasa (AACT), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGS), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR), mevalonato cinasa (MVK), fosfomevalonato cinasa (PMK), difosfomevalonato descarboxilasa (PMD). En resumen, el IPP es sintetizado a través la ruta AMV mediante la condensación de dos grupos de acetil-CoA por acción de la acetoacetil-CoA sintasa (AACT); dos moléculas de acetil-CoA son condensadas entonces por efecto de la HMGS, dando lugar al 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA), el cual es reducido por la HMGR a ácido mevalónico. El ácido mevalónico es un intermediario de seis carbonos, que es fosforilado con dos grupos fosfato (pirofosfato) en dos pasos consecutivos por acción de las enzimas MVK y PMK para ser descarboxilado por acción la PMD y deshidratado para producir IPP (Takagi *et al.*, 2000) (Figura 1.2A). El IPP puede entonces ser transformado a su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) por acción de la IPP isomerasa (IDI).

Más tarde se demostró la existencia de una ruta alternativa para la producción de IPP en eubacterias y cloroplastos de algas verdes y plantas superiores (Rohmer *et al.*, 1999; Schewender *et al.*, 1996; Lichtenthaler *et al.*, 1997). Esta ruta alternativa, conocida como ruta del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), debido a que éste es el primer intermediario comprometido de la ruta, en las plantas se localiza en los plastidios. En resumen, la ruta MEP inicia con la formación de 1-desoxy-D-xilulosa-5-fosfato (DXP) por la

condensación de piruvato y gliceraldehído 3-fosfato catalizada por la enzima DXP sintasa (DXS). El DXP sufre entonces un rearrreglo intramolecular y reducción catalizada por la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (DXR) para producir metil eritrol 4-fosfato (MEP), el cual es el precursor inmediato de los isoprenoides plastidiales. El MEP es convertido consecutivamente a 4-difosfocitidil-metileritritol (CDP-ME), 4-difosfocitidil-metileritritol fosfato (CDP-MEP) y metil-eritritol 2,4-ciclodifosfato (ME-cPP). Estas reacciones son llevadas a cabo por la enzima CDP-ME sintasa (CMS), CDP-ME cinasa (CMK) y ME-cPP sintasa (MCS). El metil-eritritol 2,4-ciclodifosfato (ME-cPP) es entonces convertido a hidroximetilbutenil 4-difosfato (HMBPP) por una enzima hidroximetilbutenil 4-difosfato sintasa (HDS). El HMBPP es convertido finalmente en una mezcla en IPP por acción de una enzima HMBPP reductasa (HDR) (Eisenreich *et al.*, 2001; 2004). El papel de la enzima IPP isomerasa (IDI) en la biosíntesis de isoprenoides plastidiales está en debate, debido a que existen evidencias de que al menos algunas bacterias (Hahn *et al.*, 1999) y plantas como la de menta (*Mentha x piperita* L.) (Lange *et al.*, 2001) son capaces de transformar IPP a DMAPP sin la presencia de ninguna enzima con actividad IDI. Sin embargo, se han identificado genes codificando a presuntas IDIs citosólicas y plastidiales en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), sugiriéndose que ambas IDIs pueden expresarse en los diferentes compartimentos celulares en los que ocurre la biosíntesis de isoprenoides. (Nakamura *et al.*, 2001)(Figura 1.2B).

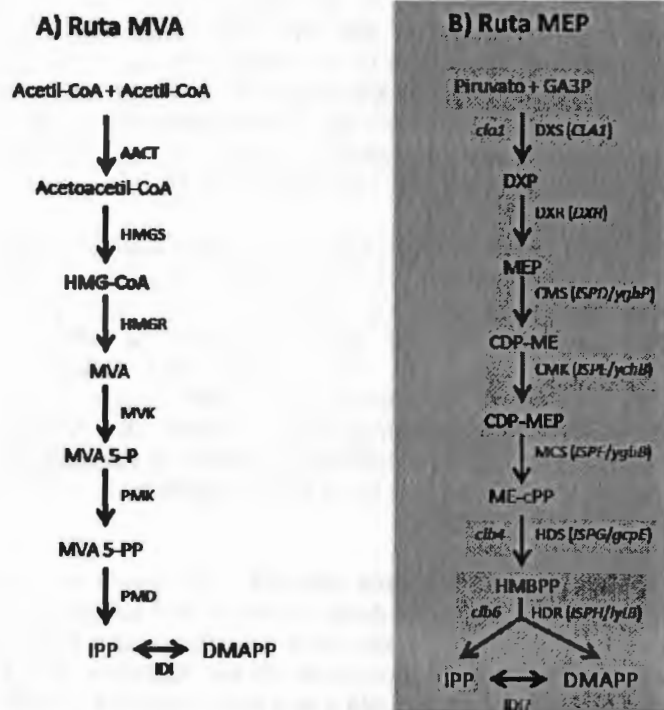


Figura 1.2. Rutas de biosíntesis de IPP, precursor de todos los isoprenoides. A) Ruta del ácido mevalónico (MVA). B) Ruta del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP). HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A; MVA 5-P, ácido mevalónico 5-fosfato; MVA5-PP, ácido mevalónico 5-difosfato; IPP, isopentenil pirofosfato; DMAPP, dimetilalil pirofosfato; AACT, acetil-CoA tiolasa; HMGS, 3-hidroxy-3-metilglutaril-CoA sintasa; HMGR, 3-hidroxy-3-metilglutaril-CoA reductasa; MVK, mevalonato cinasa; PMK, fofomevalonato cinasa; PMD, difofomevalonato descarboxilasa (DPMVA descarboxilasa); IDI, IPP isomerasa; DXP, 1-desoxy-D-xilulosa-5-fosfato; MEP, metil eritrol 4-fosfato; CDP-ME, 4-difofocitidil-metileritritol; CDP-MEP, 4-difofocitidil-metileritritol fosfato; ME-cPP, metil-eritritol 2,4-ciclodifosfato; HMBPP, hidroximetilbutenil 4-difosfato; DXS, 1-desoxy-D-xilulosa-5-fosfato sintasa; DXR, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa; CMS, 4-difofocitidil-metileritritol sintasa; CMK, 4-difofocitidil-metileritritol cinasa; MCS, metil-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa; HDS, hidroximetilbutenil 4-difosfato sintasa; HDR, hidroximetilbutenil 4-difosfato reductasa.

Dado que una de las rutas de síntesis de IPP se lleva a cabo en el citoplasma (AMV) y la otra en los plastidios (MEP), se dice que en las células vegetales la formación del IPP está compartimentalizada. Los principales productos finales de la ruta AMV son esteroides, triterpenos y sesquiterpenos, mientras que la biosíntesis de monoterpenos, diterpenos e isoprenoides plastidiales como son los carotenoides, fitol y plastoquinona-9, entre otros productos, se lleva a cabo a través de la ruta MEP localizada en los plastidios (Lichtenthaler *et al.*, 1997) (Figura 1.3).

Durante los últimos años la regulación de las dos rutas biosintéticas de IPP ha sido motivo de discusión, con respecto a elucidar el origen de los isoprenoides presentes en los plastidios. Se han planteado dos posibilidades: una de ellas es que la síntesis de IPP se encuentre compartimentalizada, es decir, que ambas rutas trabajan de manera separada sin que exista un intercambio de IPP desde el citoplasma al cloroplasto y viceversa (Rodríguez-Concepción & Grusissem, 1999; Dudareva *et al.*, 2005); la otra posibilidad plantea la cooperación entre las dos rutas productoras de IPP en las plantas superiores (Contin *et al.*, 1998; Dudareva & Pichersky, 2008).

A este respecto, existen diversos trabajos en donde se demuestra la cooperación entre las dos rutas productoras de IPP en plantas superiores, específicamente resaltando el papel de la ruta citosólica o AMV en el aporte de IPP para la síntesis de isoprenoides en los plastidios. Por ejemplo, en experimentos realizados por Nabeta y sus colaboradores (1997) en plantas hepáticas tales como *Heteroscyphus planus* y *Ptychanthus striatus* a las cuales se suministró exógenamente glucosa marcada con ^{13}C , se observó la presencia de marca en los carbonos 2, 4 y 5 de las primeras unidades isoprenílicas del fitol, demostrándose de esta forma que la incorporación del carbono marcado en el IPP sintetizado siguió el patrón esperado por la ruta del mevalonato (Lichtenthaler *et al.*, 1997). Asimismo, en un estudio posterior Karunagoda y Nabeta (2004) demostraron que la porción de la cadena lateral fitol de la clorofila *a* se derivó principalmente del farnesil pirofosfato (FPP) sintetizado en el citoplasma por la vía del mevalonato, y que este FPP fue tomado de forma preferencial dentro de los cloroplastos para ser condensado en geranil geranil pirofosfato (GGPP) empleando el IPP sintetizado en el interior de los cloroplastos. En adición, mediante la realización de experimentos similares fue posible observar que en *Catharantus roseus* el terpeno secologanina estuvo marcado principalmente por la ruta MEP, aunque también se observó la presencia de marca proveniente de la ruta AMV en algunos carbonos, pudiéndose hipotetizar que la molécula precursora de la secologanina fue en algunos casos el

acetil-CoA y que el IPP sintetizado en el citoplasma fue incorporado desde el citoplasma hacia los plastidios, en donde se acumula tal compuesto (Contin *et al.*, 1998). Por otro lado, células TBY2 de *Nicotiana tabacum* L. las cuales habían sido previamente inhibidas en la ruta AMV con mevinolina, acumularon esteroides tales como el campesterol, estigmasterol y sitosterol cuando fueron incubadas en un medio conteniendo desoxi-D-xilulosa-5-fosfato marcado con tritio; debido al marcaje radioactivo que presentaban los esteroides se pudo establecer que la ruta MEP funcionaba proporcionando precursores IPP y DMAPP para la síntesis de tales metabolitos. Asimismo, al bloquear la ruta MEP con fosmidomicina, un inhibidor de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (DXR), la síntesis de plastoquinona fue sostenida mediante la incorporación de ácido mevalónico marcado con deuterio, de tal manera que el entrecruzamiento de ambas rutas para producir isoprenoides tanto plastidiales como citosólicos quedó confirmado (Hemmerlin *et al.*, 2003).

Existe evidencia de que isoprenoides derivados de la condensación del IPP y DMAPP también son intercambiados entre plastidios y citosol, dependiendo de la especie, tejido y estado fisiológico de la planta (Dudareva & Pichersky, 2008). Por ejemplo, en un estudio en el que se transformaron plantas de *Nicotiana tabacum* L. con el gen de la farnesil pirofosfato sintasa (FPS) fusionada a un péptido de tránsito hacia el cloroplasto, se observó un notable incremento en la síntesis de sesquiterpenos citosólicos con una concomitante reducción en el tamaño de las plantas transgénicas, así como la presencia de clorosis en las hojas inferiores, reducción de pigmentos en la corola de sus flores y bajos niveles de polen (Wu *et al.*, 2006). De igual forma, en un estudio realizado en *Arabidopsis* se observó que la concentración de sesquiterpenos incrementaba hasta 100 veces en transformantes con FPS fusionada a un péptido de tránsito de localización plastidial, infiriéndose el transporte de farnesil pirofosfato de los plastidios hacia el citosol (Kappers *et al.*, 2005). Al analizar cloroplastos aislados de hojas de espinacas se observó que éstos son capaces de transportar eficientemente de forma unidireccional, del citosol hacia el plastidio, tanto IPP como GPP y a menores tasas DMAPP y FPP, mientras que GGPP y mevalonato no fueron transportados con una eficiencia apreciable (Bick & Lange, 2003). De trabajos hechos en *Fragaria x ananassa* se propuso que la enzima citosólica linanol/nerolidol sintasa, era capaz de sintetizar tanto el monoterpeno linanol (plastidial) como el sesquiterpeno nerolidol (citosólico) a partir de GPP y FPP presente tanto en el citosol como del proveniente de los plastidios (Rodríguez-Concepción, 2006); un caso similar se observó en plantas de *Arabidopsis* en donde el

nerolidol formado fue sintetizado presumiblemente del FPP sintetizado en los plastidios (Aharoni *et al.*, 2003) (Figura 1.3).

Por su parte, un ejemplo de la independencia de ambas rutas se observó en un estudio realizado en flores de *Antirrhinum majus* por Dudareva y sus colaboradores (2005), estableciéndose la posibilidad de que solamente la ruta MEP pudiera estar relacionada con la formación de monoterpenos, carotenoides, y sesquiterpenos. Esta afirmación se basa en los resultados derivados del marcaje radioactivo de los precursores específicos para cada una de las rutas (1-desoxy-[5,5-²H₂]- D- xilulosa y [2,2-²H₂]-mevalolactona) y del análisis de los productos obtenidos a través de la inhibición de la ruta AMV con mevinolina y de la ruta MEP con fosmidomicina. Al comparar los resultados obtenidos de ambos tratamientos de inhibición y marcaje, se determinó que sólo una de las dos rutas, la MEP localizada en los plastidios, se encontraba activa en la formación de dichos compuestos. Esta afirmación se dedujo al inhibir la ruta AMV y marcando radioactivamente al precursor de la ruta MEP; así, de este tratamiento se produjeron sesquiterpenos como el nerolidol marcados radioactivamente. Sin embargo, al realizar el experimento contrario, empleando el inhibidor de la ruta MEP y marcando la mevalolactona de la ruta AMV, se observó una disminución drástica de los niveles tanto de nerolidol como de monoterpenos y carotenoides, no detectándose la incorporación de [²H₂]-MVL en ninguno de los productos (Dudareva *et al.*, 2005). Asimismo, en estudios realizados en plantas de tomate empleando el inhibidor mevinolina, se observó una disminución en la concentración de esteroides (sintetizados en el citoplasma) mientras que la producción de carotenoides en el fruto no se vio afectada (Rodríguez-Concepción & Grussem, 1999).

Sin embargo, tomando en consideración que todas las reacciones carotenogénicas se llevan a cabo dentro de los plastidios en forma coordinada con la formación de plastoquinona, tocoferoles y giberelinas a través de la ruta MEP, la naturaleza ramificada de la ruta y las múltiples localizaciones subcelulares de las enzimas y productos de ambas rutas, es posible inferir la existencia de complejas interacciones de tipo regulatorio con el flujo coordinado de unidades isoprenoides dentro de cada rama de la ruta. Dado lo anterior, las probabilidades de que exista un entrecruzamiento metabólico entre ambas rutas son muy altas, de manera que perturbaciones en el flujo de isoprenoides derivados de la aplicación de ingeniería genética pudieran traducirse en efectos pleiotrópicos sobre los niveles de metabolitos y el vigor de las plantas (Enfissi *et al.*, 2006). Estudios acerca de la cooperación o compartimentalización de ambas rutas de biosíntesis de IPP debe ser objeto de investigaciones futuras.

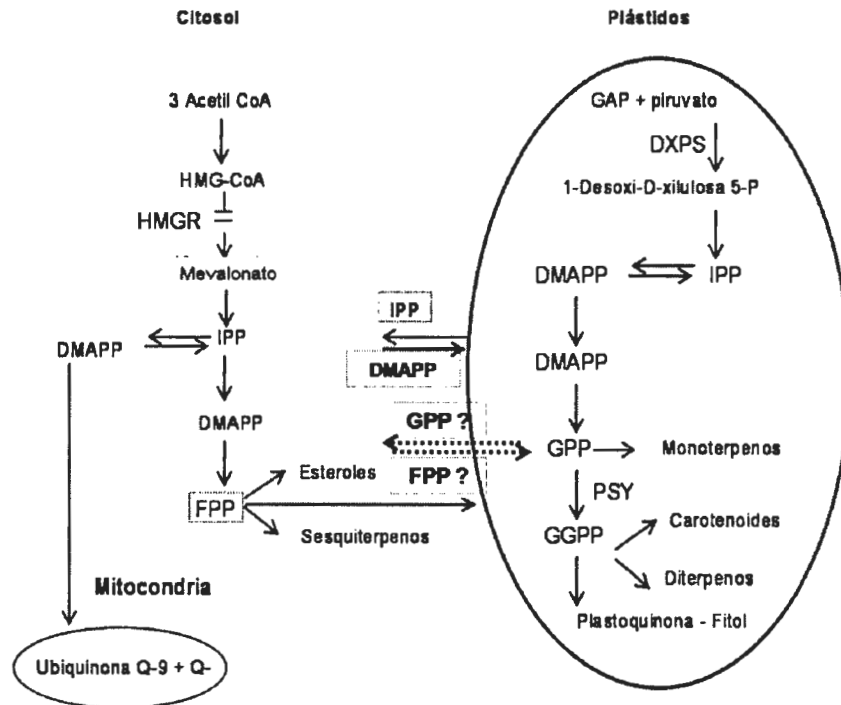


Figura 1.3. Síntesis de isoprenoides en plantas, mostrando las dos rutas productoras de IPP. La ruta del mevalonato para la producción de IPP a partir de acetil Co-A, regulada por la actividad de la enzima HMGR ha sido bien caracterizada tanto para animales como para levaduras, estableciéndose que tiene lugar en el citoplasma regulando la síntesis de esteroides y sesquiterpenos. Por su parte, la ruta MEP regulada por la enzima DXPS, está presente en algas, bacterias y en los pláستidos de plantas y proporciona los bloques de IPP necesarios para la síntesis de monoterpenos, carotenoides, diterpenos y cadenas fitilo de la clorofila. CoA, acetil coenzima A; GAP, gliceraldehído-3-fosfato; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A; IPP, isopentenil pirofosfato; DMAPP, dimetilalil pirofosfato; FPP, farnesil pirofosfato; GPP, geranil pirofosfato; GGPP, geranil geranil pirofosfato; HMGR, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductas; DXPS, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa; PSY, fitoeno sintasa.

1.1.5 CAROTENOIDES

1.1.5.1 DEFINICIÓN E IMPORTANCIA

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides lipo-solubles de color rojo, naranja y amarillo, que se originan en los plastidios de las células vegetales y se encuentran embebidos en las membranas (Bartley & Scolnik, 1995); son moléculas de 40 carbonos con dobles enlaces conjugados derivados de la dimerización de dos moléculas de 20 carbonos de geranil geranil pirofosfato (GGPP), siendo éste último el precursor de múltiples isoprenoides de importancia como el tocoferol, la cadena lateral de la clorofila, quinonas y giberelinas (Fraser *et al.*, 1995).

Su relevancia a nivel biológico radica en que estos compuestos son los responsables de proporcionar una gran variedad de colores tanto a animales como a plantas y microorganismos. Por ejemplo, el color naranja característico de la carne del salmón y el rojo de las conchas de las langostas son debidos al cetocarotenoide astaxantina (Grotewold, 2006). En plantas, además de tener un papel importante como componentes del mecanismo de defensa desarrollado como respuesta a exposiciones a alta irradiación solar, brindando fotoprotección durante la fotosíntesis, actuando como antioxidantes y como componentes estructurales del complejo fotosintético antena y de los centros de reacción, son reguladores de la fluidez de la membrana celular (Umeno *et al.*, 2005), actúan como precursores del ácido abscísico (ABA), fitorregulador que modula tanto procesos de estrés como del desarrollo (Bartley & Scolnik, 1995; Grotewold, 2006).

Asimismo, los carotenoides con actividad de provitamina A son componentes esenciales de la dieta humana y hay evidencia considerable de que muchos carotenoides tienen actividad anti-cancerígena (Bartley & Scolnik, 1995). Por tanto, dichos metabolitos resultan ser de gran importancia a nivel económico, ya que gran parte de ellos son empleados para la elaboración de diversos productos dentro de los que destacan los derivados de la industria farmacéutica y de productos alimenticios.

1.1.5.2 PLASTIDIOS

Los carotenoides se sintetizan en los plastidios. Se denomina como plastidio a cualquier miembro de una familia de orgánulos presentes únicamente en el citoplasma de las células vegetales, que desempeñan una función de reserva, de fotosíntesis o de biosíntesis de moléculas esenciales para el funcionamiento celular (Wise, 2006). Todos los plastidios de una especie

particular de plantas contienen múltiples copias del mismo genoma, el cual es relativamente pequeño, ribosomas y pueden sintetizar algunas proteínas propias (Vothknecht and Soll, 2006). Están delimitados por una cubierta compuesta de dos membranas concéntricas. Los plastidios derivan de precursores comunes, los proplastidios, presentes en las células inmaduras del embrión y del meristemo vegetal los cuales crecen tanto en la luz como en la oscuridad. El proplastidio se diferencia en un tipo específico de acuerdo a los requerimientos de la célula y, en determinadas condiciones, cada tipo específico es capaz de desdiferenciarse, así como de interconvertirse en otros tipos plastidiales (Alberts *et al.*, 1991).

Los plastidios varían principalmente en número, tamaño, forma, contenido y función según el tipo celular y el estadio de desarrollo de la célula, y se reproducen por fisión, con independencia del ciclo celular. Son ejemplos de plastidios los cloroplastos, que contienen los pigmentos verdes clorofila *a* y *b*, así como carotenoides de color anaranjado y xantofilas amarillas, los aleuoplastos (contienen aleurona), los leucoplastos (plastidios incoloros implicados en la síntesis de monoterpenos), los amiloplastos (acumulan gránulos de almidón) y los cromoplastos, que son organelos coloreados que sintetizan y contienen pigmentos de color, como los carotenos y las xantofilas, los cuales a su vez son el origen de los colores de muchos frutos, flores y hojas. Los cromoplastos se originan a partir de cloroplastos jóvenes o de cloroplastos maduros, por división (Alberts *et al.*, 1991).

1.1.5.3 RUTA DE SÍNTESIS DE LOS CAROTENOIDES

De forma general, en el inicio de la ruta se lleva a cabo la isomerización de moléculas de IPP a su forma activa alílica, el dimetilalil difosfato (DMAPP), actuando este último como sustrato para la geranyl difosfato sintasa para producir geranyl pirofosfato (GPP) al cual le será agregado una nueva molécula de DMAPP para dar lugar al farnesil pirofosfato (FPP); a su vez, la enzima geranyl-geranyl difosfato sintasa (GGPS) produce GGPP a partir del farnesil difosfato. Es a partir del geranyl geranyl pirofosfato que se lleva a cabo la biosíntesis del fitoeno por acción de la enzima fitoeno sintasa (PSY), el cual es el primer compuesto de tipo carotenoide (Cunningham & Gantt, 1998). El fitoeno es entonces convertido en licopeno, el carotenoide rojo presente en tomates y sandías, por acción de dos enzimas desaturasas, fitoeno desaturasa (PDS) y ζ -caroteno desaturasa (ZDS). A través de esta ruta se producen poli-cis compuestos que son convertidos a sus formas all-trans por acción de las carotenoide isomerasas CrtISO y ZISO. El licopeno es el sustrato de dos enzimas ciclasas, ϵ -licopeno ciclasa (LCYE) y β -licopeno ciclasa (LCYB), las cuales cuando actúan juntas en los extremos

de la molécula conduciendo la formación de alfa carotenos, mientras que la acción de sólo LCYB deriva en la formación de beta caroteno. Ambos tipos de carotenoides cíclicos son hidroxilados por las enzimas β -caroteno hidroxilasa (CHYB) y ϵ -caroteno hidroxilasa (CHYE), conduciendo a la formación de xantofilas. Las xantofilas a su vez pueden ser epoxidadas o de-epoxidadas. Ejemplo de ello son las betaxantofilas, las cuales son epoxidadas por una zeaxantina epoxidasa (ZEP) para dar lugar a la violaxantina, precursor del fitoregulator ácido abscísico (ABA), o de-epoxidadas por una violaxantina de-epoxidasa (VDE) (Giuliano *et al.*, 2008) (Figura 1.4).

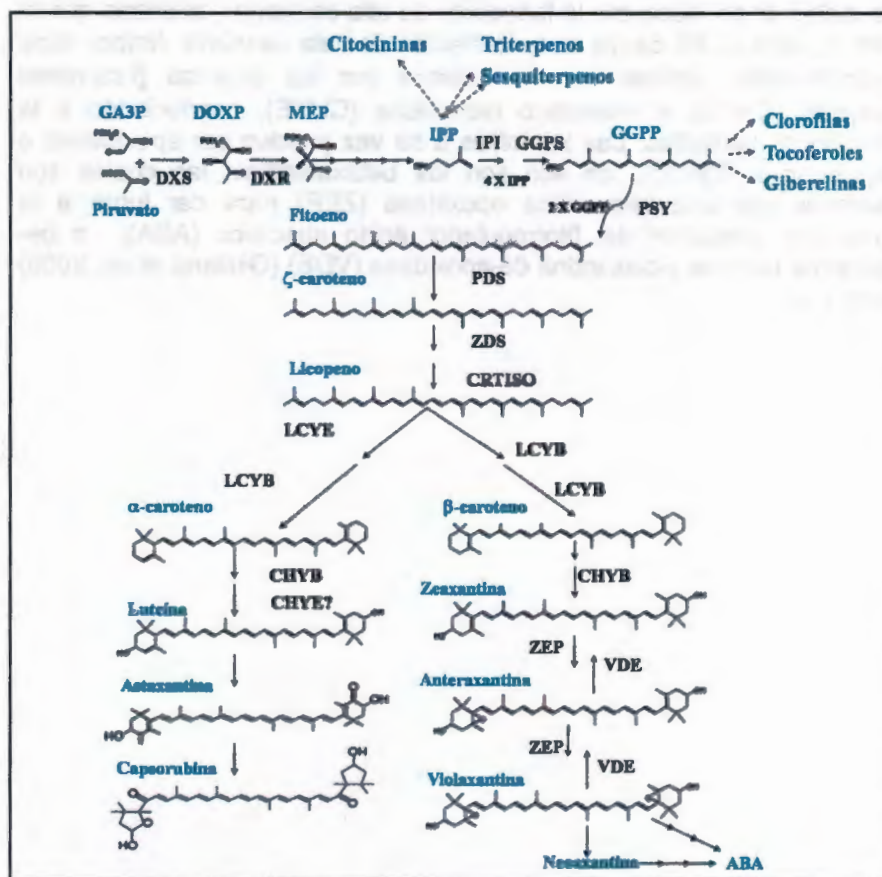


Figura 1.4. Ruta general de biosíntesis de algunos carotenoides en plantas. Los nombres de los compuestos se presentan en azul y los de las enzimas en negro. GA3P, gliceraldehído-3-fosfato; DOXP, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato; MEP, 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato; IPP, isopentenil pirofosfato; GGPP, geranil geranil pirofosfato; ABA, ácido abscísico; DXS, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa; DXR, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomeras; IPI, isopentenil pirofosfato isomerasa; GGPS, geranil geranil pirofosfato sintasa; PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; ZDS, ζ-caroteno desaturasa, CRTISO, carotenoide isomerasa, LCYE, ε-licopeno ciclasa, LCYB, β-licopeno ciclasa, CHYB, β-caroteno hidroxilasa, CHYE, ε-caroteno hidroxilasa, ZEP, zeaxantina epoxidasa, VDE, violaxantina de-epoxidasa.

1.1.5.4 EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN CAROTENOGÉNESIS

La expresión de los genes para las enzimas de la biosíntesis de los principales precursores de esta ruta, fitoeno y licopeno, muestra variaciones a través de las diversas etapas de desarrollo de los tejidos donde se presentan las mayores acumulaciones de carotenoides. Por ejemplo, Rodrigo y sus colaboradores (2004), encontraron que la expresión del gen de una de las enzimas involucradas en la introducción de insaturaciones en la cadena hidrocarbonada del fitoeno para dar origen al licopeno, la fitoeno desaturasa (PDS), parece estar correlacionada con el contenido de carotenoides totales en cáscaras de frutos de naranja maduros, y que a su vez, los genes que codifican las enzimas fitoeno sintasa (PSY) y ζ -fitoeno desaturasa (ZDS) muestran una sobreexpresión en las etapas en las que el fruto alcanza su máxima coloración. Datos similares se han obtenido con la PSY durante el cambio de coloración acompaña las diferentes etapas de maduración de frutos de tomate, estableciéndose que la acumulación de carotenoides durante la maduración del fruto parece estar relacionada con la sobreexpresión de los genes de la PDS y PSY (Giuliano *et al.*, 1993). Es decir, la acumulación de carotenoides totales está fuertemente relacionada con los niveles de expresión de genes implicados en la síntesis de fitoeno y licopeno, y por lo tanto, con la acumulación de dichas moléculas precursoras.

Sin embargo, se ha establecido que las concentraciones de carotenos y apocarotenos resultantes, más que a los niveles de expresión de los genes que están involucrados en la biosíntesis de moléculas precursoras, pueden deberse a otros factores que regulan su biosíntesis. Por ejemplo, el contenido de luteína en pétalos de campasúchil no estuvo correlacionado con los niveles de expresión de *psy* y *pds*. Asimismo, fue posible definir que la expresión coordinada de los genes que codifican a enzimas involucradas en la ciclización del licopeno, β -licopeno ciclasa (β -LCY) y ϵ -licopeno ciclasa (ϵ -LCY), pudiera influir más directamente en la acumulación de luteína en los pétalos, presentando un incremento en su expresión además de ser órgano-específica, ya que en las hojas en donde el contenido de carotenoides cíclicos era menor, no se observaron cambios marcados en los niveles de expresión de tales genes (Del Villar-Martínez *et al.*, 2005).

Asimismo, en cítricos tales como limón, naranja y mandarina, se observó que la coloración de las cáscaras característica del grado de maduración de estos frutos y el cual está fuertemente relacionado con el tipo de carotenoide cíclico presente, depende directamente de la acumulación de

transcritos de los genes involucrados de forma más directa en su biosíntesis que de la disponibilidad de moléculas precursoras, disminuyendo la expresión de *PSY*, *PDS* y *ZDS*, e incrementándose la acumulación de mRNA de ciclasas (*β-LCY* y *ε-LCY*) (Kato *et al.*, 2004). Por ejemplo, los estadios en los que la coloración del fruto es predominantemente verde, se presenta una acumulación de *ε*-carotenos y por tanto la sobreexpresión de *ε-LCY*. De la misma manera, durante la etapa en la que los frutos van tornándose de color naranja, se observa un incremento simultáneo en la expresión de todos los genes que están involucrados en la biosíntesis de xantofilas de tipo *β,β*, destacándose como es posible inferir la expresión de *β-LCY* y acumulándose en los tejidos *β,β*-xantofilas tales como la violaxantina y la neoxantina. Es decir, durante la carotenogénesis, las enzimas involucradas pudieran presentar una regulación coordinada en su expresión específica para cada tipo de carotenoide y relacionada a una etapa de desarrollo o tejido específico de la planta (Giuliano *et al.*, 1993; Cunningham *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 2004; Del Villar-Martínez *et al.*, 2005).

Aunque químicamente la mayoría de los carotenoides son tetraterpenoides, existen carotenoides que poseen un esqueleto de menos de 40 carbonos debido a la presencia de escisiones en uno o ambos extremos del carotenoide precursor. Estos carotenoides de tamaño molecular menor son conocidos como apocarotenoides.

1.1.6 APOCAROTENOIDES

Los apocarotenoides son compuestos derivados principalmente de la acción oxidativa de enzimas del tipo dioxigenasas sobre los carotenoides. Dichas enzimas catalizan el rompimiento de los dobles enlaces de una gran variedad de carotenoides originando moléculas más pequeñas y con características muy diferentes al compuesto precursor (Bao-Cai *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2001; Giuliano *et al.*, 2003; Linting & Vogt, 2004; Schwartz *et al.*, 2004; Simkin *et al.*, 2004; Snowden *et al.*, 2005).

Los primeros trabajos acerca de este grupo de dioxigenasas, estuvieron dirigidos a elucidar el mecanismo de biosíntesis del ácido abscísico (ABA), a partir de la ruptura oxidativa de epoxicarotenos, tales como el 9'-*cis*-violaxantina o el 9'-*cis*-neoxantina, por la acción de la enzima dioxigenasa VP14 en maíz (Bao-Cai *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997) o de su homólogo en frijol, la PvNCED1 (Qin & Zeevart, 1999).

Estudios recientes han identificado nuevas dioxigenasas cuyo substratos son los carotenoides, por lo que se han denominado enzimas CCD's

(Carotenoid Cleavage Dioxygenases). En *Arabidopsis*, se identificaron dos CCD's involucradas en la biosíntesis de un compuesto relacionado con la inhibición de las ramificaciones laterales en el meristemo axilar (Schwartz *et al.*, 2004).

En jitomate han sido identificados dos genes de dioxigenasas (*LeCCD1A* y *LeCCD1B*) involucrados en la producción de compuestos volátiles (β -ionona, pseudoionona y geranilacetona) que brindan el aroma a las flores y frutos de la planta (Simkin *et al.*, 2004). En petunia el gen de *PhCCD8*, inhibe o retarda la senescencia de las hojas, induce la formación de flores pequeñas, y reduce la distancia entre los nudos, así como el crecimiento de las raíces (Snowden *et al.*, 2005). Asimismo, incluso en animales, se ha demostrado la existencia de CCD's involucrados en la biosíntesis de la vitamina A y de sus retinoides, derivados a partir de la ruptura de los dobles enlaces ubicados en las posiciones 15, 15' del β -caroteno (Lintig & Vogt, 2004).

Por tanto, y dada la relevancia de las dioxigenasas que actúan sobre los compuestos carotenoides, es necesaria la realización de estudios dirigidos a la identificación de los genes que codifican para este grupo de enzimas, así como a la regulación de su expresión genética. Esto facilitará en un futuro la producción de nuevas variedades de frutos con nuevos sabores e incluso con concentraciones más elevadas de vitamina A, así como flores con un mejor aroma, entre otras características. En adición, en *Bixa orellana* L. se ha demostrado la existencia de algunos apocarotenos parecidos al licopeno, como son el 9'Z-apo-licopenato, el metil (9Z)-apo-8'-licopenato y el (*all-E*)-apo-8'-licopenato (Mercadante *et al.*, 1996; 1997).

1.1.7 BASES GENÉTICO-MOLECULARES DE LA BIOSÍNTESIS DEL APOCAROTENOIDE BIXINA

Basándose en la descripción de los diferentes carotenoides presentes en los extractos de semillas de *B. orellana* (Mercadante *et al.*, 1996; 1997), se propuso que el licopeno podría ser el precursor de la bixina y que debía de existir un número pequeño de genes estructurales involucrados. El proceso podría iniciar a partir de la ruta principal de los carotenoides y que estos genes debían de tener cierta similaridad a aquellos que codifican para dioxigenasas, aldehído oxidasas, aldehído deshidrogenadas o metiltransferasas, enzimas que suelen presentarse en rutas biosintéticas similares, como la del ácido abscísico (Jako *et al.*, 2002). De esta forma, se lograron encontrar genes candidatos involucrados en la biosíntesis de bixina, generando EST's a partir de una biblioteca de ADNc correspondiente

a cubiertas de semillas de *Bixa orellana* L. y seleccionando aquellas enzimas involucradas únicamente con el metabolismo de isoprenoides, por ejemplo las correspondientes a la ruta MEP, dentro de las cuales se encontrarían incluidas las implicadas en la biosíntesis de bixina (Jako *et al.*, 2002).

Tomando en cuenta estos datos y la similaridad estructural entre la bixina y el azafrán, Bouvier y sus colaboradores (2003) lograron aislar los tres genes directamente involucrados en la biosíntesis de bixina, basándose en las secuencias reportadas para enzimas homólogas en *Arabidopsis thaliana* y *Crocus sativus* (Bouvier *et al.*, 2003). Mediante la cotransformación de una cepa recombinante de *E.coli* que acumula licopeno y con la participación de las tres enzimas antes mencionadas, quedó demostrado que el paso inicial de la biosíntesis de bixina, involucra la conversión de licopeno a bixina aldehído por acción de la enzima bixina dioxigenasa (BoLCD). Este compuesto finalmente dará origen a la bixina, por acción de dos enzimas: la aldehído deshidrogenasa (BoBADH) y la norbixina metiltransferasa (BonBMT) (Bouvier *et al.*, 2003), tal como se ilustra en la Figura 1.5.

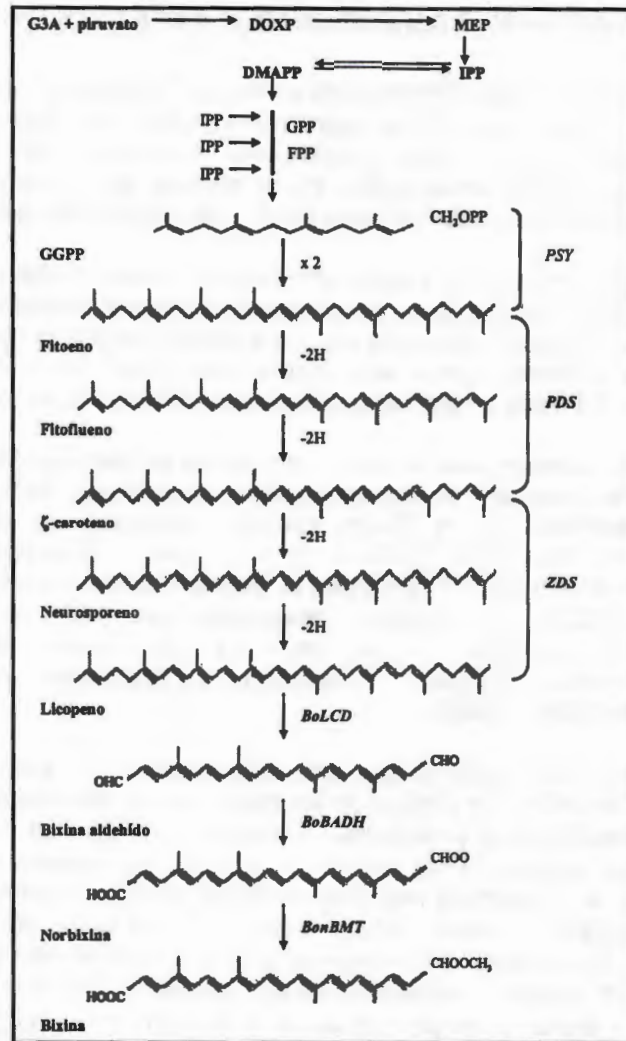


Figura 1.5. Ruta propuesta para la biosíntesis de bixina. G3A, gliceraldehído-3-fosfato; DOXP, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato; MEP, 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato; IPP, isopentenil pirofosfato; DMAPP, dimetilalil pirofosfato; GPP, geranil pirofosfato; FPP, farneil pirofosfato; GGPP: geranil geranil pirofosfato; PSY: fitoeno sintasa; PDS: fitoeno desaturasa; ZDS: ζ-caroteno desaturasa; BoLCD: licopeno bixina dioxigenasa; BoBADH: bixina aldehído deshidrogenasa; BoBMT: norbixina metiltransferasa (Bouvier et al., 2003).

1.1.8 ENZIMAS Y GENES SELECCIONADOS PARA ESTE ESTUDIO.

Para este trabajo se seleccionaron los genes que codifican a cinco enzimas importantes en la producción de isoprenoides (*DXS*, *PSY*, *PDS*, β -*LCY* y ϵ -*LCY*), además de los tres previamente reportados por Bouvier y colaboradores (2003) involucrados en la síntesis de bixina a partir del licopeno (que codifican a las enzimas BoLCD, BoBADH y BonBMT).

En primer lugar, la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (codificada por el gen *DXS*), actúa en la condensación de gliceraldehído-3-fosfato y piruvato para producir 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato, precursor del IPP en los plastidios, y funciona como una enzima regulatoria en la ruta de los isoprenoides plastidial en plantas (Lichtenthaler, 1999) (Figura 1.4).

Por su parte, la condensación de dos moléculas de geranylgeranyl difosfato (GGDP) para producir el primer caroteno denominado fitoeno, es una reacción catalizada por la fitoeno sintasa, codificada por el gen *PSY* (Hugueney *et al.*, 1996; Giuliano *et al.*, 1993). Subsecuentemente, mediante la acción de dos enzimas, la fitoeno desaturasa (codificada en plantas por *PDS*) y la ζ -caroteno desaturasa (gen *ZDS*), se introducen cuatro dobles enlaces en la molécula del fitoeno originándose consecutivamente fitoflueno, ζ -caroteno y finalmente el licopeno (Cunningham & Gantt 1998).

La ciclización del licopeno, por otro lado, denota un punto central de ramificación en la ruta de síntesis de los carotenoides, una ruta conduciendo hacia la formación de β , β -xantofilas, zeaxantina, violaxantina y neoxantina, y la otra ruta conduce a las β , ϵ -xantofilas y luteína, pigmentos bicíclicos involucrados en el aparato fotosintético de las plantas (Bartley & Scolnik, 1995; Cunningham y Gantt, 1998) (Figura 1.4). Por tanto, las actividades relativas de la ϵ -ciclase con respecto a la β -ciclase (codificadas por los genes β -*LCY* y ϵ -*LCY*, respectivamente), pueden determinar el flujo de carotenoides desde el licopeno hacia la formación de α -caroteno (con un anillo ϵ y uno β) o β -caroteno (con ambos anillos β) (Cunningham *et al.*, 1996; Pecker *et al.* 1996), pudiéndose asociar el papel de los genes β -*LCY* y ϵ -*LCY* con la producción de carotenoides cíclicos y xantofilas, pigmentos esenciales para la protección del aparato fotosintético contra las especies reactivas de oxígeno producidas por la sobreexcitación de la clorofila, además de proporcionar colores que varían entre el amarillo, naranja y rojo, a flores y frutos.

Finalmente, el papel de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la biosíntesis de bixina a partir del licopeno, *BoLCD* (licopeno dioxigenasa), *BoBADH* (aldehído deshidrogenasa) y *BonBMT* (metiltransferasa), se basa en los estudios realizados por Bouvier y sus colaboradores (2003) en un sistema heterólogo. Sin embargo, se han aislado EST's a partir de una biblioteca de ADNc de semillas inmaduras de *B. orellana* L. que codifican para diversas presuntas dioxigenasas, aldehído deshidrogenadas y metiltransferasas (Jako *et al.*, 2002), por lo que la posibilidad de que otros genes miembros de dichas familias sean activos para la síntesis de bixina en determinados tejidos de la planta, inclusive a partir de otros precursores diferentes a licopeno, resta por ser confirmada.

1.2 Justificación

La bixina es un colorante natural con usos industriales en la elaboración de una gran variedad de productos que se acumula en las semillas de *B. orellana*. Sin embargo, se ha observado que diferentes morfotipos de *B. orellana* L. presentan variaciones en la cantidad de bixina que producen. De acuerdo a lo anterior, es necesario realizar estudios dirigidos hacia una mejora en la producción de este colorante en los cultivos de *Bixa orellana* L., por ejemplo, a través del uso de herramientas de ingeniería metabólica que posibilite la generación de genotipos estables que acumulen altas cantidades de bixina en sus semillas. Para ello, es necesario conocer qué factores pueden afectar el contenido de este pigmento, tanto en los niveles biológico, bioquímico, como genético molecular. En otras especies, las diferencias en los niveles de expresión de genes involucrados con la carotenogénesis se relacionan con cambios en el contenido de pigmentos. A este respecto, se conoce poco acerca de los genes que pudieran estar regulando el contenido diferencial de bixina en variantes de *B. orellana*. El análisis de expresión transcripcional de genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides y bixina permitirá esclarecer el papel de éstos en la acumulación final de pigmentos.

1.3 Hipótesis

Si la expresión de los genes involucrados en la síntesis de bixina es regulada durante la biosíntesis de carotenoides, entonces su expresión deberá ser diferencial y tal vez presentará una relación directa con la acumulación de bixina observada en los tejidos de variantes de *Bixa orellana* L. que acumulan bixina diferencialmente.

1.4 Objetivos

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de algunos genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides y bixina en tejidos de plantas adultas y durante el desarrollo de la semilla, en dos variantes de *Bixa orellana* L. caracterizadas en base a sus diferencias en la acumulación de bixina en sus semillas.

1.4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estandarizar las condiciones de amplificación por PCR para el análisis de expresión por RT-PCR de los genes *DXS*, *PDS*, *PSY*, β -*LCY* y ϵ -*LCY* previamente aislados en el laboratorio.
2. Diseñar cebadores a partir de secuencias ya reportadas para el aislamiento de los genes *BoLCD*, *BoBADH* y *BonBMT*, así como para la obtención de sondas homólogas específicas para cada gen, mediante el empleo de cebadores específicos.
3. Comparar la expresión de cada uno de los genes sujetos a estudio en los tejidos correspondientes a los órganos de floración y fructificación y en las semillas de dos variantes de *Bixa orellana* L. con acumulación diferencial de bixina.
4. Analizar y cuantificar la acumulación de pigmentos en distintos tejidos y semillas de plantas adultas de dos variantes de *Bixa orellana* L. y comparar la acumulación diferencial de éstos con la expresión de cada uno de los genes objeto de estudio.



Figura 1.6. Estrategia experimental seguida en este trabajo. *DXS*, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa; *PSY*, fitoeno sintasa; *PDS*, fitoeno desaturasa; β -*LCY*, β -licopeno ciclasa; ϵ -*LCY*, ϵ -licopeno ciclasa; *BoLCD*, licopeno bixina dioxigenasa; *BoBADH*, bixina aldehído deshidrogenasa; *BonBMT*, norbixina metil transferasa.

Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1%, para verificar su especificidad y posible identidad por tamaño. Aquellos que produjeron bandas discretas del tamaño estimado para cada gen, se resolvieron en un gel semipreparativo de agarosa al 2%, de donde se purificaron con el sistema de QIAGEN "QIAquick Gel Extraction" (Cat. No. 28704), de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor. El ADN se concentró por precipitación empleando 0.1 vol. de acetato de amonio 7.5M, 1 μ L de glucógeno y 2.5 vol. de etanol, incubación a -80 °C por una hora y centrifugación a 12,000 g, a 4 °C durante 40 minutos. La pastilla se resuspendió en 10 μ L de agua estéril y 7 μ L fueron empleados para la reacción de extensión de extremos poliA de acuerdo al protocolo descrito por Promega para la clonación en el vector pGEM[®]-T Easy. La ligación se realizó con 2 μ L de inserto poliadenilado (10 ng/ μ L), 1 μ L de vector pGEM[®]-T Easy (50ng/ μ L), 5 μ L de buffer 2X Rapid Ligation T4 DNA ligase, 1 μ L de ligasa T4 y 1 μ L de agua libre de nucleasas. Dicha mezcla se dejó incubar durante toda la noche a 4 °C y se usó para la transformación de células competentes de *E.coli* de la cepa DH5 α . La transformación de bacterias se realizó de la siguiente manera: 2 μ L de reacción de ligación se mezclaron con 250 μ L de células competentes (Subcloning Efficiency[™] DH5 α [™] Competent Cells, Cat. No. 18265-017) y se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente, se colocaron en baño María a 42° C por 2 min. y se agregó 1 mL de medio LB ó 2XL. Se incubó a 37° C por 40 min. en orbitador a 225 rpm y se esparcieron alícuotas de 150, 200 y 500 μ L en cajas de Petri con medio Luria Bertani (LB) con ampicilina (1 μ L/mL), como agente de selección y el azúcar X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) a una concentración de 40 μ g/ml, como agente de identificación de bacterias recombinantes. Las bacterias se incubaron a 37° C hasta el crecimiento de colonias. Veinte colonias positivas se seleccionaron al azar, para ser sembradas tanto en medio selectivo (ampicilina 1 μ L/mL) sólido como líquido, e incubadas a 37 °C durante 12 horas. Los cultivos en medio líquido, se emplearon para realizar minipreparaciones de ADN plasmídico utilizando el sistema de QIAGEN "QIAprep Spin Miniprep" (Cat. No. 271006), siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. La pureza e integridad del ADN plasmídico, se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

La identidad de los insertos se confirmó mediante digestión de los plásmidos recombinantes con *Eco* RI, en un volumen de reacción de 15 μ L, conteniendo 3 μ L de plásmido, 1 μ L de *Eco*RI (10 U/ μ L), 1.5 μ L de buffer H 10X y 9.5 μ L de agua libre de nucleasas. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante una hora. Los productos de la digestión se resolvieron en gel de

agarosa a 1%. Además, los productos se analizaron mediante PCR usando como templado los plásmidos recombinantes y como cebadores el juego de oligonucleótidos correspondiente a cada gen. Las mezclas de reacción y condiciones de amplificación fueron similares a las descritas anteriormente.

1.5.4 EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL

El ARN total fue aislado a partir de aproximadamente 50 mg de tejidos de hojas de plantas adultas, semillas inmaduras, semillas maduras, botones florales, flores y cápsulas frutales de los dos morfotipos. Dado que este método de extracción de ARN fue el resultante del ensayo de diversos protocolos incluyendo el uso de un sistema comercial el método se presenta con mayor detalle en el Anexo I.

1.5.4.1 CUANTIFICACIÓN DEL ARN TOTAL

La cantidad del ARN total aislado se cuantificó por espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm, calculándose la concentración con la siguiente fórmula: ARN total (μg)= $A_{260} \times 0.040 \mu\text{g} \times \text{factor de dilución} \times \text{volumen de la muestra} (\mu\text{l})$ (Sambrook, 1989).

1.5.4.2 TRATAMIENTO CON *DNasa I*

Para la eliminación del ADN contaminante la muestras de ARN se trataron con *rDNasa I* (2 U/ml) (Invitrogen, Cat. No. 18068-015), de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

1.5.4.3 SÍNTESIS DEL ADNc

Dicho procedimiento se llevó a cabo empleando una Transcriptasa Reversa SuperScript IIITM (Invitrogen, Cat. No. 18080-093), de acuerdo a las indicaciones el proveedor. En resumen, se empleó un volumen final de 13 μL conteniendo 1 μL de cebador en sentido, 1 μL del cebador en antisentido (a 10 μM , cada uno), 1 μL de mezcla de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP y dCTP a 10 mM cada uno), 100 ng de ARN total y agua destilada estéril, se calentó a 65° C por 5 minutos, se incubó en hielo por 1 minuto. y se le agregó 4 μl de Buffer 5X First-Strand, 1 μl de DTT 0.1 M, 1 μl de RNaseOUTTM Recombinant RNase Inhibitor (Invitrogen, Cat. No. 10777-019, 40 U/ μl) y 1 μl de SuperSriptTM III RT (200 U/ μl), para incubarse nuevamente a 25° C por 5 minutos y a 55° C por 60 minutos. Finalmente, la enzima se inactivó calentando la reacción a 70° C por 15 minutos.

1.5.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN POR RT-PCR

Para las reacciones de PCR se empleó un décimo (2 µl por reacción) del volumen final del ADNc producido. Simultáneamente, se realizaron reacciones de PCR para el gen 18S ARNr, de expresión constitutiva, usando los cebadores 5'CGGCTACCACATCCAAGGAA3' y 5'GCTGGAATTACCGCGGCT3' (GenBank: AF206868). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

1.5.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN POR NORTHERN BLOT

Se emplearon 5 µg de ARN total que fueron desnaturalizados a 65°C y separados por electroforesis a 40V en geles de agarosa desnaturalizantes al 1.5%, conteniendo formaldehído al 15%. El ARN fue transferido de los geles a membranas de nylon (Hybond N+, Amersham Biosciences, Piscatay NJ) (Sambrook, 1989) por capilaridad durante toda la noche empleando amortiguador de citrato de sodio y cloruro de sodio (SSC) 20X (NaCl 17.53%, citrato de sodio 8.82%, pH 7) como solución de transferencia. Cada membrana fue prehibridada a 48 °C durante toda una noche en solución de hibridación Dig Easy Hyb solution (Roche Applied Science, Indianapolis IN) y entonces hibridada a la misma temperatura durante 24 horas, en la misma solución adicionada con la sonda correspondiente. Las sondas empleadas fueron marcadas por PCR con digoxigenina empleando el sistema PCR DIG Probe Synthesis kit (Roche Applied Science) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las membranas hibridadas se lavaron dos veces con 2X SSC, 0.1% SDS por 15 min a temperatura ambiente (baja astringencia), dos veces con 0.5x SSC/0.1% SDS a 65 °C por 15 min (alta astringencia) y se procesaron con el sistema DIG Wash and Block Buffer (Roche Molecular Biochemicals, Cat. No. 1 585 762), empleando el anticuerpo Anti-DIG-alkaline phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Cat. No. 1 585 614) y el sustrato Ready-to-use CSPD (Roche Molecular Biochemicals, Cat. No 2 041 677), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

1.5.7 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN POR RT-PCR *IN SITU*

Para este tipo de análisis se emplearon raíces y tallos de plántulas de 30 días de edad y raíces laterales y tallos de ramas laterales de plantas adultas. Adicionalmente, se colectaron semillas inmaduras correspondientes a seis estadios de desarrollo del fruto (Figura 1.9).



Figura 1.9. *Estadíos de desarrollo de frutos inmaduros de Bixa orellana L. seleccionados para este estudio.*

Estos experimentos se basaron en los trabajos realizados por Pérez-Núñez y colaboradores (2006) y Przybecki *et al.*, 2008. Los tejidos fueron colectados y fijados en fresco en piezas de aproximadamente 5 x 2 mm, para ser incubados en la solución de ARN Later (Ambion) a 4 °C durante 24 h. Los tejidos se lavaron 3 veces por 10 min en solución de etanol al 63% (v/v) y ácido acético 5% (v/v) y una vez más con amortiguador salino de fosfatos PBS (Phosphate Buffered Saline, 10 mM de fosfato de sodio y 130 mM de cloruro de sodio, pH 7.5). Las muestras fueron embebidas en agarosa de bajo punto de fusión al 5%, preparada con PBS, y se guardaron a 4 °C hasta su empleo. Los bloques de agarosa con los tejidos, se cortaron y montaron con pegamento comercial (KolaLoka, E.I. du Pont) a bloques de micrótopo, para realizar cortes de 40 μ m de espesor (Pérez-Núñez *et al.*, 2009). Con agua desionizada libre de RNasas, se retiró la agarosa adherida a los cortes que se colocaron en tubos de PCR conteniendo 25 μ l de mezcla de reacción de transcripción inversa/PCR One Step RT/PCR (Invitrogen), conteniendo 0.1 μ M de cebadores y nucleótidos marcados con digoxigenina (DIG-dUTP, Roche, USA). Una vez terminados los procesos de transcripción inversa y amplificación (35 ciclos), las muestras se lavaron por 5 min con PBS y se bloquearon con 100 μ l de amortiguador de bloqueo (Roche Molecular Biochemicals, Cat. No. 1 585 762) durante 30 min. La presencia de productos de PCR en las muestras fue revelada incubando por 1 hora en 100 μ l del anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina (Roche Molecular Biochemicals, Cat. No. 1 585 614), diluído 1:100 en amortiguador de bloqueo. La detección se realizó usando como sustrato 100 μ l de solución preparada con NBT/BCIP (Nitro Blue Tetrazolium /5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate, Roche Molecular Biochemicals, Cat. No. 11 697 471 001). El desarrollo de color fue monitoreado por microscopio y parado con agua libre de RNasas. Las muestras fueron analizadas por microscopía óptica.

1.5.8 CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS POR HPLC

Para analizar y cuantificar la acumulación de fitoeno, licopeno, clorofila a, β -caroteno, ABA y bixina se utilizaron los disolventes acetonitrilo, metanol, isopropanol y tetrahidrofurano, los cuales evitan la isomerización durante la extracción de carotenoides (Ball, 1992). Se emplearon 10 mg de material vegetal liofilizado y pulverizado, que fueron tratados con 1 mL de acetonitrilo/metanol/isopropanol, en una proporción 75:10:15 (Wagner & Warthesen, 1995; E-Siong *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 1997; Anguelova & Warthesen, 2000; Arias *et al.*, 2000 y Xu *et al.*, 2006). La muestra fue agitada y centrifugada a 14,000 rpm por 10 min, para recuperar el sobrenadante que se se filtró (para eliminar las impurezas) y se inyectó en una columna de fase reversa Hypersil ODS C-18 (250 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro, tamaño de partícula de 5 μ m) con un flujo de 1 mL/min, para registrar las lecturas a longitudes de onda de 450 nm para los carotenoides (Anguelova & Warthesen, 2000; Xu *et al.*, 2006; Koca *et al.*, 2007) a excepción de fitoeno, para el que se utilizó una λ 280 nm (UV) para fitoeno (Fraser *et al.*, 2000; Iwata-Reuyl *et al.*, 2003). Como segunda fase móvil, para eliminar las impurezas se empleó tetrahidrofurano. Las curvas de calibración se realizaron con estándares (Sigma), identificándose cada pigmento en base a su tiempo de retención (Britton, 1995). Todo el proceso de extracción y medición se realizó con luz tenue y a bajas temperaturas, para evitar la degradación de los pigmentos.

1.5.9 CUANTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Diez mg de material vegetal liofilizado y pulverizado se trataron con 1 mL de cloroformo grado reactivo (Solovchenko *et al.*, 2001). Los extractos fueron filtrados a través de una membrana de 0.45 μ m de poro y disueltos en cloroformo, en proporción 1:9, en un volumen final de 1 mL. La medición se hizo en un espectrofotómetro DU-650 Beckman Coulter a longitudes de onda de 480, 666 y 648 nm (Wellburn, 1994). Las mediciones obtenidas se sustituyeron en la ecuación de Wellburn (1994), para la obtención de los valores correspondientes:

$$\text{Carotenoides Totales: } (1000 * A_{480}) - (1.42 * A_{666}) - (46.09 * A_{648}) / 202$$

1.6 Referencias

1. Aharoni A, AP Giri, FW Verstappen, CM Berteaux, R Sevenier, Z Sun, MA Jongsma, W Schwab and Bouwmeester HJ (2004). *Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species*. The Plant Cell, 16(1), 3110–3131.
2. Alberts B, D Bray, J Lewis, M Raff, K Roberts and JD Watson (1991). “Energy conversion: mitochondria and chloroplasts”, in *Molecular biology of the cell*, Third edition. Alberts B, A Johnson, J Lewis, M Raff, K Roberts, P Walter (eds). Garland Publishing, Inc. New York. pp. 653-720.
3. Anguelova T and J Warthesen (2000). *Degradation of lycopene, α -carotene, and β -carotene during lipid peroxidation*. Food Chemistry and Toxicology. 65(1), 71-75.
4. Arce J (1999). *El achiote Bixa orellana L. Cultivo promisorio para el trópico*. Primera Edición. Editorial Earth, Costa Rica. 49 p.
5. Ávila A, L Barquero and J Calzada (1982). *Una mejora en el método de determinación de bixina en achiote*. Ingeniería y Ciencia Química, San José, Costa Rica. p. 209-210.
6. Bach TJ (1987). *Synthesis and metabolism of mevalonic acid in plants*. Plant Physiology and Biochemistry, 25(2), 163-178.
7. Bach T, T Weber and A Motel (1990). “Some properties of enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in plants”, in *Recent Advances in Phytochemistry*, Vol. 24. Biochemistry of the mevalonic acid pathway to terpenoids. Towers GHN and HA Stafford (eds). New York: Plenum Press, pp.1-82.
8. Ball GFM (1992). “The fat-soluble vitamins”, in: Nollet LML. Food Analysis by HPLC. New York. Marcel Dekker, Inc.
9. Bao-Cai T, K Cline and DR McCarty (2001). *Localization and targeting of the VP14 epoxy-carotenoid dioxygenase to chloroplast membranes*. Plant Journal, 27(5), 373-382.

10. Bartley GE and PA Scolnik (1995). *Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health*. Plant Cell, 7(1), 1027-1038.
11. Bick JA and BM Lange (2003). *Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 415(2), 146-154.
12. Bittencourt C, MP Felicissimo, JJ Pireaux and L Houssiau (2005). *Study of annatto from Bixa orellana L. seeds: an application of time-of-flight secondary ion mass spectrometry*. SpectroscopyEurope, 17(2), 16-22.
13. Bouvier F, O Dogbo and B Camara (2003). *Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto)*. Science, 300(5628), 2089-2091.
14. Britton G (1995). "UV/visible spectroscopy", In *Carotenoids*, Vol. 1B. Britton S, Liaaen-Jensen and H Pfander (eds). Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel , pp.13-62.
15. Contin A, R Van Der Heiden, A Lefeber and R Verporte (1998). *The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/piruvate pathway in a Catharanthus roseus cell culture*. FEBS Letters, 434(3), 413- 416.
16. Cunningham FX and E Gantt (1998). *Genes and enzymes of carotenoids biosynthesis in plants*. Annual Review of Plant Physiology, 57(1), 557-583.
17. Cunningham FX, B Pogson, Z Sun, KA McDonald, D DellaPenna and E Gantt (1996). *Functional analysis of the β and ϵ lycopene cyclase enzymes of Arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation*. The Plant Cell, 8(9), 1613-1626.
18. Del Villar-Martínez AA, PA García-Saucedo, A Carabez-Trejo, A Cruz-Hernández and O Paredes-López (2005). *Carotenogenic gene expression and ultrastructural changes during development in marigold*. Plant Physiology, 162(9), 1046-1056.

19. Dudareva N, S Andersson, I Orlova, N Gatto, M Reichel, D Rhodes, W Boland and J Gershenzon (2005). *The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers*. *Plant Biology*, 102(3), 933-938.
20. Dudareva N and E Pichersky (2008). *Metabolic engineering of plant volátiles*. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(1), 1-9.
21. Eisenreich W, F Rohdich and A Bacher (2001). *Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids*. *Trends in Plant Science*, 6(2), 78–84.
22. Eisenreich W, A Bachera, D Arigonib and F Rohdicha (2004). *Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway*. *Cellular and Molecular Life Science*, 61(12), 1401–1426.
23. Enfissi A, PD Fraser PD and PM Bramley (2006). *Genetic engineering of carotenoid formation in tomato*. *Phytochemistry Reviews*, 5(1), 59-65.
24. E-Siong T, G Ah-Heng and K Swan-Choo (1995). *Carotenoid composition and content of legumes, tubers and starchy roots by HPLC*. *Malaysian Journal of Nutrition*. 1(1), 63-74.
25. Fraser PD, W Schuch and P. Bramley (2000). *Phytoene synthase from tomato (Lycopersicon esculentum) chloroplasts – partial purification and biochemical properties*. *Planta*, 211(3), 361-369.
26. Giuliano G, GE Bartley and PA Scolnik (1993). *Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development*. *Plant Cell*, 5(4), 379-387.
27. Giuliano G, C Rosati and PM Bramley (2003). *To dye or not to dye: biochemistry of annato unveiled*. *Trends in Biotechnology*, 21(12), 513-516.
28. Giuliano G, R Tavazza, G Diretto, P Beyer, and MA Taylor (2008). *Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants*. *Trends in Biotechnology*, 26(3), 139-145.
29. Gobierno del Estado de Yucatán (2002). *Enciclopedia de los Municipios de México: Chicxulub Pueblo, Yucatán*. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. H. Ayuntamiento de Chicxulub Pueblo. <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/yucatan/municipios/31020a.html>

30. Grotewold E (2006). *The genetics and biochemistry of floral pigments*. Annual Reviews of Plant Biology, 57(1), 761-80.
31. Hemmerlin A, J Hoefler, O Meyer, D Tritsch, IA Kagan, C GrosdemangeBilliard, M Rohmer and TJ Bach (2003). *Crosstalk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells*. Journal of Biological Chemistry. 278(29): 26666-26676.
32. Huguenev P, F Bouvier, A Badillo, J Quennemet, A D'Harlingue and B Camara (1996). *Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits*. Plant Physiology, 111(2), 619-626.
33. Iwata-Reuyl D, KM Shivanand, BD Shrivallabh and CD Poulter (2003). Bacterial phytoene synthase: molecular cloning, expression and characterization of Erwinia herbicola phytoene synthase. *Biochemistry*. 42 (11), 3359-3365
34. Jako C, C Coutu, I Roewer, DW Reed, LE Pelcher and PS Covello (2002). *Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of Bixa orellana L. (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis*. Journal of Plant Science, 163(1), 141-145.
35. Johnson A and M Peterson (1974). *Encyclopedia of food technology*. The AVI Publishing Company. Westport, Connecticut.
36. Jondiko IJ and G Pattenden (1989). *Terpenoids and apocarotenoid from seeds of Bixa orellana L.* Phytochemistry, 28(11), 3159-3162.
37. Kappers IF, A Aharoni, TWJM van Herpen, LLP Luckerhoff, M Dicke and HJ Bouwmeester (2005). *Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to Arabidopsis*. Science, 309(5743), 2070-2072.
38. Karunagoda R and K Nabeta (2004). *Biosynthesis of chloroplastidic isoprenoids in liverworts: uptake of farnesyl diphosphate by the chloroplasts of Heteroscyphus planus and Ptychanthus striatus*. Tropical Agricultural Research, 16(1), 214-222.

39. Kato M, Y Ikoma, H Matsumoto, M Sugiera, H Hyodo and M Yano (2004). *Accumulation of carotenoids and expresión of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit*. Plant Physiology, 134(1), 824-837.
40. Koca N, HS Burdurlu and F Karadeniz (2007). *Kinetics of colour changes in dehydrated carrots*. Journal of Food Engineering, 78(2), 449-455.
41. Levy LW, E Regaladoa, S Navarrete and RH Watkinsb (1997). *Bixin and norbixin in human plasma: Determination and study of the absorption of a single dose of annatto food color*. Analyst, 122(1), 977–980.
42. Lichtenthaler H, J Scwender, A Disch and M Rohmer M (1997). *Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplast proceeds via a mevalonate-independent pathway*. FEBS Letters, 400(3), 271-274.
43. Lichtenthaler HK (1999). *The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants*. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50(1), 47–65.
44. Lintig J and K Vogt (2004). *Vitamin A formation in animals: molecular identification and functional characterization of carotene cleaving enzymes*. The Journal of Nutrition, 134(Suppl.), 251S-256S.
45. Mercadante A, A Steck, D Rodríguez-Amaya, H Pfander and G Britton (1996). *Isolation of methyl 9'Z-apo-6'-lycopenate from Bixa orellana L*. Phytochemistry, 41(4), 1201-1203.
46. Mercadante A, A Steck and H Pfander (1997). *Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (Bixa orellana L.) seeds*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 45(4), 1050-1054.
47. Nabeta K, T Kawae, T Saitoh and T Kikuchi (1997). *Synthesis of chlorophyl a and β-carotene from ²H and ¹³C-labeled mevalonates and ¹³C-labeled glycine in cultures cell of liverworts Heteroscyopus planus and Lophocolea heterophylla*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions, 1(1), 261-267.
48. Ogura K and T Koyama (1998). *Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation*. Chemical Reviews, 98(4), 1265-1276.

49. Pecker I, R Gabbay, FX Cunningham and J Hirschberg (1996). *Cloning and characterization of the ADNC for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening*. *Plant Molecular Biology*, 30(4), 807-819.
50. Pérez-Núñez MT, R Souza, L Sáenz, JL Chan, JJ Zúñiga-Aguilar and C Oropeza (2009). *Detection of a SERK-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos*. *Plant Cell Reporters*, 28(1), 11-19.
51. Przybecki Z, E Siedlecka, M Filipecki and E Urbanczyk-Wochniak (2006). *In Situ Reverse Transcription PCR on plant tissues*. *Methods in Molecular Biology*, 334(1), 181-198.
52. Qin X and JAD Zeevaart (1999). *The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 15354-15361.
53. Rivera-Madrid R, RM Escobedo-Gracia Medrano, E Balam-Galera, M Vera-Ku and H Huges (2006). *Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (Bixa orellana L.)*. *Scientia Horticulturae*, 109(2), 165-172.
54. Rodrigo MJ, JF Marcos and L Zacañas L (2004). *Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (Citrus sinensis L.) during fruit development and maturation*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52(22), 6724-6731.
55. Rodríguez-Concepción M and W Grissem (1999). *Arachidonic acid alters tomato HMGR expression and fruit growth and induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent lycopene accumulation*. *Plant Physiology*, 119(1), 41-48.
56. Rodríguez-Concepción M (2006). *Early steps in isoprenoid biosynthesis: Multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells*. *Phytochemistry Reviews*, 5(1), 1-15.
57. Rohmer M (1999). *A mevalonate independent route to isopentenyl diphosphate*. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 2(1), 45-67.

58. Sambrook J, EF Fritsch and T Maniatis (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1659 p.
59. Schwartz SH, BC Tan, DA Gage, JAD Zeevaart and DR McCarty (1997). *Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of Maize*. Science, 276(5320), 1872-1874.
60. Schwartz SH, X Qin and JAD Zeevaart (2001). *Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants*. Biochemistry Journal, 276(1), 25208-25211.
61. Schwartz SH, X Qin and MC Loewen (2004). *The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from Arabidopsis indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching*. Biochemistry Journal, 279(1), 46940-46945.
62. Simkin AJ, SH Schwartz, M Aldridge, MG Taylos and HJ Klee (2004). *The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone*. Plant Journal, 40(6), 882-892.
63. Snowden KC, AJ Simkin, BJ Janssen, KR Templeton, HM Loucas, JL Simons, S Karunairetnam, AP Gleave, DG Clark and HJ Klee (2005). *The decreased apical dominance 1/petunia hybrida carotenoid cleavage dioxygenase gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development*. The Plant Cell, 17(1), 746-759.
64. Solovchenko AE, OB Chivkunova, MN Merzlyak and IV Reshetnikova (2001). *Spectrophotometric analysis of pigments in apples*. Russian Journal of Plant Physiology. 48(5), 693-700.
65. Standley PC and LO Williams (1961). *Flora of Guatemala*. Fieldiana: Botany. Vol. 24. Part VII. Number I. Chicago Natural History Museum. pp.66.
66. Takagi M, T Kuzuyama, S Takahashi S and H Seto (2000). *A gene cluster for the mevalonate pathway from Streptomyces sp. Strain CL190*. Journal of Bacteriology, 182(15), 4153-4157.

67. Tirimana AS (1981). *Study of carotenoid pigments of Bixa orellana L. seeds by thin layer chromatography*. *Mikrochimica Acta*, 76(1-2), 11-16.
68. Umeno D, AV Tobias and FH Arnold (2005). *Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(1), 51-78.
69. Valdez-Ojeda R, LJ Hernandez-Stefanoni, M Aguilar-Espinosa, R Rivera-Madrid, R Ortiz and CF Quiros (2008). *Assessing Morphological and Genetic Variation in Annatto (Bixa orellana L.) by Sequence-related Amplified Polymorphism and Cluster Analysis*. *Scientia Horticulturae*, 43(7), 2013 - 2017.
70. Vothknecht UC and J Soll (2006). "Protein import into chloroplasts: Who, When and How?", in *The structure and function of plastids*, Wise RR and JK Hooper (eds). Springer, the Netherlands. pp: 53-74.
71. Wagner LA and Warthesen (1995). *Stability of Spray-Dried Encapsulated Carrot Carotenes*. *Journal of Food Science*, 60(5), 1048-1053.
72. Wedt K and G Schulz (1998). *Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes*. *Structure*, 6(2), 127-133.
73. Wellburn AR (1994). *The spectral determination of chlorophyll a and chlorophyll b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution*. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307-313.
74. Wise RR (2006). "The diversity of plastids form and function", in *The structure and function of plastids*, Wise RR and JK Hooper (eds). Springer, The Netherlands. pp: 3-26.
75. Wu S, M Schalk, A Clark, RB Miles, R Coates and J Chappell (2006). *Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants*. *Nature Biotechnology*, 24(11), 1441-1447.
76. Zotyen QA (2002). *Compendio. Cultivo del achiote Bixa orellana L.* División de Agronegocios, DGEA. Ministerio de Agricultura y Ganadería. El Salvador. pp. 87.

En los siguientes capítulos se detallan los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación. Algunos de éstos fueron organizados en forma de manuscritos para ser sometidos a diferentes revistas. Éstos han sido ordenados y presentados de acuerdo a la secuencia de los objetivos particulares que se abordan en cada apartado.

Capítulo II

Regulation of pigment-related genes during flower and fruit development of *Bixa orellana*

Rodríguez-Ávila Norma, Narváez-Zapata José A., Aguilar-Espinosa Margarita and Rivera-Madrid Renata.

En este capítulo se presenta el manuscrito preparado para la revista Plant Molecular Biology Reporter, el cual fue publicado en línea con el DOI 10.1007/s11105-010-0207-z. Se describen los resultados de la estandarización de las condiciones de amplificación por PCR para el análisis de la expresión de los genes *DXS*, *PDS*, *PSY*, β -*LCY* y ϵ -*LCY* previamente aislados en el laboratorio. Asimismo, se comparan y discuten los perfiles de expresión obtenidos para cada uno de estos genes en función de las diferencias observadas en el contenido de pigmentos en diferentes tejidos correspondientes a dos variedades de *Bixa orellana* L. caracterizadas por su acumulación diferencial de bixina.

2.1 Abstract

Annatto (*Bixa orellana*) is the sole source of the commercially important pigment bixin. The broad diversity of annatto phenotypes and the wide variation in pigment contents have restricted its use. Therefore, genetic improvement focusing on this variation is important in order to achieve optimal exploitation of annatto. To characterize and understand some of the genetic basis governing carotenoid production, two annatto cultivars with either pink or white flowers were selected on the basis of their contrasting pigment levels. Several cDNA-probes corresponding to genes involved in carotenoid biosynthesis (*dxs*, *psy*, *pds*, β -*lcy* and ϵ -*lcy*) were cloned and analyzed by RT-PCR in different tissues of these two annatto cultivars during flower and fruit development. In general, expression of most selected genes could be associated with pigment over accumulation in these cultivars. The pink cultivar exhibited higher carotenoid contents and higher pigment-related gene expression, and the two variants analyzed showed notable differences in gene expression in the highest pigment producing tissues.

2.2 Keywords

Annatto, *Bixa orellana*, Bixin, Carotenoids, Gene expression

2.3 Introduction

Carotenoids are derived from the isoprenoid biosynthetic pathway and are responsible for many of the red, orange, and yellow colours of plant flowers, fruits, and leaves (Wagner *et al.*, 2002). In plants, the carotenoid pathway begins with the synthesis of the isoprenoid isopentenyl pyrophosphate (IPP; Fig. 2.1). The biosynthesis of IPP is catalyzed by 1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase (DXS) coded by the *dxs* gene (Lichtenthaler, 1999). Subsequent biosynthesis of carotenoids from IPP involves a common route including their conversion into geranylgeranyl diphosphate (GGPP), which is the substrate for formation of the phytol (chlorophyll side chain) and the C₄₀ molecule phytoene. Phytoene formation is catalyzed by phytoene synthase (PSY) coded by the *psy* gene and is considered the first regulatory step in carotenogenesis. Subsequently, through desaturation, catalyzed by two desaturase enzymes, phytoene desaturase (PDS) and ζ -carotene desaturase (ZDS), the colorless phytoene is transformed to the pink-red lycopene (Isaacson *et al.* 2002). Consequently, lycopene can be transformed into different lineal apocarotenoids such as crocetin and bixin, which are commercially valuable (Pfander & Schurtenberger 1982; Bouvier

et al., 2003). In plants two enzymes lead the cyclization of lycopene; lycopene- ϵ -cyclase (E-LCY) coded by ϵ -*lcy* and involved with the production of α -carotene, and lycopene- β -cyclase (B-LCY) coded by β -*lcy* which converts lycopene into β -carotene (Cunningham *et al.*, 1996). This last cyclic molecule can be modified by the action of dioxygenases, hydroxylases and epoxidases to produce physiologically important β -apocarotene such as abscisic acid (ABA) (Cunningham, 2002).

Annatto (*Bixa orellana*) is a tree-shrub native to the Neotropics with seeds that contain high quantities of pigments, the apocarotenoid bixin being the most abundant (Bittencourt *et al.* 2005a). Bixin is the second most commonly used natural industrial colorant (Giuliano *et al.*, 2003). Nevertheless, the demand for bixin is not met by its supply because of the heterogeneity of bixin concentrations present in different commercial variants of annatto (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). The genetic regulation of the main pigment-related genes during the annatto plant's development and the accumulation of pigments still remain unknown. This has limited the effort made to classify the annatto cultivars based on bixin content and morphological traits.

In the present study, the transcriptional expression of five key genes, *dxs*, *psy*, *pds*, ϵ -*lcy* and β -*lcy*, encoding enzymes related to carotenoid biosynthesis were investigated in two cultivars of *B. orellana* with white or pink flowers and contrasting bixin accumulation in their mature seeds (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). The analysis was complemented by total carotenoids and specific carotenoid-related molecules recorders. The expression response of these genes in both annatto plants could provide insights into the understanding of the molecular basis of carotenoid biosynthesis and accumulation during the genetic improvement process in this plant.

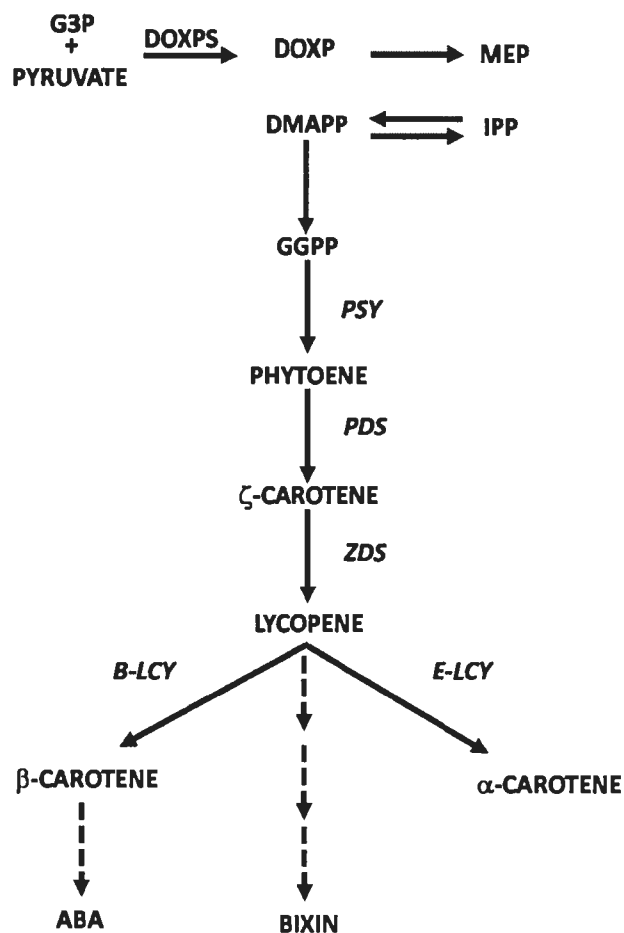


Figure 2.1. Simplified carotenoid biosynthetic pathway. Lycopene can be directed to the production of lineal carotenoids such as bixin, or cyclic carotenoids through the action of alpha and beta lycopene cyclase enzymes. G3P: glyceraldehyde-3-phosphate, DOXPS: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DOXP: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate, MEP: 2-C-methyl-D-erythritol-2, 4-cyclodiphosphate, IPP: isopentenyl diphosphate, GGPP: geranylgeranyl diphosphate, PSY: phytoene synthase, PDS: phytoene desaturase, ZDS: ζ-carotene desaturase. B-LCY: β-carotene desaturase, E-LCY: ε-carotene desaturase ABA: abscisic acid.

2.4 Materials and Methods

2.4.1 PLANT MATERIAL

Samples of leaf, floral bud, open flower, immature fruit, immature seed and mature seed tissues (from mature and dehiscent fruit) were taken from two *B. orellana* cultivars. These samples were collected from March to April of 2008 at a commercial plantation in Chicxulub, Yucatan, Mexico. These variants were characterized as pink variant and white variant based on morphological and reproductive characteristics (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Fresh tissues were photographically documented (Fig. 2.2) and then immediately frozen in liquid nitrogen, kept at -80°C for use in gene expression and pigment analysis.

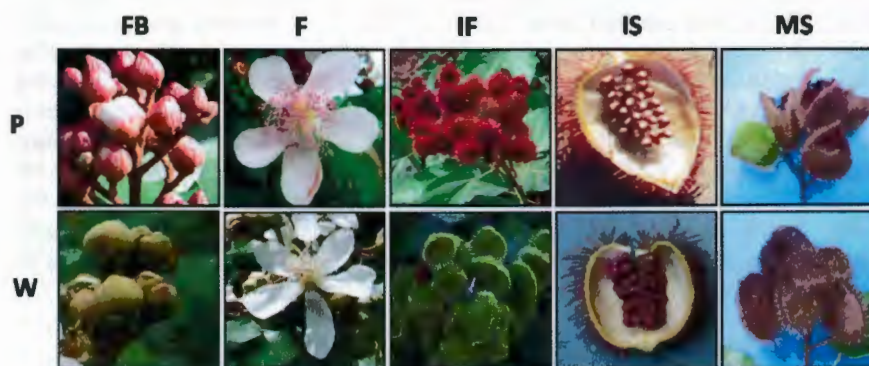


Figure 2.2. Morphological characteristics and bixin production for floral and fructification organs in two annatto cultivars. **P:** pink cultivar with pink flowers, red floral buds and red fruit capsules; **W:** white cultivar with white flowers, green floral buds and green fruit capsules. **L:** leaves, **FB:** floral buds, **F:** flower, **IF:** capsules of mature fruit, **IS:** immature seeds, **MS:** mature seeds.

2.4.2 METABOLITE ANALYSIS

Total carotenoids were measured using a spectrophotometric analysis, by extracting pigments from 10 mg of freeze-dried tissues with 10 ml of chloroform in semi-darkness in an ice water bath. Each mixture was shaken vigorously for 5 min, filtered through a $0.45\ \mu\text{m}$ nylon membrane and transferred to a 15 ml tube. Then, $100\ \mu\text{l}$ of each extract was adjusted to 3ml

of chloroform and then measured with a spectrophotometer (resolution range 1-4 nm from 400-700 nm) (DU 650 Beckman Coulter). Extracts were measured at A_{404} to A_{480} nm and the content was calculated using the equation reported by Wellburn (1994). Both HPLC and spectrophotometric results were the mean of three replicates; each was measured three times \pm standard error.

Specific carotenoid related molecules, such as bixin, β -carotene, chlorophyll *a* and ABA were extracted from the different powdered tissues (0.1 g of tissues) with 1 ml of acetonitrile/methanol/isopropanol 75:10:15 (v/v/v) in a 1.5 mL microcentrifuge tube. Tubes were vortexed, centrifuged at 14000 rpm for 10 min (Eppendorf Model 5414; Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY) and the supernatant filtered using Millex-GV13, (Durapore PVDF, 13 mm diam. 0.22 μ m pore size. Millipore, Billerica, MA). From this mixture, 25 μ L was applied to a Hypersil ODS C-18 reverse phase column (25 cm x 4.6 mm; 5- μ m diameter beads) with a flow rate of 1 mL min⁻¹. The mobile phase consisted of solvent A (acetonitrile/methanol/isopropanol [75:10:15 by volume]) and solvent B (tetrahydrofuran, THF) and the column developed as follows: Step 1, 100% solvent A at injection, for 15 min; Step 2, linear increase to 100% solvent B in 4 min; Step 3, 100% solvent B for 16 min; Step 4, return to 100% solvent A for 1 min; Step 5, 100% solvent A for 25 min. Calibration curves were constructed using pigment standards (Sigma) and were identified based on their column retention time relative to known standards and the absorption spectra of individual peaks.

2.4.3 ISOLATION OF PIGMENT-RELATED PROBES

Five genes encoding for key carotenoid biosynthesis enzymes were isolated from cDNA using PCR amplification with different sets of degenerate primers (Table 1). These primers were designed by aligning conserved regions of orthologous genes of other plants. Although unspecific amplifications were obtained in most cases, it was possible to obtain PCR-products with high identities to the genes analyzed in this study. Sequence information of these PCR-fragments was used to design a new set of specific primers to carry out the RT-PCR expression analysis (see Table 1). The cDNA was synthesized from mRNA isolated from thirty day-old *Bixa orellana* seedlings. All amplifications were performed with 50 μ l of PCR reaction mix containing 5 μ l of reaction buffer, 5 units of *Taq* polymerase (Gibco-BRL, Rockville, MD), 1.5 mM MgCl₂, 50 pmol of each primer, 120 μ M dNTPs and 200 ng of template cDNA. The PCR reaction conditions (except for annealing temperature; see Table 1) were similar for all amplifications: initial denaturation at 94°C for 3 min, 35 cycles at 94°C (1.5 min) for denaturation,

different annealing temperatures according to primer combination (1.5 min), 72°C (1.5 min) as extension temperature, and a final extension at 72°C for 10 min. Different PCR products (see Table 1) were purified using the Promega Wizard PCR Preps Purification System (Promega, Madison, WI), cloned in a TA cloning kit (Invitrogen, San Diego, CA) and then sequenced in an automatic sequencer (Davis Sequencing, LLC). The resulting sequences were blasted manually against the current database (National Center for Biotechnology Information, NCBI) and any homologies were confirmed with the CLUSTALW program (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multialign>). Phylogenetic analysis was performed following the UPGMA method using the free CLC Sequence Viewer software (<http://www.clcbio.com/>).

2.4.4 MEASUREMENT OF mRNA BY REVERSE TRANSCRIPTASE-MEDIATED PCR

Total RNA for the RT-PCR analysis was isolated following the protocol reported by Rodríguez-Ávila et al (2009). The SuperScript III First-Strand Synthesis System for the RT-PCR kit (Invitrogen, San Diego, CA) was used to synthesize cDNA according to kit instructions. RNA concentration was measured spectrophotometrically and 2 µg was added to the cDNA synthesis reaction. After reverse transcription, the cDNAs of *dxs*, *psy*, *pds*, β - and ϵ -lycopene cyclases were amplified by PCR. One-tenth (2 µl per reaction) of the final cDNA product volume was added to PCR reactions specific to each gene analyzed. PCR tubes specifically for amplification of individual carotenoid-related genes and containing all the reaction components except the template were prepared in advance and frozen at -80 °C until use. Specific primer combination and melting temperature conditions are summarized in Table 1. A parallel reaction with 25 cycles and specific primers (5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' and 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3') for 18S rRNA (GenBank accession no. AF206868) was run as a constitutive control for each PCR reaction. Replicates of each PCR reaction were carried out to confirm the results. The PCR amplification products were separated by electrophoresis on 2 % agarose gels and stained with ethidium bromide. The relative amounts of mRNA were confirmed using a Bio-Image Analyzer GS25 (BioRad, Hercules, CA). Preliminary PCR products were sequenced to verify identity in all cases.

2.5 Results

2.5.1 METABOLITES ANALYSIS

The concentration of total carotenoids varied in all stages of development for the plants studied, with the highest concentration generally found in mature seeds (Fig. 2.3). In addition, some specific carotenoid related molecules were also evaluated. In this way, chlorophyll *a* contents were measured as an indirect indicator of the photosynthetic process. The white cultivar exhibited greater accumulation of chlorophyll *a* than the pink cultivar. Green tissues of this annatto cultivar such as immature fruits and flower buds also accumulated high chlorophyll *a* contents. The pink cultivar only accumulated chlorophyll *a* in its leaves. Another important photosynthetic carotenoid pigment, β -carotene, was also measured. However, β -carotene contents were only detected in the leaves of both cultivars (data not shown). Specific carotenoid derivatives, such as apocarotenoids, were also evaluated. Significant differences in the bixin contents were observed in the two annatto cultivars (Fig. 2.3B). Pink cultivars exhibited higher bixin content in mature seeds even when bixin accumulation began at the immature seed stage. The contents of the β -apocarotenoid ABA were also evaluated in order to find out the role of the β -*lcy* gene in regulating the proportion of carotenoids directed to each branch of the carotenoid pathway and driving the carotenoid diversification observed in annatto plants (Fig. 2.3C). Thus, ABA presented higher concentrations in the tissues of the white variant and in general in those tissues of both annatto cultivars where the lowest bixin accumulation was observed.

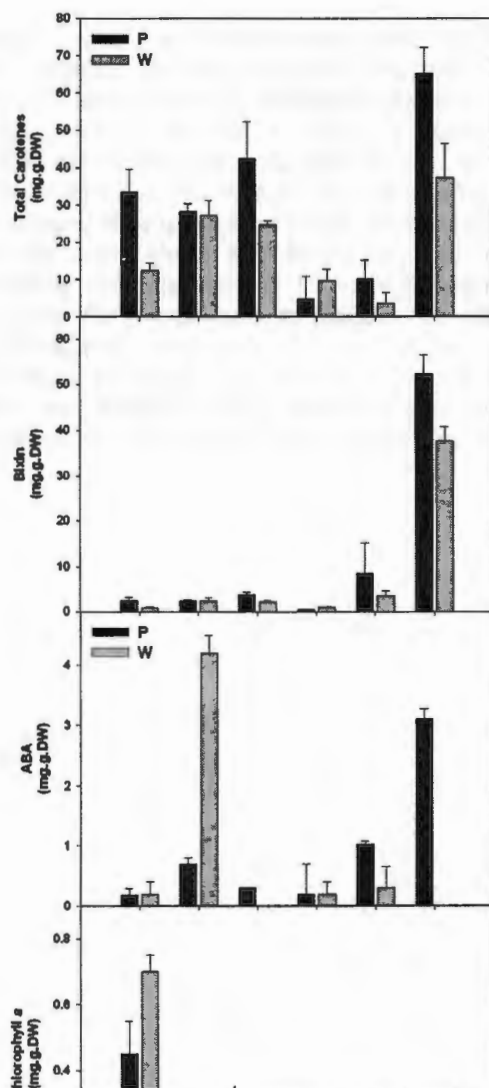


Figure 2.3. Total carotenoids and specific carotenoid-related molecules in different plant tissues. **A:** Total carotenoid contents, **B:** Bixin contents, **C:** ABA contents, **D:** Chlorophyll a contents. Each value is the Mean \pm STD, $n=3$. **L:** leaves, **FB:** floral buds, **F:** flower, **IF:** capsules of mature fruit, **IS:** immature seeds, **MS:** mature seeds. **P:** pink cultivar, **W:** white cultivar.

2.5.2 ISOLATION OF PIGMENT-RELATED PROBES

Partial probes of the carotenoid-related genes *dxs*, *psy*, *ε-lcy* and *β-lcy* from *B. orellana* L. were isolated using degenerate primers designed from conserved regions in orthologous genes of other plants. Genbank accession numbers are summarized in Table 1. All the resulting sequences were suitable probes due to their reliable size, high similarity when blasted with other orthologous genes, and high conservation levels when aligned with other carotenoid-related genes. When compared with sequences reported in the public database, the probes of this study were shown to have a percentage identity from 86 % to 99 %. *dxs* and *psy* probes exhibited the highest identity (99 %) with respect to *dxs* and *psy* orthologous genes from *Arabidopsis thaliana*. *pds*, *β-lcy* and *ε-lcy* also presented high levels of identity (86 to 88 %) with other orthologous genes from plants (Table 2.1). The identity of probes was reflected in the UPGMA tree showing a short distance of 0.9 to 0.2 with reference to other plant orthologous genes (Fig. 2.4).

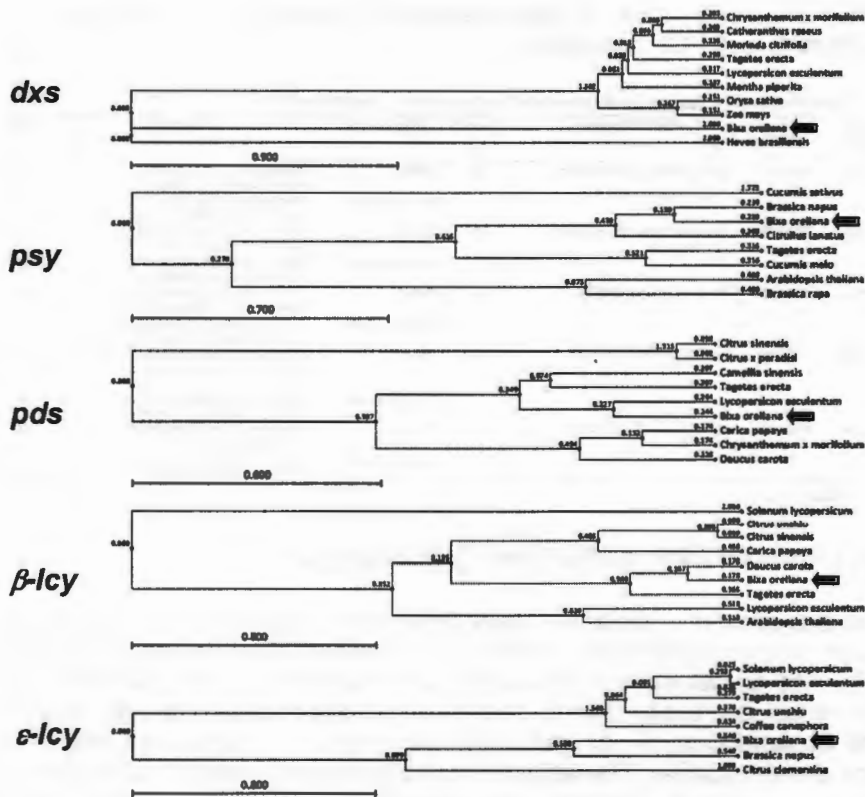


Figure 2.4. Phylogenetic trees of obtained probes compared with related genes of different plants. The trees were constructed according to UPGMA analysis. **A:** *Bixa orellana* DXS, **B:** *Bixa orellana* PSY, **C:** *Bixa orellana* PDS, **D:** *Bixa orellana* LYCE, and **E:** *Bixa orellana* LYCB. Arrows indicate the sequences reported in this study.

Table 2.1. Gene probes of pigments-related genes isolated from *Bixa orellana* L. and PCR conditions.

Table 1 Gene probes of pigments-related genes isolated from <i>Bixa orellana</i> L. and PCR conditions						
Gene probe	Accession numbers	Closest orthologous gene	Identity (%)	Primer and used for:	Primer sequences	Tm (°C)
<i>dxs</i>	AF479389	<i>LXG-Arabidopsis thaliana (U70099)</i> ^a	99	Cloning	5'TGUCNATHTAYUUNUCTUG' 3'AAATRTTTRTARTRTINOCYTCS'	55
				Expression analysis	5'GGAAAGGATATGACGGGATGS' 3'ATCATCTACTGAGCTTCTCS'	60
<i>psy</i>	AF196863	<i>PHT-Arabidopsis thaliana (F1000450)</i>	99	Cloning	5'TGGGCHATHTAYUUNUCTUG' 3'AAATRTTTRTARTRTINOCYTCS'	56
				Expression analysis	5'GGAACAAGCATATGAGGGCA TGS' 3'ATCATCTACTGAGCTTCTCS'	55
<i>pds</i>	DQ924534	<i>PDS-Carica papaya (DQ779922)</i>	86	Cloning	5'TGGAAARGAYGATYGGNGAYTGS' 3'AAAYAA YGARATGYTACNTGGCS'	56
				Expression analysis	5'GGAAGATATUATUATUAGATITUS' 3'TGTTCTTCAOTTTCCTGCS'	58
β - <i>lcy</i>	AY836587	β - <i>LCT-Citrus sinensis (DQ496225)</i>	86	Cloning	5'TGGCCNAAAYAA YTAGGNGINTGS' 3'ATGTTDCA YCGCGMACWGS'	57
				Expression analysis	5'TGAAUCZATUATITTCCTGCS' 3'TTCGATTTCTCTCCCTGAGCS'	58
ϵ - <i>lcy</i>	DQ145538	ϵ - <i>LCT-Daucus carota (DQ192192)</i>	88	Cloning	5'TGGAAARGAYGATYGGNGAYTGS' 3'ATBAARATRCATTCGATG'	55
				Expression analysis	5'GOTTTAATTGGCCAGATCTCS' 3'TTCTDCAUCGAACTTAAATUS'	55

^a Accession number

2.5.3 PIGMENT-RELATED GENE EXPRESSION

The *dxs* gene involved in the initial steps of the carotenoid pathway showed a constitutive expression in all tissues of different plant development stages (Fig. 2.5). Linear carotenoid-related genes such as *psy* and *pds* showed a differential expression during development stages in both annatto cultivars. The accumulation of *psy* transcripts was highest in immature seeds of the pink annatto cultivar. The white cultivar only showed a slight accumulation of this *psy* transcript. Likewise, *pds* transcripts were up-regulated during all development stages in the pink cultivar and presented their peak in expression in the immature seed stage. The white annatto cultivar also presented a *pds* peak in expression in immature seed tissues but its expression profile was less prominent in other tissues than in its annatto counterpart.

Cyclic carotenoid-related genes such as ϵ - and β -*lcy* presented a very active expression in leaves and immature fruits in both annatto cultivars. Expression of β -*lcy* mRNA differed from that of ϵ -*lcy* mRNA among the different tissues analyzed and its expression profile was also notably different between both cultivars. Transcripts of this gene (*pds*) were detected in leaves, immature fruits and immature seeds of the pink cultivar whereas in the white cultivar they were only detected in leaves, floral buds and flowers, the more photosynthetic tissues (Fig. 2.3).

In general all carotenoid-related genes analyzed, with the exception of the ϵ -*lcy* gene, showed a peak in expression in immature seeds, the tissue where the accumulation of pigments began. Moreover, these expression profiles seem to be more pronounced in the more pigment productive cultivar: the pink annatto cultivar.

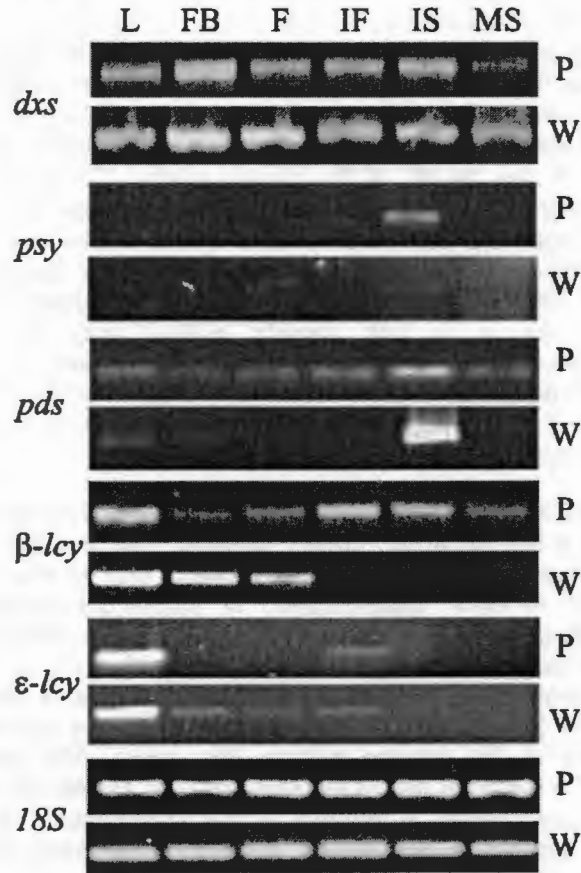


Figure 2.5. Expression analysis of the *dxs*, *psy*, *pds*, β -*lcy* and ϵ -*lcy* genes by RT-PCR during plant development. The presence of *dxs*, *psy*, *pds*, β -*lcy* and ϵ -*lcy* mRNA was detected by PCR amplification with specific primers. Ribosomal 18S cDNA was amplified as an internal control. L: leaves, FB: floral buds, F: flower, IF: capsules of mature fruit, IS: immature seeds, MS: mature seeds. P: pink cultivar, W: white cultivar.

2.6 Discussion

2.6.1 PIGMENT MEASUREMENT

Carotenoids and chlorophylls usually present a very close balance in photosynthetic plant tissues such as leaves and immature fruits (Kennis *et al.* 2001). Thus, chlorophyll *a* content was evaluated to investigate the possible role of total carotenoids in relation to photosynthetic process in the different tissues analyzed. The white cultivar exhibited differential chlorophyll *a* contents more related to all green tissues, displaying a similar profile with respect to total carotenoid accumulation. In contrast, chlorophyll *a* was only detected in leaves of the pink cultivar. Variable chlorophyll *a* content has been reported in the leaves of the closely-related "Peruana CPATU" *B. orellana* L. variant (Matsumoto *et al.*, 2002). β -carotene, an important photosynthetic pigment, was only detected in the leaves of both variants, suggesting a rapid turnover of this molecule into other carotenoid-related compounds. A difference in the chlorophyll *a* to β -carotene ratio during developmental stages in this annatto cultivar suggests a different physiological role of these carotenoids to the photosynthetic process, as has previously been observed in green algae (Sanchez-Estudillo *et al.*, 2006). It is also known in plants that carotenoid accumulation is linked to plant development stage (Merzlyak & Solovchenko 2002).

Annatto pigment content in seeds varies from 2 % to 6 % among different cultivars (Rivera-Madrid *et al.*, 2006); however, the possible role of the different carotenoid-related genes in the pigment variation observed has not been assessed to date. Quantification of carotenoid-related molecules analyzed by HPLC shows their progressive accumulation during the different developmental stages in both annatto cultivars, showing a more drastic difference in their mature seeds. The highest contents of bixin were observed in the seeds of the pink cultivar which may explain the wide commercial use of this annatto cultivar. Vice-versa, ABA contents were mainly present in the floral bud of the white cultivar, hence it is possible that an enzymatic mechanism is leading to the accumulation of such a β -apocarotenoid product in this variant, instead of the lineal apocarotenoid bixin, as was observed in the pink cultivar.

2.6.2 PIGMENT-RELATED GENE EXPRESSION PROFILES

Expression of *dxs* mRNA was active during all stages of development in both cultivars, probably because of its important function as a regulatory enzyme in the plastidial isoprene pathway in plants (Lichtenthaler, 1999). The *psy* mRNA expression coincided with the large carotenoid accumulation

in the immature seeds of the pink cultivar. Expression of *psy* mRNA during pigment accumulation has been reported in other plants (Giuliano *et al.* 2003; Huguency *et al.*, 1996; Karvouni *et al.*, 1995). However, *psy* mRNA was not detected in the mature seeds of neither annatto cultivars. This is in agreement with the results of Jako *et al.* (2002) who found that only one of 870 expressed sequences tags (ESTs) analyzed from *B. orellana* L. seeds corresponded to the *psy* gene. The combination of these results suggests an important role for phytoene synthase during carotenoid and bixin accumulation during seed development.

C₄₀ linear carotenoid biosynthesis was analyzed by measuring the expression of *pds*. The *pds* mRNA expression during seed formation coincides with the bixin increasing recorded in mature seeds. This is probably due to the rapid conversion of C₄₀ linear carotenoids into bixin. Therefore, our results suggest that phytoene desaturase probably plays an important role in the accumulation of carotenoids and bixin in *B. orellana*.

C₄₀ cyclic carotenoid formation was analyzed by measuring the expression profiles of *ε-icy* and *β-icy* transcripts. These genes are generally regulated together during the photosynthetic process and direct the formation of α-carotenoid and β-carotene in an equimolar relation in the active antenna complex (Kennis *et al.*, 2001; Cunningham & Gantt 1998). The *ε-icy* mRNA expression peak was reached in leaf tissues and immature green fruits that also showed an overall up-regulation in the white cultivar. Similar results have been reported for leaves and developing fruit in *A. thaliana* and *L. esculentum* (Cunningham *et al.*, 1996; Rosati *et al.*, 2000), suggesting that ε-lycopene cyclase genes have an important role in photosynthetic pigment accumulation. The *β-icy* mRNA expression coincided with the accumulation of photosynthetic pigments in the white cultivar. The expression of this gene was also detected in a number of tissues preceding a higher accumulation of the β-apocarotenoid ABA. Differently, *β-icy* mRNA expression coincided with the accumulation of carotenoids in the pink cultivar. Thus, the expression of the *β-icy* gene is probably related to the biosynthesis of β,β'-xanthophylls which are accumulated in the colored petals of the pink variant and with the production of β-apocarotenoids such as ABA and other β-carotene derivatives not analyzed here (i.e. methyl (all-E)-8'-apo-β-caroten-8'-oate) which have previously been reported in mature seeds of *B. orellana* (Bittencourt *et al.* 2005b; Tirimanna 1981).

Finally, the knowledge obtained from the present study supports the selection of candidate genes that could be used as markers for elite *B. orellana* cultivars with higher pigment contents and to identify different alleles related to pigment production. Further research is needed to clarify

the balance of different important apocarotenoids such as ABA and bixin in different *B. orellana* cultivars.

2.7 Acknowledgments

This work was supported by the International Foundation for Science (IFS) F/2932-2 and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 46541 and UC Mexus-CONACYT. Rodríguez-Ávila was supported by a CONACYT PhD grant (No 196432). We would like to acknowledge the technical support provided by R. Ku-Cauich in *dxs* cloning.

2.8 References

1. Bittencourt C, Felicissimo MP, Pireaux JJ, Houssiau L (2005)a *Study of annatto from Bixa orellana seeds: an application of time-of-flight secondary ion mass spectrometry*. Spectroscopy Europe, 17(2), 16-22
2. Bittencourt C, Felicissimo MP, Pireaux JJ, Houssiau L. (2005)b *ToF-SIMS characterization of thermal modifications of bixin from Bixa orellana fruit*. Journal of Agriculture and Food Chemistry 53(16), 6195-6200
3. Bouvier F, Dogbo O, Camara B (2003) *Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto)*. Science, 300(5628), 2089-91.
4. Cunningham FX, Gantt E, (1998) *Genes and enzymes of carotenoids biosynthesis in plants*. Annual Review of Plant Physiology, 49(1), 557-577.
5. Cunningham FX, Pogson B, Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D, Gantt E (1996) *Functional analysis of the β and ϵ lycopene cyclase enzymes of Arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation*. The Plant Cell, 8(9), 1613-1626.
6. Cunningham FX Jr (2002) *Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants*. Pure and Applied Chemistry, 74(8), 1409-1417
7. Giuliano G, Rosati C, Bramley PM (2003) *To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled*. Trends in Biotechnology, 21(12), 513-516.
8. Hugueney P, Bouvier F, Badillo A, Quennemet J, d'Harlingue A, Camara B (1996) *Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits*. Plant Physiology, 111(2), 619-626.
9. Isaacson T, Roñen G, Zamir D, Hirschberg J (2002) *Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of carotenoid and xanthophylls in plants*. The Plant Cell, 14(2), 333-342.
10. Jako C, Coutu C, Roewer I, Reed DW, Pelcher LE, Covello PS (2002) *Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of Bixa orellana (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis*. Plant Science, 163(1), 141-145.

11. Karvouni Z, John I, Taylor JE, Watson CF, Turner AJ, Grierson D (1995) *Isolation and characterization of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase*. *Plant Molecular Biology*, 27(6), 1153-1162.
12. Kennis JT, Gobets MB, Ivo H, van Stokkum M, Dekker JP, van Grondelle R, Fleming GR (2001) *Light harvesting by chlorophylls and carotenoids in the photosystem I core complex of Synechococcus elongatus: a fluorescence upconversion study*. *The Journal of Physical Chemistry*, 105(19), 4485-4494.
13. Lichtenthaler HK (1999) *The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 47–65.
14. Matsumoto SN, Viana AES, São JAR, Cardoso AD, Aguilar MAG (2002) *Growth and photosynthetic characteristics of annatto plants*. In: Ming LC, Craker LE, Scheffer, MC (eds.), *I Latin-American Symposium on the Production of Medicinal, Aromatic and Condiments Plants*. ISHS Acta Horticulturæ, 569.
15. Merzlyak MN, Solovchenko AE (2002) *Photostability of pigments in ripening apple fruit: a possible photoprotective role of carotenoids during plant senescence*. *Plant Science*, 163(4), 881-888.
16. Pfander H, Schurtenberger H (1982) *Biosynthesis of C20-carotenoids in Crocus sativus*. *Phytochemistry*, 21(1), 1039–1042.
17. Rodríguez-Ávila NL, Narváez-Zapata JA, Aguilar-Espinosa M, Rivera-Madrid R (2009) *Full-length genes enrichment by using an optimized RNA isolation protocol in Bixa orellana recalcitrant tissues*. *Molecular Biotechnology*, 42(1), 84-90.
18. Rivera-Madrid R, Escobedo-Medrano RM, Balam-Galera E, Vera-Ku M, Huges H (2006) *Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (Bixa orellana L.)*. *Scientia Horticulturæ*, 109(2), 165-172.
19. Rosati C, Aquilani R, Dharmapuri S, Pallara P, Marusic C, Tavazza R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G (2000) *Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit*. *The Plant Journal*, 24(3), 413-420.

20. Sánchez-Estudillo L, Freile-Pelegrin Y, Rivera-Madrid R, Robledo D, Narváez-Zapata JA (2006) *Regulation of two photosynthetic pigments-related genes during stress-induced pigments formation in the green alga Dunaliella salina*. Biotechnology Letters 28(11), 787-791.
21. Tirimanna ASL (1981) *Study of the carotenoid pigments of Bixa orellana L. seeds by thin layer chromatography*. Microchimica Acta, 76(1-2), 11-16.
22. Wagner T, Windhövel U, Römer S (2002) *Transformation of tobacco with a mutated cyanobacterial phytoene desaturase gene confers resistance to bleaching herbicides*. Verlag der Zeitschrift Naturforschung, 57c (7-8), 671-679.
23. Wellburn AR (1994) *The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution*. Journal of Plant Physiology, 144(3), 307-313.

CAPÍTULO III

Obtención de sondas moleculares homólogas y análisis de los genes implicados en la síntesis de bixina a partir de licopeno

En el presente capítulo, se describen los resultados relacionadas con el aislamiento y la obtención de sondas moleculares de los genes involucrados en la biosíntesis de bixina y que incluyen *BoLCD*, *BoBADH* y *BonBMT*. En este apartado, se presenta una descripción de los cebadores empleados, condiciones de PCR, productos de PCR generados y seleccionados para secuenciación, así como el análisis de sus secuencias.

3.1 Introducción

Un primer intento de establecer las bases genético moleculares de la biosíntesis de bixina fue realizado por Jako y cols. (2002), quienes, basándose en los datos químicos por analogía con la ruta de síntesis del ácido abscísico, propusieron un pequeño número de genes estructurales involucrados. De acuerdo a estos autores la vía debería iniciar a partir de la ruta principal de carotenoides con la intervención de una o dos dioxigenasas sobre un carotenoide acíclico, probablemente licopeno, para producir un grupo aldehído central. El siguiente paso, consistiría en la oxidación de los grupos aldehídos a carboxilos mediante la acción de enzimas que deberían guardar similitud con aldehído oxidasas o deshidrogenasas. Finalmente, una metiltransferasa catalizaría la metilación de uno de los grupos carboxilo para dar origen a la bixina. La ruta propuesta fue investigada a través de un análisis de ESTs, usando una biblioteca substractiva de ADNc preparada a partir de ARN de semillas inmaduras de *B. orellana* L. En este análisis, se identificaron EST's correspondientes a la mayoría de las enzimas de la ruta de biosíntesis de carotenoides, incluyendo aquellos implicados en la vía MEP ubicada en los plastidios. Asimismo, identificaron 23 secuencias de genes para dioxigenasas, 16 de aldehído deshidrogenasas y 12 de carboxilo metiltransferasas. De tal manera, este grupo determinó que dichos genes representaban candidatos para las últimas etapas de la ruta biosintética de la bixina. Finalmente, se propuso a una proteína del tipo ácido salicílico metiltransferasa (SAM) como la involucrada en la metilación de norbixina a bixina (Jako *et al.*, 2002).

Tomando en cuenta estos datos y la similitud estructural entre la bixina y el azafrán, Bouvier y sus colaboradores (2003), basándose en las secuencias homólogas de *Arabidopsis thaliana* y de *Crocus sativus*, lograron identificar y aislar a partir del ARNm obtenido de semillas inmaduras de *B. orellana* L. los tres genes directamente involucrados en la biosíntesis de bixina. Estos autores proponen que el paso inicial de la biosíntesis de bixina involucra la acción de la bixina dioxigenasa (*BoLCD*) para la conversión de licopeno a bixina aldehído, que finalmente dará origen a la bixina, por acción secuencial de la aldehído deshidrogenasa (*BoBADH*) y de la norbixina metiltransferasa (*BonBMT*). El primer gen identificado fue el de la licopeno dioxigenasa (*BoLCD*), con un tamaño de 1140 pb y que codifica para una proteína de 380 aminoácidos, con una alta similitud a las dioxigenasas de *C. sativus* CsZCD (con una identidad del 97%), a la *Md-FS2* presente en flores de manzana, a la *AtCCD1* de *A. thaliana* y a la *VP14* de maíz. Asimismo, se determinó que esta enzima lleva a cabo la conversión de licopeno a bixina aldehído. En adición, se observó que la

licopeno dioxigenasa actúa rompiendo los dobles enlaces del licopeno en sus posiciones 5 y 6. El segundo gen aislado fue el de la bixina aldehído deshidrogenasa (*BoBADH*), de 1548 pb y que codifica para una proteína de 516 aminoácidos. Esta enzima es la responsable de la producción de norbixina a partir de bixina aldehído, y presenta entre un 76 y 66% de similaridad con las aldehído deshidrogenasas de maíz y *Arabidopsis*, respectivamente. Finalmente, se aisló el gen de la *BonBMT* de 1149 pb, que codifica para la norbixina metiltransferasa, de 383 aminoácidos, la cual presenta un 51% de similaridad a nivel de aminoácidos con la ácido salicílico metiltransferasa de *Clarkia breweri* (Bouvier *et al.*, 2003).

De esta forma, el mecanismo de biosíntesis de la bixina fue analizado co-transformando con los tres genes aislados una cepa de *E. coli* genéticamente modificada para producir el licopeno, el compuesto a partir del que presuntamente se inicia la síntesis de bixina (Jako *et al.*, 2002). Así, el papel de cada enzima fue verificado mediante el análisis de la acumulación de los productos obtenidos (Bouvier *et al.*, 2003). Sin embargo, el papel de estos genes no ha sido estudiado en los órganos en las plantas que acumulan dicho pigmento, en donde se presentan a su vez otros pigmentos carotenoides y genes que pudieran afectar la acumulación de bixina. Por lo tanto, para el presente trabajo se planteó el aislamiento de diversos genes involucrados en el proceso de carotenogénesis y su análisis a nivel transcripcional en diferentes tejidos de morfotipos de *B. orellana* que presentan diferentes contenidos de bixina. El objetivo de esto es generar información acerca de los mecanismos involucrados en regulación de la acumulación diferencial de bixina, como una de las estrategias a seguir para el mejoramiento genético a futuro de este cultivo.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 OBTENCIÓN DE SONDAS MOLECULARES HOMÓLOGAS

Para el aislamiento del gen de la dioxigenasa involucrada en la síntesis de bixina, se realizó un alineamiento, orientado para encontrar regiones conservadas entre diversas carotenoides dioxigenasas (CCDs) de plantas. A partir de estas secuencias se llevó a cabo el diseño de los cebadores degenerados DGF, 5'TGGTTYGAYGGNGAYGGNATG3' y DGR, 5'GTDATNGCRAARTCRTGCA TCAT3'. Para las reacciones de PCR dirigidas contra la aldehído deshidrogenasa (*BoBADH*), con base en su secuencia (AJ548847) de 1548 pb (Camara y cols., 2004) y empleando el programa BCM Search Launcher (Smith *et al.*, 1996) se diseñaron tres pares de cebadores, en sentido ADHF1, 5'TGAAGGTGCTGCTTAATACCAG3, ADHF2, 5' GGATAAAGCCGAAGTA

GCAG3', ADHF2-1, 5'AGCAGTTCACCCACACAGCG3' y en antisentido ADHR1, 5'GGATCAAAGCCGAAGTAGCAG3', ADHR2, 5'AGCAGTTCACCACACAGCG3', ADHR2-1, 5'GTTCGGTGGCTACAAGATGTCC3'. Asimismo, se probaron los cebadores específicos de la bixina aldehído deshidrogenasa, de acuerdo a (Bouvier *et al.*, 2003): BoBADHF, 5'ATGGAGAGCACCGGACGCGCACCAC3' y BoBADHR, 5'ATACCAGGGGCTGTTAGGGATTGCGG3'. Finalmente, para la amplificación del gen de la norbixina metil transferasa (AJ548847), con base en la secuencia de 1149 pb previamente reportada (Camara & cols., 2003), se diseñaron dos pares de cebadores en sentido CTMF1, 5'ATGGGCAGGGTGAGAAGTAC3' y CTMF2, 5'ACAGACACGGCTCGTCATCG3' y en antisentido CTMR1, 5'GTGCCTGTGATCATCTGTGTCG3' y CTMR2, 5'CGTTCGTCCATCTGCA TCCTG3'. En adición, se probaron los cebadores descritos por Bouvier y cols. (2003): BonBMTF, 5'ATGGGCAGGGTGAGAAGTACATTG3' y BonBMTR, 5'TCTGTGTCGCTTCT TTGTCAGCTG3'. Los componentes de la mezcla de reacción de 25 μ l para las reacciones fueron los siguientes: 2 μ l del ADNc sintetizado a partir de 100 ng del RNA total aislado de semillas inmaduras; 2.5 μ l de Buffer 10X, 1 μ l de MgCl₂ 10 mM, 1 μ l de cebador en sentido 10 mM, 1 μ l de cebador en antisentido 10 mM, 0.5 μ l de dNTP's 10 mM y 0.25 μ l de *Taq* Polimerasa (Invitrogen, 5U/ μ l). Los productos de amplificación fueron purificados del gel de agarosa y ligados al vector pGEM[®]-T Easy de Promega (Cat. No. A1360), para su clonación la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. El análisis de plásmidos recombinantes fue realizado por análisis de restricción (*EcoRI*) para la verificación de la presencia de insertos de interés.

3.2.2 ANÁLISIS DE SECUENCIAS E IDENTIDAD

Los plásmidos confirmados con los insertos de interés, fueron secuenciados en ambos sentidos, utilizando los cebadores universales Sp6 y T7 que flanquean el sitio de inserción del producto de PCR en el plásmido PGEM[®]-Teasy. Cada una de las secuencias fue ensamblada y procesada para su análisis de identidad mediante el programa computacional DNASTar V.4.1. La búsqueda de homología con otros genes de carotenoides reportados fue realizada por BLAST (Altschul *et al.*, 1990)

3.3 Resultados

3.3.1 GEN DE LA LICOPENO BIXINA DIOXIGENASA

3.3.1.1 OBTENCIÓN DE SONDAS MOLECULARES HOMÓLOGAS

Utilizando los cebadores degenerados descritos y diferentes temperaturas de alineamiento, se obtuvo un producto de aproximadamente 500 pb, que

fue más evidente a 56°C (Figura 3.1, A). Dicho producto fue purificado, ligado y clonado, obteniéndose dos clonas (DIG8 y DIG9). Después de la extracción de ADN plasmídico y su análisis de restricción con *EcoRI* se confirmó la presencia del inserto (Figura 3.1, B).



Figura 3.1. Amplificación y clonación de BoLCD. (A) Resultados de la amplificación por PCR del gen BoLCD empleando oligonucleótidos degenerados y a diferentes temperaturas de alineación. MW: Marcador Molecular de 1Kb. Línea 1: 65° C; Línea 2: 64° C; Línea 3: 63° C; Línea 4: 61° C; Línea 5: 59° C; Línea 6: 57° C; Línea 7: 56° C. Se puede observar que el mejor producto de amplificación se obtuvo con una temperatura de alineación de 56° C, obteniéndose un fragmento de alrededor de las 500 pb. (B) Digestión enzimática realizada con la enzima *EcoRI* a partir del ADN plasmídico aislado de las 2 colonias bacterianas (DIG8 y DIG9) determinadas por su coloración como positivas a la presencia del gen BoLCD.

3.3.1.2 ANÁLISIS DE SECUENCIAS Y CONFIRMACIÓN DE IDENTIDAD

Las secuencias de ambas clonas fueron ensambladas y alineadas entre sí, determinándose que eran casi idénticas, excepto en la posición 529, ocupándose una por una A en DIG8 y una T en DIG9 (Figura 2.2, A). Sin embargo, la traducción de ambas secuencias produjo proteínas idénticas (Figura 2.2, B). Por otro lado, el análisis BLASTP determinó que guardaba un alto porcentaje de identidad (alrededor del 80%) con otras Carotenoid Cleavage Dioxygenases (Tabla 2.1), siendo menor la homología con BoLCD, reportada para la síntesis de bixina aldehído a partir del licopeno (Bouvier *et al.*, 2003), y con las otras reportadas por Bouvier y cols. (2003) para *Bixa orellana* L. Por tanto, se estableció que dicha secuencia correspondía a un nuevo miembro de la familia de dioxigenasas para *B. orellana* L., el cual en lo subsecuente será denominado como *BoCCD2*.

(A)

DIG9	TGTTATGGCGAAGTCGTGCATCATGATTGGCTCTGATATTGTAATCGGCA	50
DIG8	TGTTATGGCGAAGTCGTGCATCATGATTGGCTCTGATATTGTAATCGGCA	50
DIG9	CTGGATCGTGCATAAAACCATCCTTTGAAATAACTCTGTATGTAATATAT	100
DIG8	CTGGATCGTGCATAAAACCATCCTTTGAAATAACTCTGTATGTAATATAT	100
DIG9	GGTGCCTCATGTGAATAGCCAAAAGTAAACATCTCACCAGTAACTGGGTC	150
DIG8	GGTGCCTCATGTGAATAGCCAAAAGTAAACATCTCACCAGTAACTGGGTC	150
DIG9	AACCTTAGGATGAGCAGTGAATGAATGTGACAATCTCTTATCGTAATCCA	200
DIG8	AACCTTAGGATGAGCAGTGAATGAATGTGACAATCTCTTATCGTAATCCA	200
DIG9	ACAGGCCAATAGTTTGAAGATCTCCATCTTCCAAAACCTTTGAGAACATAG	250
DIG8	ACAGGCCAATAGTTTGAAGATCTCCATCTTCCAAAACCTTTGAGAACATAG	250
DIG9	GGTTTGTACCCCTCGTTAAGTGCCAGAAGTTTGCCATGATGATATACGAG	300
DIG8	GGTTTGTACCCCTCGTTAAGTGCCAGAAGTTTGCCATGATGATATACGAG	300
DIG9	AGCTGTATTCCTGTTCCAACCTCCATATGTTGTATCAATTACTTTTGT	350
DIG8	AGCTGTATTCCTGTTCCAACCTCCATATGTTGTATCAATTACTTTTGT	350
DIG9	TTGCTCTCAATATCTGTAATGAACCATGAGTAACCCAAACAGGCCCTTTA	400
DIG8	TTGCTCTCAATATCTGTAATGAACCATGAGTAACCCAAACAGGCCCTTTA	400
DIG9	AGATCTCCTATCTTCATAAATTTAGGCCCTTCGAAAGAAAGTCTTCTTGCTT	450
DIG8	AGATCTCCTATCTTCATAAATTTAGGCCCTTCGAAAGAAAGTCTTCTTGCTT	450
DIG9	AAAACGTGATGTATTCACATAACGAGACACGTATGCTGCCTTTCCATCTT	500
DIG8	AAAACGTGATGTATTCACATAACGAGACACGTATGCTGCCTTTCCATCTT	500
DIG9	TGATGCGCATACCATGAACCATCCCATCTCCATCAAACCAA	541
DIG8	TGATGCGCATACCATGAACCATCCCATCTCCATCAAACCAA	541

(B)

WFDGDGMVHGMRIKDGKAAVVSRYVNTSRFKQEDFFEGPKFMKIGDLKGLF
GLLMVHLQILRAKTKVIDTTYGVGTGNTALVYHHGKLLALNEGDKPYVLKVL
GDLQTIQLLDYDKRLSHSFTAHPKVDPVTGEMFTFGYSHEAPYITYRVISKDF
MHDPVPITISEPIMMHDFAIT

Figura 3.2. Secuencia parcial de la presunta CCD aislada. (A) Secuencias parciales de las clonas DIG8 y DIG9. El recuadro rojo indica la base 529, la cual representa la única diferencia entre ambas secuencias. (B) Traducción en aminoácidos de las secuencias obtenidas. A pesar de la diferencia a nivel de nucleótidos antes señalada, tanto DIG8 como DIG9 codifican idénticas secuencias de aminoácidos.

Tabla 3.1. Comparación a nivel de aminoácidos de la CCD clonada de *B. orellana* L, con las de otras dioxygenasas de plantas.

Nombre	Especie	Identidad (%)	No. Acceso
Carotenoid Cleavage	<i>Petunia x hibrida</i>	83	AAT68189
Dioxygenase 1 Carotenoid Cleavage	<i>Citrus sinensis</i>	82	BAE92958
Dioxygenase 1 Carotenoid Cleavage	<i>Citrus unshiu</i>	82	BAE92959
Dioxygenase 1 Croctin Dialdehido	<i>Crocus sativus</i>	81	CAC79592
Dioxygenase Carotenoid Cleavage	<i>Cucumis melo</i>	81	ABB82946
Dioxygenase			

3.3.2 GEN DE LA BIXINA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA (*BoBADH*)

3.3.2.1 OBTENCIÓN DE SONDAS MOLECULARES HOMÓLOGAS

Se probaron las nueve combinaciones posibles de los pares cebadores descritos, esperando la amplificación de fragmentos de alrededor de 1000-1300 pb. Asimismo, se probaron diferentes temperaturas de alineamiento entre los 55 y 65 °C. Los mejores productos de amplificación se obtuvieron a 60°C, y 40 ciclos. Varias combinaciones de cebadores produjeron productos de amplificación del tamaño esperado (Figura 2.3), pero sólo en cuatro casos (ADHF2-1/ADHR1, ADHF1/ADHR2, ADHF2/ADHR2 Y ADHF2-1/ADHR2), los productos fueron lo suficientemente abundantes como para intentar su clonación (Figura 3.3).

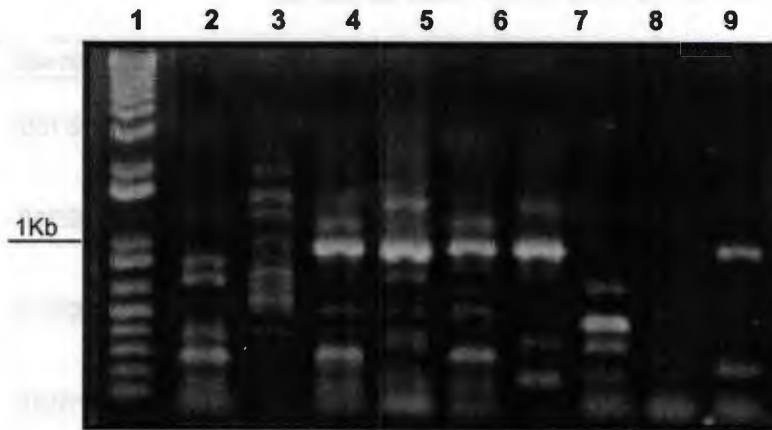


Figura 3.3. *Productos de PCR a 60°C con 40 ciclos de amplificación para los nueve pares de cebadores diseñados contra el gen BoBADH. Línea 1: Marcador Molecular. Líneas 2-10: Productos de amplificación obtenidos de las combinaciones de cebadores 2:ADHF1/ADHR1, 3:ADHF2/ADHR1, 4:ADHF2-1/ADHR1, 5:ADHF1/ADHR2, 6:ADHF2/ADHR2, 7:ADHF2-1/ADHR2, 8:ADHF1/ADHR2-1, 9:ADHF2/ADHR2-1, 10:ADHF3/ADHR2-1.*

Los fragmentos del tamaño esperado, fueron purificados del gel de agarosa y ligados y clonados de la manera descrita. Después de la transformación con los plásmidos se obtuvieron diversas clonas recombinantes. Se procedió a la extracción del ADN plasmídico y análisis de restricción (Figura 3.4) para la verificación de la presencia del inserto.

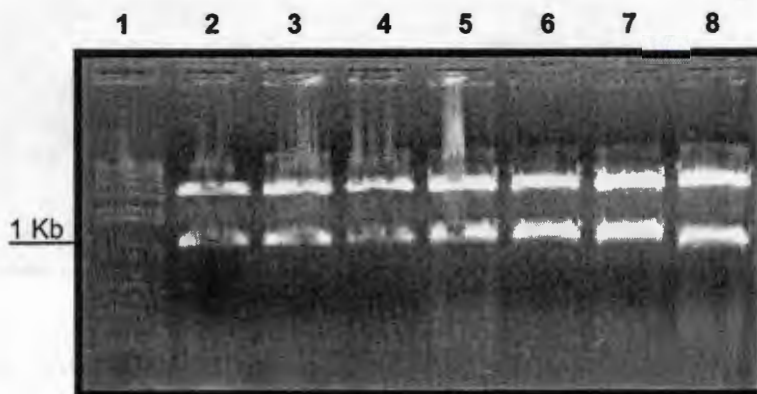


Figura 3.4. *Productos de la digestión (EcoRI) de plásmidos recombinantes portadores del fragmento de 1000 pb amplificado con los cebadores diseñados para el aislamiento del gen BoBADH. Línea 1: Marcador Molecular. Líneas 2-8: Plásmidos recombinantes digeridos.*

El análisis de las secuencias determinó que los fragmentos no eran idénticos a la aldehído deshidrogenasa involucrada en la síntesis de bixina. Dado lo anterior, se intentó la amplificación del gen *BoBADH* con los cebadores diseñados por Bouvier *et al.*, (2003).

Con este juego de cebadores y probando diferentes temperaturas de alineamiento 50- 60 °C), se logró la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1000 pb en una temperatura de temperatura de alineamiento de 55 °C en una PCR de 40 ciclos (Figura 3.5).

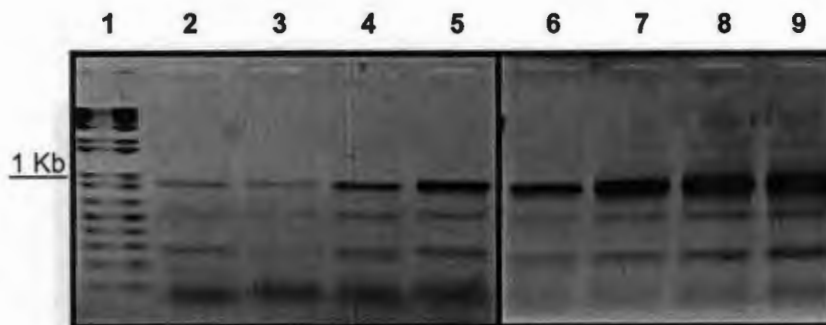


Figura 3.5. *Productos de PCR obtenidos en un gradiente de temperatura de 55 a 60 °C, empleando los cebadores diseñados por Bouvier et al., (2003) para el aislamiento del gen BoBADH. Línea 1: Marcador de peso molecular. Líneas 2-9: Productos de amplificación obtenidos a temperaturas de alineamiento de 2) 60 °C, 3) 59.6 °C, 4) 59 °C, 5) 58 °C, 6) 56.8 °C, 7) 55.9 °C, 8) 55.3 °C y 9) 55 °C.*

Los fragmentos seleccionados fueron purificados del gel, clonados y un total de 15 plásmidos recombinantes, confirmados tanto por PCR como por análisis de restricción, fueron secuenciados. El análisis de las secuencias, demostró que ninguno de los fragmentos clonados presentó homología alguna con secuencias de aldehído deshidrogenasas reportadas.

Para descartar la contaminación de éstos productos de PCR clonados, nuevos productos fueron secuenciados de forma directa. Sin embargo, nuevamente ninguno de éstos guardó homología con genes de aldehído deshidrogenasas.

3.3.3 GEN DE LA NORBIXINA METILTRANSFERASA (BONBMT)

3.3.3.1 OBTENCIÓN DE SONDAS MOLECULARES HOMÓLOGAS

Se ensayaron 4 combinaciones de iniciadores y rangos de temperatura de entre 60 y 68 °C con la idea de obtener productos de entre 750 y 1200 pb. Sin embargo, con dichos cebadores solo se pudieron obtener fragmentos muy pequeños, de entre 200 y 500 pb (Figura 3.6).

Debido a lo anterior, se ensayaron cebadores específicos (Bouvier *et al.*, 2003). Nuevamente se hicieron reacciones probando temperaturas entre 50 y 60 °C. Un producto de PCR de aproximadamente 650 pb fue obtenido a 53 °C (Figura 3.7) con una PCR de 40 ciclos. Debido a que este tamaño se

acercó al esperado de 1000 pb (Figura 3.7, Carril 8), también fue seleccionado para análisis posteriores.

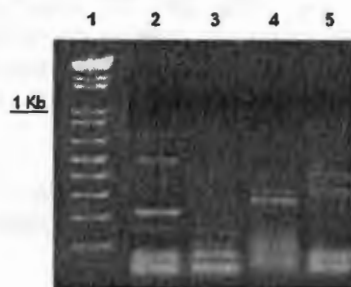


Figura 3.6. Productos de PCR a 64°C para los cuatro pares de cebadores diseñados para la amplificación de BonBMT. Línea 1: Marcador Molecular. Líneas 2-5: Productos de amplificación obtenidos de las combinaciones de cebadores 2:CTMF1/CTMR1, 3:CTMF1/CTMR3, 4:CTMF2/CTMR2 y 5: CTMF2/CTMR2

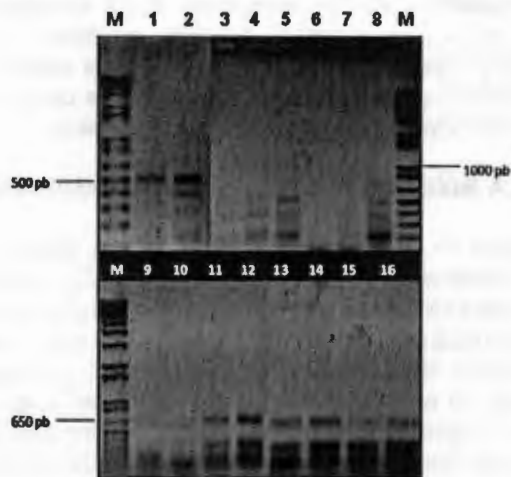


Figura 3.7. Productos de PCR obtenidos en un gradiente de temperatura de 55 a 60 °C y de 50 a 55 °C. M: Marcador de peso molecular de 1Kb. Carriles 1-16: Productos de amplificación obtenidos a temperaturas de alineamiento de 1) 60 °C, 2) 59.6 °C, 3) 59 °C, 4) 58 °C, 5) 56.8 °C, 6) 55.9 °C, 7) 55.3 °C, 8) 55 °C, 9) 55 °C, 10) 54.6 °C, 11) 54 °C, 12) 53 °C, 13) 51.7 °C, 14) 50.9 °C, 15) 50.3 °C y 16) 50 °C.

Los fragmentos seleccionados fueron purificados del gel , ligados y clonados, obteniéndose un total de 10 plásmidos recombinantes confirmados tanto por PCR como por análisis de restricción. Estos fueron secuenciados y el análisis de identidad arrojó que ninguno de los fragmentos guardaba homología con secuencias de metiltransferasas incluidas en bases de datos.

Para descartar la contaminación de los productos de PCR durante el proceso de clonación, éstos también fueron secuenciados de forma directa, obteniéndose los mismos resultados.

3.4 Discusión y Conclusiones

3.4.1 GEN DE LA LICOPENO BIXINA DIOXIGENASA (*BoLCD*)

Se emplearon cebadores degenerados para regiones conservadas de diferentes carotenoides dioxigenasas para amplificar un producto de aproximadamente 500 pb, con un alto porcentaje de identidad con diversas dioxigenasas de plantas. Interesantemente, dicha secuencia fue diferente a las reportadas para dioxigenasas de *Bixa orellana* L., de las que se disponen 23 ESTs (Jako *et al.*, 2002). Por ello, es posible aseverar que la es un nuevo miembro de la familia de dioxigenasas de *B. orellana* L. lo cual representa una importante contribución de este trabajo.

3.4.2 GEN DE LA BIXINA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA (*BoBADH*)

A una temperatura de alineación de 60°C, en una reacción de 40 ciclos y empleando los cebadores específicos para *BoBADH*, se obtuvieron varios fragmentos de alrededor de 1000 pb que concordaban con el tamaño esperado. Estos productos de PCR fueron clonados y secuenciados. Sin embargo, el análisis de sus secuencias no reveló identidad con aldehído deshidrogenasas. Lo anterior puede deberse a que la secuencia reportada para este gen sólo guarda homología con 13 secuencias depositadas en el GenBank entre las que se incluyen cuatro aldehído deshidrogenasas, dos de *Oryza sativa* y dos de *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, las homología no cubren la secuencia completa del gen (Tabla 3.2). Asimismo, los extremos 5' y 3' de *BoBADH*, en donde se localizan los cebadores usado, no tienen homología alguna con secuencias incluidas en el GenBank.

Tabla 3.2. Comparación a nivel de nucleótidos de la secuencia reportada por Bouvier y cols (2003) para el gen *BoBADH* de *B. orellana* L. con secuencias de aldehído deshidrogenasas reportadas para plantas.

Número de acceso	Descripción	% de Cubertura	% de Identidad
NM_001049988.1	<i>Oryza sativa</i> , mRNA	88	72
AB037421.1	<i>Oryza sativa</i> , aldehído deshidrogenasa citosólica	88	72
AY056398.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> aldehído deshidrogenasa	50	74
BX825724.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> , proteína de la vaina de la cepa col-0	50	74
EF576256.1	<i>Oryza sativa</i> , putativa retinal deshidrogenasa 1	25	76
AK221230.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> , aldehído deshidrogenasa	10	83
AB020746.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> , cromosoma 3	5	89

Asimismo, el 70% de la secuencia del cebador en sentido (5'ATGGAGAGCACCGGACGCGCACCCAC3') mostró una alta homología (hasta del 96%) con secuencias de genomas bacterianos, como el de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Synechococcus* sp, *Escherichia fergusonii*, *Leishmania infantum*, entre otras. Ninguna de estas secuencias corresponde a aldehído deshidrogenasas. El mismo caso se observó al analizar la secuencia del cebador antisentido (5' ATACCAGGGGCTGTTAGGGATTGCGG3'); para el que un 84% tiene homología con genes de proteínas hipotéticas o de función desconocida de mamíferos y peces. Más aún con genomas de bacterias, se alcanzan porcentajes de identidad incluso de hasta el 100%. Lo anterior explica la homología de las secuencias de los productos de PCR secuenciados con secciones del genoma de *E.coli*, de entre ellas algunas codificando a secciones de un transportador ABC de sulfato de dicha bacteria.

De este modo, *BoBADH* pareciera ser un gen poco representado en el genoma de *Bixa orellana* L. cuya expresión está altamente regulada. Por

ello, el aislamiento de este gen se vuelve especialmente complicado, haciendo necesario el planteamiento de nuevas estrategias.

3.4.3 GEN DE LA NORBIXINA METILTRANSFERASA (*BonBMT*)

A pesar de que se probó un amplio rango de temperaturas y condiciones de amplificación, en las que incluso se emplearon cebadores específicos contra la secuencia de *BonBMT*, los esfuerzos para el aislamiento de este gen resultaron infructuosos. Estos resultados pueden explicarse considerando que la secuencia de este gen, tiene muy baja homología con las depositada en el GenBank; sólo el 44% y el 39% de *BonBMT* presenta cierta identidad con metiltransferasas dependientes de S-adenosil-L-metionina de *Clarkia breweri* y *Nicotiana tabacum*, respectivamente, mientras que *BonBMT* muestra una homología del 39% con una carboxi metiltransferasa de *Crocus sativus*. La homología con otras metiltransferasas de plantas, es aún más baja (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Comparación a nivel de nucleótidos de la secuencia reportada por Bouvier y cols. (2003) para el gen *BonBMT* de *B. orellana* L. con algunos genes que codifican a metiltransferasas en plantas.

Número de acceso	Descripción	% de Cobertura	% de Identidad
AF133053.1	<i>Clarkia breweri</i> , ácido salicílico metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina: (SAMT)	44	64
AK230364.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> (SAMT)	11	73
NM_120519.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> (SAMT)	11	73
AY741493.1	<i>Capsicum annuum</i> (SAMT)	8	77
AY741481.1	<i>Cestrum elegans</i> (SAMT)	9	77
AJ549289.1	<i>Crocus sativus</i> , carboxil metiltransferasa	39	81
AY741484.1	<i>Brugmansia</i> sp. Robadey (SAMT)	27	66
AY741483.1	<i>Cestrum nocturnum</i> (SAMT)	9	76
AY741503.1	<i>Nicotiana tabacum</i> (SAMT)	39	64
AY741500.1	<i>Solandra maxima</i> SAMT (SAMT)	28	65
AY741488.1	<i>Schizanthus pinnatus</i> (SAMT)	28	65
AY741489.1	<i>Solanum dulcamara</i> (SAMT)	20	66
AY741482.1	<i>Schwenckia americana</i>	8	76

	(SAMT)		
AB049752.1	<i>Atropa belladonna</i> (SAMT)	8	76
AY741498.1	<i>Vestia lycioides</i> (SAMT)	8	75
AY741499.1	<i>Physalis virginiana</i> (SAMT)	8	75
AY741487.1	<i>Petunia nyctaginiflora</i> (SAMT)	17	69
EF472972.1	<i>Datura wrightii</i> , ácido salicílico/ácido benzoico carboxil metiltransferasa	8	75
EF472975.1	<i>Protoschwenkia mandonii</i> , ácido salicílico/ácido benzoico carboxil metiltransferasa	8	72
FM164377.1	<i>Capsicum annuum</i> cv. Bardenas (SAMT)	8	73
AY741491.1	<i>Lycium ferocissimum</i> SAMT (SAMT)	19	66
AY741486.1	<i>Exodeconus miersii</i> SAMT (SAMT)	8	74
AY741485.1	<i>Hyoscyamus albus</i> SAMT (SAMT)	14	68
AY741494.1	<i>Browallia americana</i> SAMT (SAMT)	5	76
AJ628349.1	<i>Nicotiana suaveolens</i> (SAMT)	7	93
DQ494491.1	<i>Petunia x hybrida</i> , ácido salicílico/ácido benzoico carboxil metiltransferasa	8	72

Asimismo, los cebadores utilizados tienen una alta homología con secuencias de otros genes, lo que explicaría la falta de especificidad. Así, el 95% de la secuencia del cebador en sentido (5'ATGGGCAGGGTGAGAAGTACATTG3') presentó altos porcentajes de homología con secuencias de humano, de ratón y de bacterias, tales como *Botryotinia fuckeliana*, *Archaeoglobus fulgidus* y *Phaeosphaeria nodorum*, entre otras, pero que no incluyen metiltransferasas. Algo similar se observó con el cebador antisentido (5'TCTGTGTCGCTTCTTTGTCAGCTG3'), para el que el 91% de la secuencia guardó un 100% de identidad con genes ribosomales de bacterias, e inclusive, con proteínas hipotéticas o de función desconocida de mamíferos y peces.

Por lo tanto, para este caso también será necesario idear nuevas estrategias, entre las que se pueden mencionar el empleo de nuevos pares de cebadores ubicados en regiones que tengan una mayor conservación con metiltransferasas y en particular, con la metiltransferasa reportada para *B. orellana* L.

3.5 Referencias

1. Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers and DJ Lipman (1990). *Basic local alignment search tool*. Journal of Molecular Biology, 215 (3), 403–410.
2. Bouvier F, O Dogbo and B Camara (2003) *Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annato)*. Science, 300(5628), 2089-2091.
3. Jako C, C Coutu, I Roewer, DW Reed, LE Pelcher and PS Covello (2002) *Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of Bixa orellana (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis*. Journal of Plant Science, 163(1), 141-145.
4. Smith RF, BA Wiese, MK Wojzynski, DB Davison and KC Worley (1996). *BCM Search Launcher. An integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on the World Wide Web*. Genome Research. 6(5), 454-62.

Capítulo IV

Caracterización de la dioxigenasa aislada de *Bixa orellana* L.

En este capítulo, se describen los análisis de identidad, filogenia y dominios conservados realizados con el fragmento de la dioxigenasa aislada (*BoCCD2*) con el objetivo de caracterizar este nuevo gen y discutir su posible función en la biosíntesis de bixina.

4.1 Introducción

Las dioxigenasas son enzimas importantes para la síntesis de metabolitos secundarios de gran relevancia para las plantas tales como los fitorreguladores ácido abscísico, giberelinas y etileno y una gran variedad de flavonoides y alcaloides (Prescott & John, 1996).

Las dioxigenasas de plantas están codificadas por familias multigénicas. Estudios en un gran número de especies han demostrado que algunas dioxigenasas se expresan de una manera tejido-específica y que pueden estar controlados en términos de desarrollo y respuesta al estrés. (Prescott & John, 1996).

La primera dioxigenasa aislada de plantas fue la conocida como VP14, la cual fue caracterizada en plantas de maíz y es la responsable del rompimiento de 9-cis xantofilas para dar origen a un apocarotenoide de C₁₅ precursor del ácido abscísico (Bao-Cai *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997), al igual que su homóloga en frijol, PVNCED1 (Qin & Zeevart, 1999). En *Arabidopsis thaliana*, se han descrito nueve-cis-epoxicarotenoide dioxigenasas (NCED's) (Tan *et al.*, 2003) las cuales están involucradas en la formación de apocarotenoides C₁₃ y C₁₄, al igual que las siete CCDs reportadas para *Crocus sativus* (Bouvier *et al.*, 2003b). Los homólogos de VP14 conforman a una nueva familia de dioxigenasas que actúan rompiendo una gran variedad de dobles enlaces y dando origen a diversos tipos de apocarotenoides, por lo que se han denominado CCD's (Carotenoid Cleavage Dioxygenases). Así, en *Arabidopsis* se han identificado dos CCD's asociadas con la biosíntesis de un compuesto relacionado con la inhibición de ramas laterales (Schwartz *et al.*, 2004). En tomate, se han aislado otras dioxigenasas involucradas con la formación de terpenoides volátiles, tales como β-ionona, pseudoionona y geranilacetona, que son metabolitos responsables del sabor y aroma de una gran variedad de frutos, vegetales y plantas ornamentales (Simkin *et al.*, 2004).

Una gran diversidad de CCD's se han aislado de plantas. Por ejemplo, la AtCCD1 de *Arabidopsis* que actúa rompiendo los dobles enlaces de diversos substratos carotenoides para dar origen a un aldehído de C₁₄ y dos ciclohexonas C₁₃ (Schwartz *et al.*, 2001). Ortólogos de AtCCD1 han sido aislado de otras especies, como *Phaseolus vulgaris* (Schwartz *et al.*, 2001), *Capsicum annuum* (Bouvier *et al.*, 2003b), *Crocus sativus* (Bouvier *et al.*, 2003b), *Petunia hybrida* (Simkin *et al.*, 2004), *Vitis vinifera* (Mathieu *et al.*, 2005), *Citrus unshiu*, *C. sinensis*, *C. lemon* (Kato *et al.*, 2006) y de *Chrysanthemum morifolium* (Ohmiya *et al.*, 2006), entre otras.

Por otro lado, las CCD's han recibido un especial interés debido a la importancia biológica como económica de los apocarotenoides que producen. Así, en *Crocus sativus* se ha aislado una dioxigenasa específica de la zeaxantina (CsZCD), que actúa rompiendo los enlaces 7,8 (7',8') para dar origen al crocetin dialdehído y al 3-hidroxi- β -ciclocitral. Esta reacción representa el paso limitante para la biosíntesis del safranal, un constituyente del azafrán (Bouvier *et al.*, 2003b).

Asimismo, en *Bixa orellana* L. se ha identificado una dioxigenasa específica de licopeno (BoLCD) que actúa *in vitro* rompiendo en los enlaces 5,6 (5',6') para dar origen a la bixina aldehído y a un dialdehído central de C₇, identificado como 6-metil-5-hepten-2-ona (MHO) (Bouvier *et al.*, 2003; Fay *et al.*, 2003). La bixina aldehído es el sustrato sobre el que, por la acción de dos enzimas adicionales, se dará origen a la bixina. Por lo tanto, un análisis de la CCD aislada (BoCCD2), así como de sus homólogos en *B. orellana* L., resulta de especial interés si se desea profundizar sobre el papel de estas enzimas en la síntesis de carotenoides y bixina. Tal es uno de los objetivos del presente trabajo.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 ANÁLISIS DE IDENTIDAD

La secuencia parcial de ADN de la BoCCD2 (Capítulo III) fue analizada por BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) a nivel de nucleótidos e identificada por su homología con CCD's reportadas para plantas. La secuencia de aminoácidos, fue seguida de un nuevo alineamiento y análisis por BLASTP (Mount, 2004). Paralelamente, se efectuó una búsqueda de dominios conservados a nivel de aminoácidos, usando la herramienta que el GenBank (Conserved Domains Database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=cdd>) ofrece para tales efectos. Los restantes alineamientos y la generación de árboles filogenéticos, fueron generados y procesados usando el programa CLC Workbench V. 4.0.3 (<http://www.clcbio.com>).

4.3 Resultados

4.3.1 ANÁLISIS DE IDENTIDAD DEL FRAGMENTO DE LA DIOXIGENASA AISLADA

El fragmento de BoCCD2 de alrededor de 500 pb obtenido con el empleo de cebadores degenerados diseñados a partir de las secuencias de CCDs reportadas en el GenBank *Bixa orellana* (CAD71148, AJ489277 y EF493214) guardó un alto porcentaje de identidad con dioxigenasas cuyo

substrato son carotenoides (Figura 4.1), como las de *Petunia hybrida* (83%), *Citrus sinensis* (82%), *Crocus sativus* (82%) y *Cucumis melo* (81%), entre otras, mas no así con las de *B. orellana* L. implicadas en el remodelamiento oxidativo del licopeno (Bouvier *et al.*, 2003).

Por otro lado, al realizar un análisis filogenético de la secuencia de *BoCCD2* con aquellas dioxigenasas con las que guardaba mayor identidad, se determinó que ésta era más cercana a nivel evolutivo a dioxigenasas presentes en *Persea americana*, *Crocus sativus* y *Arabidopsis thaliana* entre otras, así como a otra CCD reportada por Bouvier y col. (2004) (Figura 4.2).

CmCCD	LIVKMYD	SSQL	HYLSGMFAPY	PDETPTKDL	HVIGHLPCDL	NGEFVRYGPH	PKFAPVAGYH	WFDDDDMIMG	LRIKDKKA-T	YVSRFYRTRR	119
VcCCD	LIVKLMND	SSQL	HYLSGMFAPY	RDETTPCKML	PVIGYLPCEL	NGEFVRYGPH	PKFSPVAGYH	WFDDDDMIMG	LRIKDKKA-T	YVSRFYRTRR	125
CmCCD	LFVKLMYD	SSKPK	HYLSGMFAPY	HDETTPITDL	PVKGYLPECL	NGEFVRYGPH	PKFSPVAGYH	WFDDDDMIMG	LRIKDKKA-S	YVSRFYRTRR	128
PehyCCD	VIIKLMND	SSKPL	HYLSGMFAPY	-DETTPILNDL	PIKQHLPECL	NGEFVRYGPH	PKFAPVAGYH	WFDDDDMIMG	LRIKDKKA-T	YVSRFYRTRR	129
LeCCD	AIKLMND	STKPL	PFLGGMFAPT	-DETTPILKVL	PVIGHLPECL	NGEFVRYGPH	PKFAPVAGYH	WFDDDDMIMG	LQIKDKKA-T	YVSRFYRTRR	127
AtNC1ND	ASLPL	HYLSGMFAPY	RDETTPVADL	PVNGFLPECL	NGEFVRYGPH	PKFAPVAGYH	WFDDDDMIMG	VRIKDKKA-T	YVSRFYRTRR	87
Vp14	QFVANVLERP	HQLPSTADPA	VQIAGNFAPY	-GERPPVHEL	PVSGRIFFPI	DGVYARNGAN	PCFDPVAGYH	LFDDDDMIVA	LRIKDKKA-T	YVSRFYRTRR	129	
CmCCD	AVYVLFND	KSKPC	HYLSGMFAPY	VDETTPCPDL	PVNGHLPECL	NGEFVRYGPH	PKFAPVAGYH	WFDDDDMIMG	LRIKDKKA-T	YVSRFYRTRR	128
PaCCD	LIVG	PC	-LLSQGF	-PLRYEETPCENL	PIKQTRIRAH	NGEFVRYGPH	PKFAPVAGYH	WFDDDDMIMG	LRIKDKKA-T	YVSRFYRTRR	113
BoCCD	QLARFVND	QSMFY	HYLSGMFAPY	MEEAPTCNL	PVKGFMPAL	NGEFVRYGPH	PKFAPVAGYH	WFDDDDMIMG	LRIKDKKA-T	YVSRFYRTRR	128
BoLCD	2
BoCCD2	WFDDDDMIMG	LRIKDKKA-A	YVSRFYRTRR	29
CmCCD	LKQEEFFQGA	KFMK-IDDLK	GLFQLLMVNM	QM--LRALKL	VLDVSYGNT	ANTALVYHNG	KLLALSEADK	PYVKVL-ED	ODLQTLQMLD	YDKRLHSHFT	215	
VcCCD	LKQEEFFQGA	KFMK-IDDLK	GLFQLLMVNM	QM--LRALKL	ILDVSYGNT	GNTALVYHNG	KLLALSEADK	PYVKVL-ED	ODLQTLQMLD	YDKRLHSHFT	221	
CmCCD	LKQEEFFQGA	KFMK-IDDLK	GLFQLLMVNM	QM--LRALKL	VLDVSYGNT	GNTALVYHNG	KLLALSEADK	PYVKVL-ED	ODLQTLQMLD	YDKRLHSHFT	222	
PehyCCD	LKQEEFFQGA	KFMK-IDDLK	GLFQLFTVM	QM--LRALKL	LDVSYGNT	ANTALVYHNG	KLLALSEADK	PYVKVL-ED	ODLQTLQMLD	YDKRLHSHFT	225	
LeCCD	LKQEEFFQGA	KFMK-IDDLK	GLFQLFTVM	YM--LREKRL	YLDVSYGNT	ANTAMITHNG	KLLALHEGDK	PYVKVL-ED	ODLQTLQMLD	YDKRLHSHFT	223	
AtNC1	LKQEEFFQGA	KFMK-IDDLK	GLFQLLMVNM	QM--LRTKRL	LDVSYGNT	ANTALVYHNG	KLLALSEADK	PYVKVL-ED	ODLQTLQMLD	YDKRLHSHFT	183	
Vp14	LRQEARIGRP	VFPKAIQELM	ONSGI--ARL	ALFYARAACO	LYDPSAOTGV	ANAQVYVFGH	RLLAHSEADK	PYVKVL-ED	ODLQTLQMLD	YDKRLHSHFT	200	
CmCCD	LKQEEFFQGA	KFMK-IDDLK	GLFQLFTVM	QM--LRTKRL	LDVSYGNT	GNTALVYHNG	KLLALSEADK	PYVKVL-ED	ODLQTLQMLD	YDKRLHSHFT	224	
PaCCD	LKQEEFFQGA	KFMK-IDDLK	GLFQLFTVM	QM--LRTKRL	LDVSYGNT	GNTALVYHNG	KLLALSEADK	PYVKVL-ED	ODLQTLQMLD	YDKRLHSHFT	211	
BoCCD	LKQEEFFQGA	KFMK-IDDLK	GLFQLFTVM	EM--LRTKRL	LIDITYGNT	GNTALVYHNG	KLLALSEADK	PYVKVL-ED	ODLQTLQMLD	YDKRLHSHFT	224	
BoLCD	80
BoCCD2	FKQEEFFQGA	KFMK-IDDLK	GLFQLLMVNL	QI--LRARKT	VLDVSYGNT	GNTALVYHNG	KLLALHEGDK	PYVKVL-ED	ODLQTLQMLD	YDKRLHSHFT	125	
CmCCD	ANPKVDPVGT	EMFTFGYANT	P-PYITRYVI	SKDGMHDP	VF-I-TVSDPI	MMHDFAITEN	272
VcCCD	ANPKVDPVGT	EMFTFGYANT	P-PYITRYVI	SKDGMHDP	VF-I-TVSDPI	MMHDFAITEN	279
CmCCD	ANPKVDPVGT	EMFTFGYANT	P-PYITRYVI	SKDGMHDP	VF-I-TVSDPI	MMHDFAITEN	279
PehyCCD	ANPKVDPVGT	EMFTFGYANT	P-PYITRYVI	SKDGMHDP	VF-I-TVSDPI	MMHDFAITEN	282
LeCCD	ANPKVDPVGT	EMFTFGYANT	P-PYITRYVI	SKDGMHDP	VF-I-TVSDPI	MMHDFAITEN	280
AtNC1	ANPKVDPVGT	EMFTFGYANT	P-PYITRYVI	SKDGMHDP	VF-I-TVSDPI	MMHDFAITEN	240
Vp14	ANPKVDPVGT	EMFTFGYANT	P-PYITRYVI	SKDGMHDP	VF-I-TVSDPI	MMHDFAITEN	280
CmCCD	ANPKVDPVGT	EMFTFGYANT	P-PYITRYVI	SKDGMHDP	VF-I-TVSDPI	MMHDFAITEN	354
PaCCD	ANPKVDPVGT	EMFTFGYANT	P-PYITRYVI	SKDGMHDP	VF-I-TVSDPI	MMHDFAITEN	281
BoCCD	ANPKVDPVGT	EMFTFGYANT	P-PYITRYVI	SKDGMHDP	VF-I-TVSDPI	MMHDFAITEN	288
BoLCD	ANPKVDPVGT	EMFTFGYANT	P-PYITRYVI	SKDGMHDP	VF-I-TVSDPI	MMHDFAITEN	281
BoCCD2	ANPKVDPVGT	EMFTFGYANT	P-PYITRYVI	SKDGMHDP	VF-I-TVSDPI	MMHDFAITEN	119
BoCCD2	ANPKVDPVGT	EMFTFGYANT	P-PYITRYVI	SKDGMHDP	VF-I-TVSDPI	MMHDFAITEN	180

Figura 4.1. Comparación del fragmento de la CCD aislada (BoCCD2) con secuencias de otras dioxigenasas de plantas. CisCCD: Citrus sinensis; **VvCCD:** Vitis vinifera; **CmCCD:** Cucumis melo; **PehyCCD:** Petunia x hybrida; **LeCCD:** Solanum lycopersicum; **AtNC1:** Neoxanthin Cleavage Enzyme nc1 de Arabidopsis thaliana (AAN17413); **Vp14:** Zea mays; **CsCCD:** Crocus sativus; **PaCCD:** Persea americana; **BoCCD:** Carotenoid Cleavage Dioxygenase de Bixa orellana L. (CAD71148); **BoLCD:** Lycopen cleavage dioxygenase de Bixa orellana L. (AJ489277); **BoCCD2:** secuencia parcial de la dioxigenasa de Bixa orellana L. aislada (EF493214).

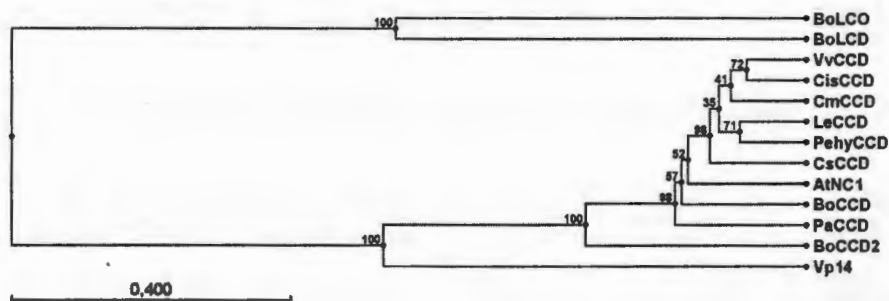


Figura 4.2. *Árbol filogenético de la CCD aislada (BoCCD2) y otras CCD's reportadas para plantas. CisCCD: Citrus sinensis; VvCCD: Vitis vinifera; CmCCD: Cucumis melo; PehyCCD: Petunia x hybrida; LeCCD: Lycopersicum esculentum; AtNC1: Neoxanthin Cleavage Enzyme NC1 de Arabidopsis thaliana (AAN17413); Vp14: Zea mays; CsCCD: Crocus sativus; PaCCD: Persea americana; BoCCD: Carotenoid Cleavage Dioxygenase de Bixa orellana L. (CAD71148); BoLCD: Lycopene Cleavage Dioxygenase de Bixa orellana L. (AJ489277); BoCCD2: secuencia parcial de la dioxigenasa de Bixa orellana L. aislada (EF493214); BoLCO: Lycopene Cleavage Oxygenase de Bixa orellana L. (CAD33263). BoCCD es la única de las dioxigenasas de B. orellana L. que parece compartir el mismo ancestro que la CCD parcial aislada.*

Finalmente, se realizó un análisis de homología (Figura 4.3) y de relación filogenética (Figura 4.4) con tres dioxigenasas de *B. orellana*, dos involucradas en el rompimiento del licopeno, denominadas lycopene cleavage oxygenase (CAD33263) y lycopene cleavage dioxygenase (AJ489277), y una denominada Carotenoid Cleavage Dioxygenase (CAD71148) (Bouvier *et al.*, 2003).

		180		200	
BoCCD	PKFGAVAGYH	WFDGDMIHG	LRIKDGKA - T	YVSRFVETSR	128
BoCCD2	-----	WFDGDMVHG	MRIKDGKA - A	YVSRVNTSR	29
BoLCD	-----	-----	-----	-----	2
BoLCO	-----	-----	-----	-----	2
		220		240	
BoCCD	LKQEEYFCAG	KFMK - VGD LK	GMFGLLMVFL	EM - -LRTKLR	165
BoCCD2	FKQEDFFEGP	KFMK - IGD LK	GLFGLLMVHL	QI - -LRAKTK	68
BoLCD	-----	-----	-----	-----	2
BoLCO	-----	-----	-----	-----	2
		260		280	
BoCCD	LIDITYGSGT	GNTALVYHHG	KLLALSEADK	PYALKVL - ED	204
BoCCD2	VIDTTYGVGT	GNTALVYHHG	KLLALNEGDK	PYVLKVL - ED	105
BoLCD	-VEPTRGIGL	ANTSLQFSNG	RLHALCEYDL	PYVRLSPED	41
BoLCO	-VEPTRGIGL	ANTSLQFSNG	RLHALCEYDL	PYVRLSPED	41
		300		320	
BoCCD	GDLQTLGILD	YDKRLSHSFT	AHPKVDPVTG	EMFTFGYAHT	244
BoCCD2	GDLQTIQLLD	YDKRLSHSFT	AHPKVDPVTG	EMFTFGYSHE	145
BoLCD	GDISTVGRIE	NNVS - TKSTT	AHPKTDVPTG	ETFSFSYGP I	80
BoLCO	GDISTVGRIE	NNVS - TKSTT	AHPKTDVPTG	ETFSFSYGP I	80
		340		360	
BoCCD	P - PYITYRVI	SKDGLMHDP -	VPI - TISDSL	MMHDFAITEN	281
BoCCD2	A - PYITYRVI	SKDGFMHDP -	VPI - TISEPI	MMHDFAIT -	180
BoLCD	Q - PYVTYSRY	DCDDKKSQPD	VPIFSFKEPS	FVHDFAITEH	119
BoLCO	Q - PYVTYSRY	DCDDKKSQPD	VPIFSFKEPS	FVHDFAITEH	119

Figura 4.3. Alineamiento de la secuencia polipeptídica correspondiente al fragmento de 168 aa de la dioxigenasa aislada con fragmentos equivalentes de las secuencias de las otras dioxigenasas ya reportadas para *Bixa orellana* L. (Bouvier et al., 2003). BoLCD: Lycopene Cleavage Dioxygenase de *Bixa orellana* L. (CAD33263), BoLCO: Lycopene Cleavage oxygenase de *Bixa orellana* L. (AJ489277), BoCCD2: secuencia parcial de la dioxigenasa de *Bixa orellana* L. aislada (EF493214), BoCCD: Carotenoid Cleavage Dioxygenase de *Bixa orellana* L. (CAD71148).

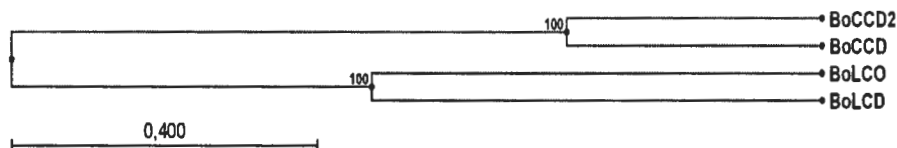


Figura 4.4. Dendrograma de las dioxigenasas reportadas para *Bixa orellana* L. Como se puede observar, el fragmento de la CCD aislada (BoCCD2) no parece compartir un alto grado de identidad a nivel evolutivo con la dioxigenasa reportada para *B. orellana* L. por Bouvier y cols. (2003) como la implicada en la síntesis de bixina, BoLCD.

La secuencia parcial de la dioxigenasa aislada en este trabajo guarda más del 80% de homología con las otras tres CCDs de esta especie y en menor proporción, con las descritas para otras especies. Asimismo, en el análisis filogenético se pudo observar que esta nueva dioxigenasa guarda mayor relación con una CCD diferente (*BoCCD*) a la reportada para la síntesis de bixina (*BoLCD*) (Figura 4.4).

4.3.2 ANÁLISIS DE LA POSIBLE FUNCIÓN DE *BoCCD2* EN LA SÍNTESIS DE BIXINA

4.3.2.1 DOMINIOS CONSERVADOS

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la dioxigenasa aislada reveló un dominio característico de la superfamilia RPE65 (Figura 4.5). RPE65 es una de las primeras enzimas caracterizadas para la biosíntesis de apocarotenoides, en particular de retinoides, de donde su actividad como dioxigenasa había sido inferida. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que en más de una dioxigenasa, RPE65 actúa como una retinoide isomerasa (Auldrige *et al.*, 2006). El dominio conservado característico de RPE65 está presente en enzimas de plantas involucradas en el rompimiento oxidativo de la neoxantina (derivado del carotenoide con anillos tipo β : la zeaxantina), como es el caso del producto del gen NC1 de *Arabidopsis thaliana*. De igual forma, dicho dominio se encuentra presente en β -dioxigenasas de bacterias.



Figura 4.5. Dominio catalítico característico de RPE65 contenido en el fragmento de la CCD aislada de *Bixa orellana* L. Este dominio está presente en diversas enzimas de plantas involucradas en el rompimiento oxidativo de β -carotenoides tales como la neoxantina.

El dominio RPE65 es el encargado de la actividad catalítica de las CCD's que utiliza hierro como cofactor. La presencia del Fe como cofactor es característico de las dioxigenasas como las lipoxigenasas (LOX), las cuales catalizan el rompimiento oxidativo (dioxigenaciones dobles) de ácidos grasos insaturados (como el licopeno) y la co-oxidación de carotenoides para formar ácido abscísico. Asimismo, las LOX de plantas son enzimas monoméricas con una masa molecular de 95-100 kDa que se localizan predominantemente en el citoplasma, asociadas con vacuolas,

mitocondrias, cloroplastos, membranas microsomales y el plasmalema (Prescott & John, 1996).

4.3.2.2 FILOGENIA

Para lograr un mayor acercamiento hacia la definición de la posible función de *BoCCD2*, se obtuvo de un análisis de filogenia del dominio RPE65 que presenta. Para este análisis se consideró exclusivamente el dominio referido. De este modo, aplicando el Algoritmo Rápido de Evolución Mínima (Desper & Gascuel, 2002), se obtuvo el dendograma correspondiente al dominio RPE65 de las CCDs mostrado en la Figura 4.6.

BoCCD2 comparte el mismo ancestro con una dioxigenasa de *Persea americana* que está relacionada con los niveles de ABA en los frutos. Esta enzima actúa fragmentando violaxantina y neoxantina, ambos carotenos derivados de la zeaxantina, de forma similar a la VP14 de *Zea mays*. Adicionalmente, la licopeno dioxigenasa (BoLCD, AJ489277; Bouvier *et al.*, 2003) se ubica en un clado diferente al de *BoCCD2*.

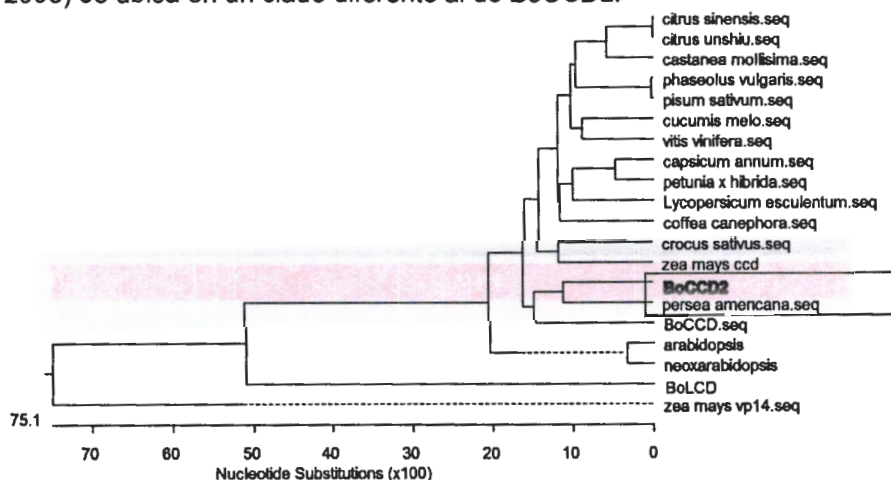


Figura 4.6. Árbol filogenético generado con secuencias del dominio RPE65 conservado en CCDs (secuencias en aa) y contenido en el fragmento aislado (*BoCCD2*). Los nombres científicos fueron emplados para identificar las especies vegetales de las que fueron aisladas, a excepción de las reportadas para *B. orellana* L. BoCCD: Carotenoid Cleavage Dioxigenase de *Bixa orellana* L. (CAD71148); BoLCD: Lycopene Cleavage Dioxigenase de *Bixa orellana* L. (AJ489277); BoCCD2: secuencia parcial de la dioxigenasa de *Bixa orellana* L. aislada (EF493214).

4.4 Discusión y Conclusiones

4.4.1 ANÁLISIS DE IDENTIDAD DE *BoCCD2*, LA PRESUNTA CCD AISLADA

La secuencia de *BoCCD2* posee una alta similitud con diferentes dioxigenasas de plantas, pero es diferente a las involucradas previamente reportadas por Bouvier y col. (2002 y 2003), especialmente a la responsable del remodelamiento oxidativo del licopeno (*BoLCD*), que da lugar a la bixina aldehído y finalmente a la bixina. Dichas diferencias también se pueden observar a nivel evolutivo, ya que sólo una dioxigenasa, *BoCCD*, parece compartir un mismo ancestro con *BoCCD2* (Figura 4.4).

De igual forma, es posible que *BoCCD2* guarde cierta similitud a nivel de función con las CCD's con las que comparte una mayor homología a nivel de secuencia (Figura 4.6), como son la CCD1 de *Petunia x hybrida* (Simkin *et al.*, 2004) y la CCD de *Cucumis melo* (Mwafaq *et al.*, 2006), que están involucradas en la biosíntesis de β -ionona así como las CCD de *Citrus sp.* involucradas en el rompimiento de la β -criptoxantina, zeaxantina y trans-violaxantina para formar xantonina (Kato *et al.*, 2006). También, *BoCCD2* podría participar en una reacción similar a la de *Crocus sativus* que rompe la zeaxantina para producir glucósidos de crocetina, picocrocina y safranal (Bouvier *et al.*, 2003; 2003b).

Dadas las similitudes que a nivel de secuencia se han señalado y considerando las diferencias encontradas entre nuestra secuencia y las dioxigenasas reportadas de *B. orellana* L., es posible inferir que la hemos aislado un nuevo miembro de la familia de dioxigenasas presentes en *Bixa orellana* L. Asimismo, al realizarse un análisis filogenético de *BoCCD2* limitado a la región que contiene el dominio conservado de la superfamilia RPE65, fue posible determinar que la dioxigenasa aislada comparte el mismo ancestro que la reportada para aguacate, involucrada en la síntesis de moléculas precursoras del ácido abscísico.

4.5 Referencias

1. Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers and DJ Lipman (1990). *Basic local alignment search tool*. Journal of Molecular Biology, 215 (3), 403–410.
2. Auldridge ME, DR McCarty and HJ Klee (2006). *Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products*. Current Opinion in Plant Biology, 9(3), 315–321
3. Bouvier F, O Dogbo and B Camara (2003a). *Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annato)*. Science, 300(5628), 2089-2091.
4. Bouvier F, C Suire, J Mutterer and B Camara (2003b). *Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in Crocus secondary metabolite biogenesis*, The Plant Cell, 15(1), 47-62.
5. Bao-Cai T, SH Schwartz, JAD Zeevart and DR McCarty (1997). *Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize*. Proceedings of the Natural Academy of Sciences, 94(22), 12235-12240.
6. Desper R and O Gascuel (2002). *Fast and accurate phylogeny reconstruction algorithms based on the minimum-evolution principle*. Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology. 9(5), 687-705.
7. Fay LB, A Newton, H Simian, F Robert, D Douce, P Hancock, M Green and I Blank (2003). *Potential of gas chromatographyorthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry (GC-oaTOFMS) in flavor research*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(9), 2708–271.
8. Kato M, H Matsumoto, Y Ikoma, H Okuda and M Yano (2006). *The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation in citrus fruit*. Journal of Experimental Botany, 57(10), 2153-2164.
9. Mathieu S, N Terrier, J Procureur, F Bigey and Z Günata (2005). *A carotenoid cleavage dioxygenase from Vitis vinifera L.: functional characterization and expression during grape berry development in*

- relation to C13-norisoprenoid accumulation. Journal of Experimental Botany, 56(420), 2721-2731.*
10. Mount DW, (2004). *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*. Cold Spring Harbor Press.
 11. Mwafaq I, A Yaniv, P Vitaly, W Boris, B Einat, M Ayala, B Yossi, A Schaffer, N Katzir, Y ladnor and E Lewinsohn (2006). *Functional characterization of CmCCD1, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon*. *Phytochemistry*, 67(15), 1579-1589.
 12. Ohmiya A, S Kishimoto, S Aida, S Yoshioka and K Sumitomo (2006). *Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in Chrysanthemum petals*. *Plant Physiology*, 142(1), 1193-1201.
 13. Prescott AG and P John (1996). *Dioxygenases: Molecular structure and role in plant metabolism*. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), 245-271.
 14. Qin X and JAD Zeevaart (1999). *The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, 96(26), 15354-15361.
 15. Sambrook J, EF Fritsch and T Maniatis (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1659 p.
 16. Smith RF, BA Wiese, MK Wojzynski, DB Davison and KC Worley (1996). *BCM Search Launcher. An integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on the World Wide Web*. *Genome Research*. 6(5), 454-62.
 17. Schwartz SH, BC Tan, DA Gage, JAD Zeevaart and DR McCarty (1997). *Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of Maize*. *Science*. 276 (5320), 1872-1874.
 18. Schwartz SH, X Qin and JAD Zeevaart (2001). *Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants*. *Biochemical Journal*. 276(1), 25208-25211.

19. Schwartz SH, X Qin and MC Loewen (2004). *The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from Arabidopsis indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching.* Biochemical Journal. 279(1): 46940-46945.
20. Simkin AJ, SH Schwartz, M Auldridge, MG Taylos and HJ Klee (2004). *The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone.* The Plant Journal, 40(6), 882-892.
21. Tan BC, LM Joseph, WT Deng, L Liu, QB Li, K Cline and DR McCarty (2003). *Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family.* The Plant Journal, 35(1), 44-56.

Capítulo V

Expression profile of a new CCD isolated from *Bixa orellana* and its potential role in apocarotenoid accumulation

Rodríguez-Ávila N.L., Ramírez-Benítez J.E., Narváez-Zapata J.A., Aguilar-Espinosa M.L. and Rivera-Madrid R.

En este capítulo se presenta el manuscrito preparado para la revista *Journal of Experimental Botany*. En éste se describen los resultados de los análisis de la acumulación de mensajeros de *BoCCD2*. Además del estudio detallado de la expresión y de la localización del RNAm de *BoCCD*, se analizó el contenido de pigmentos y la localización de la bixina en diferentes tejidos de plantas adultas, plántulas y en diferentes etapas del desarrollo de las semillas de *B. orellana*.

5.1 Abstract

Carotenoid cleavage dioxygenases (CCDs) are an important class of enzymes involved in the biosynthesis of a broad diversity of apocarotenoids. In plants, CCDs are part of a gene family with members which cleave specific double bonds of carotenoid molecules. CCDs are involved in the production of diverse metabolites such as ABA, flavonoids, ethylene, gibberellins and alkaloids. *Bixa orellana* is originated from the tropical region of America best known as the source of the pigment annatto or bixin, an apocarotenoid highly accumulated in its seeds. There is great economic interest in this crop because of the use of bixin as an alternative to synthetic pigments in food and the cosmetic industry. The apocarotenoid biosynthesis pathway has only been studied for bixin production, where a CCD is involved in the cleavage of lycopene as the first step to bixin biosynthesis has been confirmed. However, the involvements of other CCD genes in the biosynthesis of the wide variety of apocarotenoids found in this plant have not been well documented. In this study, a partial new CCD gene (*BoCCD2*) was identified and its expression was characterized in organs of *B. orellana*. Bioinformatic analysis of the *BoCCD2* sequence showed high homology with plant CCDs involved mainly in the cleavage of cyclic carotenes, with no apparent redundancy with other members of the CCD family. Here we systematically analyzed the expression profile of the *BoCCD2* gene in relation to total carotenoids and other apocarotenoids such as ABA and bixin. *BoCCD2* expression during different development stages and in different tissues was documented in detail and discussed with regards to different apocarotenoids contents.

5.2 Keywords

Apocarotenoids, carotenoid cleavage dioxygenases, bixin, *Bixa orellana*

5.3 Introduction

Apocarotenoids are terpenoids derived from the oxidative cleavage of carotenoids (Wahlberg and Eklund, 1998). They are generated when double bonds in carotenoid molecules are cleaved through a reaction involving molecular oxygen, with the formation of an aldehyde or ketone group at the cleavage site. Carotenoids can be cleaved at any of their conjugated double bonds, resulting in a diverse set of apocarotenoids (Auldridge *et al.*, 2006). These metabolites are widely distributed in plants, contributing to the flavor and/or aroma of flowers and fruits (i.e. β -cyclocitral, α - and β -damascenone,

geranial, genaryl acetone, β -ionone). Some apocarotenoids have significant biological functions, such as abscisic acid which is involved in dormancy and drought tolerance (Luchi *et al.*, 2001); β -ionone, a pollinator attractant (Simkin *et al.*, 2004) and strigolactone which promotes the germination of parasitic plants of genera such as *Striga* and *Orobanche* (Matusova *et al.*, 2005).

An example of a plant with a high accumulation of apocarotenoids is *Bixa orellana*, whose total carotenoid contents accounts for 2 % of the total dry weight of their seeds (Rivera-Madrid *et al.*, 2006), bixin being the most abundant. Seed extracts contain a wide variety of apocarotenoids including both lineal (i.e.; Methyl (9Z)-apo-8'-lycopenoate) and cyclic ones (i.e.; methyl (all-E)-8'-apo- β -caroten-8'-oate) (Bittencourt *et al.*, 2005, Mercadante *et al.*, 1997). However, apocarotenoid profiles in non-seed tissues and their accumulation patterns along plant developmental stages remain to be clarified.

Although apocarotenoid formation can also occur via nonspecific oxidation, biologically active forms with regulatory functions are expected to be generated via site-specific cleavage. In this way, several enzymes mediating the site-specific carotenoid cleavage are needed to generate biologically active apocarotenoids. On the basis of the identified substrates and their presumed mechanism of catalysis, these enzymes are referred to as carotenoid cleavage dioxygenases (CCDs) (Auldrige *et al.*, 2006). The CCD family is ancient, with a high number of members present in bacteria, plants and animals. A pathway for bixin biosynthesis has been documented in a heterologous system (Bouvier *et al.* 2003). Authors identified three *B. orellana* genes codifying three enzymes required for bixin synthesis from the lineal carotene lycopene: lycopene cleavage dioxygenase (*BoLCD*), bixin aldehyde dehydrogenase (*BoBADH*) and norbixin methyltransferase (*BonBMT*). To date, the bixin biosynthesis pathway only has been clarified and confirmed in a heterologous system (Bouvier *et al.*, 2003a), therefore the CCD enzymes responsible for the synthesis of the broad apocarotenoid diversity observed in the plant tissues remain to be identified.

In this study, we isolated a partial cDNA coding a putative new member of the CCD family (*BoCCD2*) in *B. orellana*. The *BoCCD2* ORF sequence differs from the previous CCD isolated in this plant (*BoLCD*) and shares a high homology with other plant CCDs involved with the formation of cyclic apocarotenoids.

The expression of this new CCD member in *B. orellana* (*BoCCD2*) was documented during several plant development stages and during seed

formation. *BoCCD2* expression displayed a behavior closely related to carotenoid accumulation. *In situ* hybridization was used for the first time in this plant to document the particular *BoCCD2* expression in cells that accumulate apocarotenoids pigments.

5.4 Materials and Methods

5.4.1 PLANT MATERIAL

Leaves, floral buds, open flowers, immature fruits of 30 days post-anthesis, immature and mature seeds (from mature and dehiscent fruit collected 60 days post-anthesis) were harvested from *B. orellana* cultivated at a commercial plantation in Chicxulub, Yucatán, México. Additionally, immature fruits from six different developmental stages were selected on the basis of the width and height of their valves (1.5x1.5 cm, 2x2.5 cm, 2.5x2.5 cm, 3.5x4 cm, 4.5x5 cm and 5x 4.5cm) and harvested to obtain seeds with six different grades of maturity. All tissues were obtained from a variant with pink flowers and high pigment contents, recently characterized by Rivera-Madrid *et al.* (2006). In addition, 30 days old plantlets were obtained by germination of pre-treated seeds, as described by Narváez *et al.* (2001), and leaves, stalk and roots were collected. Samples were immediately frozen by immersion in liquid N₂ and stored at -80 °C until analysis. For *in situ* RT-PCR analysis and pigment localization, fresh tissues were cut into small pieces and immersed in 5 vol of AMBION® RNA Later solution (Applied Biosystems Inc., CA, USA), keeping fixed samples at 4 °C prior to embedding and sectioning.

5.4.2 ASSESSMENT OF CAROTENOID CONTENT AND DISTRIBUTION

For total carotenoid content, 10 mg of freeze-dried tissues were ground with a pestle and mortar and extracted with 10 ml of ice-cold chloroform in semi-darkness. Each mixture was shaken vigorously for 5 min and filtered through a nylon membrane (0.45 µm pore size). Subsequently, 100 µl of each extract was adjusted to 3 ml with chloroform and then absorbance measured with a DU 650 Beckman-Coulter spectrophotometer at a wave length range from 404 to 480 nm. Carotenoid content was calculated using the equation reported by Wellburn (1994).

For chromatografic analysis of carotenoid and apocarotenoid compounds, 100 mg of freeze-dried, powdered tissues were extracted with 1 ml of acetonitrile/methanol/isopropanol mixture (75:10:15 v/v/v). Samples were vortexed, centrifuged at 14000 rpm for 10 min and the supernatants were filtered through a PVDF membrane (0.22 µm pore size). A volume of 0.25 µL was injected into a Hypersil ODS C-18 reverse phase column (250 mm x

4.6 mm; 5- μ m bead diameter) and analytes were separated by high pressure liquid chromatography (HPLC). The mobile phase consisted of solvent A (acetonitrile/methanol/isopropanol [75:10:15 by volume]) and solvent B (tetrahydrofuran, THF) and chromatographic separation was performed at a flow rate of 1 mL min⁻¹ as follows: Step 1, 100% solvent A at injection, for 15 min; Step 2, linear increase to 100% solvent B in 4 min; Step 3, 100% solvent B for 16 min; Step 4, return to 100% solvent A in 1 min; Step 5, 100% solvent A for 25 min. Carotenoids were identified based on their column retention time relative to β -carotene, lycopene, abscisic acid and bixin standards, and carotenoid concentration was inferred from specific peak area relative to a standard curve (Britton, 1995). Both HPLC and spectrophotometric data represented the mean of three replicates \pm standard error.

For pigment distribution, fresh tissue samples were fixed with 4 % neutral, buffered formalin and embedded in 5% melted agarose. Agarose blocks were mounted in wooden holders and sectioned (30–40 μ m slice thickness) with a microtome. Agarose was eliminated from tissue sections, which were stained by the Periodic acid-Shift (PAS) staining method. Fresh and stained sections were observed with a light transmission microscope for general morphology and pigment tissue localization. Photographs were taken by an Axiocam digital camera coupled to a microscope and analyzed by Axiovision associated software.

5.4.3 ISOLATION OF THE CCD PROBE

Total RNA was obtained from different immature seeds by the method previously reported by Rodríguez-Ávila *et al.*, (2009) and the cDNA population was obtained by a retrotranscriptase reaction. *BoCCD2* cDNA was amplified by PCR with degenerate primers (FwCCD: 5'-TGGTTYGAYGGNGAYGGNATG-3' and RvCCD 5'-GTDATNGCRAARTCRTGCATCAT-3'). For primer design, conserved sequences were identified by the alignment of two dioxygenases reported for *B. orellana* (CAD71148; AJ489277), and other plant CCD orthologous genes. PCR products were purified using the Promega Wizard PCR Preps Purification System (Promega, Madison, WI), cloned by a TA cloning kit (Invitrogen, San Diego, CA), and the cloned inserts were sequenced in an automatic sequencer (Davis Sequencing, LLC). Resulting ORF sequences were aligned against the GenBank protein database using the Basic Local Alignment Sequence Tool (BLAST, National Center for Biotechnology Information) and domain homology was confirmed with the CLUSTALW2 tool (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multialign>). Phylogenetic analysis

was performed by CLC Sequence Viewer software using the UPGMA method (<http://www.clcbio.com>).

5.4.4 MEASUREMENT OF *BoCCD2* EXPRESSION LEVEL BY REVERSE TRANSCRIPTASE-MEDIATED PCR

Total RNA for the RT-PCR analysis was isolated from different organs from *B. orellana*. Fifty mg of fresh tissue was homogenized with liquid nitrogen and transferred to a 1.5 ml tube containing 875 μ l of RNA lysis solution (PureLink Micro-to-Midi, Invitrogen, Carlsbad, CA), 125 μ l of "Plant RNA Isolation Aid" reagent (Ambion, Austin, TX) and 10 μ l of β -mercaptoethanol. Samples were vortexed and incubated at 37°C for 5 min. After incubation, 500 μ l of chloroform/isoamyl alcohol (24:1) solution was added and samples were vigorously shaken for 15 s, centrifuged at 16,000xg for 15 min and the supernatant transferred to a new tube. The RNA solution was then incubated at 37°C for 30 min with 5 μ l of rDNase I (2 U/ml) (Invitrogen, San Diego, CA). After incubation, 5 μ l of rDNase I inactivation reagent was added and the solution incubated at 37 °C for 2 min. The sample was then centrifuged at 16,000xg for 1.5 min and the RNA-containing supernatant transferred to a new 1.5 ml tube.

cDNA was synthesized using SuperScript III First-Strand Synthesis System for the RT-PCR kit (Invitrogen, San Diego, CA) according to manufacturer's instructions. After reverse transcription, the *BoCCD2* transcript was amplified by PCR with specific primers (Fw*BoCCD2*, 5'-ATGCAAGTCGAACCAACCAGGGGGATC-3'; Rv*BoCCD2*, 5'-TGCCTGGTTCAGCAGATCCTTGTC-3'), designed from cloned *BoCCD2* cDNA reported in this study ([EF493214](#)). A parallel reaction with 25 cycles and specific primers for *18S rRNA* (5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' and 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3', [AF206868](#)) or β -actin gene (5'-GATGCCCGGAGGTTCTCTTCC-3' and 5'-AGTACAGGTACAACCTCGAGC-3' [EF672732](#)) was run as an expression control for each PCR reaction. Replicates of each PCR reaction were carried out to confirm the results. *BoCCD2* expression relative to *18S rRNA* and to β -actin genes was assessed using a Bio-Image Analyzer GS25 (BioRad, Hercules, CA). Preliminary PCR products were sequenced to verify identity in all cases.

5.4.5 ASSESSMENT OF *BoCCD2* MRNA LOCALIZATION BY *IN SITU* REVERSE TRANSCRIPTASE-MEDIATED PCR

Fresh samples fixed as described above, were washed three times for 10 min in an ethanol:acetic acid:water solution (63:5:32 v/v/v) and once more

with 1X PBS. Samples were then embedded in 5% melted agarose (in 1X PBS). Sample blocks were mounted in wooden holders and sliced in a microtome. Sections (30–40 μm thickness) were washed with RNase-free water and incubated during 1 h with DNase (1 U/ml at 37 °C; Invitrogen, USA). RT-PCR reactions were performed with a "One Step RT/PCR reaction kit" (Invitrogen, USA) using 0.1 μM of specific *BoCCD2* primers and 15 μM of DIG-dUTP. Digoxigenin-labeled PCR products were detected with an AP-coupled anti-digoxigenin antibodies and alkaline phosphatase reaction with NBT/BCIP (Roche, USA). As negative controls, DNase-treated slices were incubated with RNase solution immediately before reverse transcription. In addition, *in situ* RT-PCR analyses were performed with *18S rRNA* and β -*actin* specific primers as positive controls. Digital images from sample slices were captured with a Leica DFC320 digital camera adapted to the *Leica* MZFL III *stereoscopic* microscope and *were processed* using *Leica* IM 50 software.

5.5 Results

5.5.1 PIGMENT CONTENT IN ORGANS OF *B. orellana* PLANTS

Pigment quantification for different *B. orellana* organs showed carotenoids to be most abundant in mature seeds, bixin being the principal apocarotenoid observed in both immature and mature seeds (Table 5.1). In addition, HPLC profiles showed that total pigment content varied greatly during all stages analyzed. Specific apocarotenoids, such as ABA and bixin, seem to be changing according to the developmental stage of the seeds, increasing constantly during their development until the seed reaches its maximum size (Table 5.1). Although bixin content has been widely reported in the mature seeds of *B. orellana* (Rivera-Madrid *et al.*, 2006), the presence of this pigment in other tissues has not been documented. In this study, it was possible to detect bixin by HPLC in other organs such as plantlet stalk, flowers and mature leaves which exhibited a great abundance of bixin (Table 5.1). Young and adult plant leaves also accumulated important amounts of β -carotene (5–15 mg DW g^{-1}), which is involved in the photosynthetic apparatus. However, β -carotene was not detected in other organs (Table 5.1). Lycopene, the precursor of several carotenoids, was not detected in samples analyzed in this study, suggesting a fast turnover of this compound into the carotenoids' biosynthetic pathways. Finally, abscisic acid (ABA) was abundant during seed development with values ranging from 0.4 to 1.22 mg \cdot DW g^{-1} and in green tissues such as leaves and green fruits (Table 5.1). Vegetative organs and flowers accumulated high amounts of carotenoids in their tissues (Table 5.1) and the carotenoids in seeds mainly consisted of bixin and ABA (Table 5.1).

5.5.2 PIGMENT HISTOLOGICAL ANALYSIS

Both fresh and PAS/Alcian blue stained preparations of *B. orellana* tissues showed the presence of pigments, most likely bixin, in specific cells. In the root apex (Figure 5.1, panel A), pigments were detected in pericycle cells, which are located between the vascular pith and endodermis. In addition, mature roots accumulated pigments mainly in the cortex (Figure 5.1, panels B to D). Oily droplets of pigments, larger than starch grains accumulated were observed in the cytosol of cells of roots (Figure 5.1, panels C and D). A similar but higher accumulation of pigments was observed in plant stalks, where pigments were accumulated only in collenchyma cells, in the stem cortex (Figure 5.1, panels E to H). Stereoscopic observations of leaf abaxial surface showed specific pigment accumulation in cell patches uniformly distributed across each whole leaf (Figure 5.1, panels M and N). Histological slices showed cells of spongy mesophyll accumulating pigment droplets (Figure 5.1, panels O and P).

Table 5.1. Accumulation of carotenes and apocarotenoids during different development stages in *B. orellana* L.

	Lycopene	β -carotene	Bixin	ABA	Total carotenoids
	mg. DW ⁻¹				
Plant development					
Leaves	n.d.	15.36 \pm	2.59 \pm 0.39 <i>i</i>	0.49 \pm 0.19 <i>de</i>	33.50 \pm 3.70 <i>c</i>
Flower Bud	n.d.	n.d.	2.44 \pm 0.18 <i>i</i>	1.24 \pm 0.23 <i>b</i>	28.36 \pm 1.03 <i>d</i>
Flower	n.d.	n.d.	3.77 \pm 0.46 <i>gh</i>	n.d.	42.28 \pm 3.02 <i>b</i>
Green fruit	n.d.	n.d.	0.34 \pm 0.02 <i>j</i>	1.89 \pm	4.90 \pm 0.38 <i>i</i>
Immature seed	n.d.	n.d.	8.61 \pm	0.25 \pm 0.08 <i>ef</i>	10.21 \pm 0.34 <i>gh</i>
Mature seed	n.d.	n.d.	52.41 \pm	0.35 \pm 0.06 <i>e</i>	65.18 \pm
Plantlets development					
Leaves	n.d.	12.64 \pm 2.62 <i>b</i>	2.95 \pm 0.31 <i>hi</i>	0.80 \pm 0.06 <i>c</i>	26.58 \pm 0.55 <i>de</i>
Stalk	n.d.	5.7 \pm 1.89 <i>c</i>	3.24 \pm 0.20 <i>hi</i>	0.17 \pm	45.21 \pm 1.57 <i>b</i>
Roots	n.d.	n.d.	0.42 \pm 0.09 <i>j</i>	0.12 \pm	0.67 \pm 0.01 <i>j</i>
Seed development					
Stage 1 (0.1x0.1 mm)	n.d.	n.d.	4.69 \pm	0.41 \pm 0.03 <i>e</i>	7.68 \pm 0.43 <i>hi</i>
Stage 2 (0.1x0.15mm)	n.d.	n.d.	10.62 \pm 0.18 <i>e</i>	0.46 \pm 0.02 <i>de</i>	13.33 \pm 2.02 <i>fg</i>
Stage 3 (0.15x0.2mm)	n.d.	n.d.	12.27 \pm 0.18 <i>d</i>	1.05 \pm 0.11 <i>bc</i>	16.16 \pm
Stage 4 (0.2x0.3 mm)	n.d.	n.d.	17.05 \pm 0.17 <i>c</i>	1.22 \pm 0.05 <i>b</i>	23.90 \pm 0.40 <i>e</i>
Stage 5 (0.3x0.4 mm)	n.d.	n.d.	18.37 \pm 0.40 <i>b</i>	0.86 \pm 0.09 <i>c</i>	25.47 \pm 0.15 <i>de</i>
Stage 6 (0.4x0.5mm)	n.d.	n.d.	18.61 \pm 0.59 <i>b</i>	0.98 \pm 0.04 <i>bc</i>	27.57 \pm 0.24 <i>de</i>

*Values are presented as the means \pm SD of three replicates. Different italic letter indicates significant differences determined by ANOVA statistical test with $P < 0.001$

n.d.: no detected

In immature seeds, pigments were detected in aril cells, observed as oily inclusions of pigment contained in a thin cell layer covering the seed surface (Figure 5.1, panels I to L). Pigment inclusions were distributed equally along the aril layer (Figure 5.1, panel J), over a palisade-like cell layer covering endosperm tissue (Figure 5.1, panel K). We observed that in mature aril cells, pigments occupied the whole cell volume (Figure 5.1, panel L), suggesting that mature aril cells are used for pigment storage, losing their biosynthetic functions. According to this, mature seeds were not viable for further molecular studies.

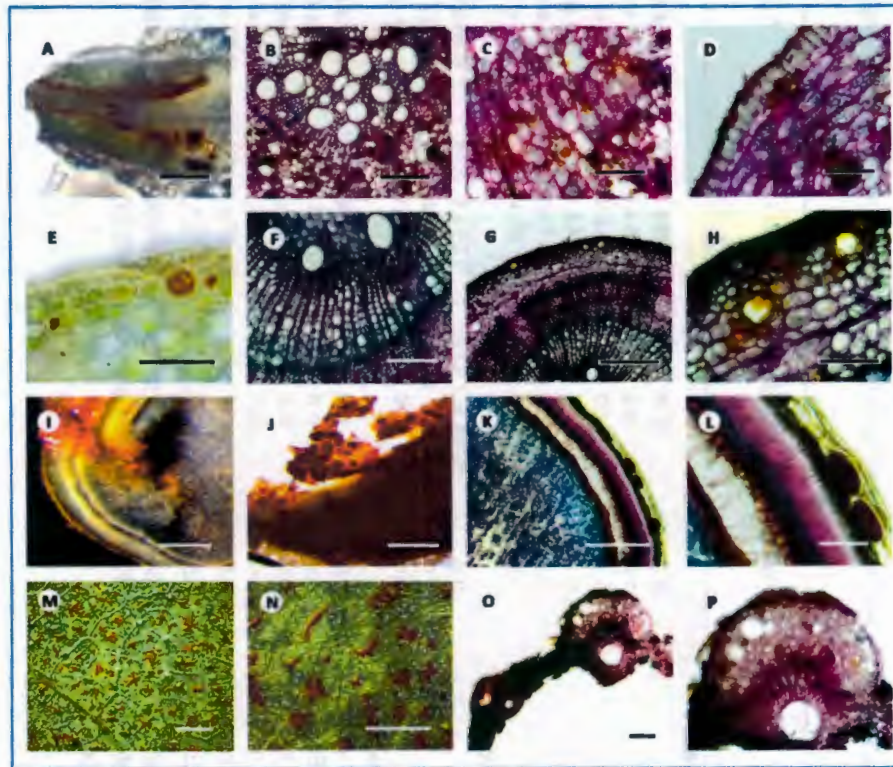


Figure 5.1. Histological analysis of different bixin accumulating *Bixa orellana* plant organs. A-D, plantlet root; E-H, stalk; I- L, immature seed; M-P, leaves. Scale bars: G,M,N,O,P, 400 μm ; A,B,F,I,K = 200 μm ; C,D,E,H,L = 100 μm .

5.5.3 BIOINFORMATIC ANALYSIS OF THE CLONED *BoCCD2* GENE

In general, the ORF of the *BoCCD2* cDNA showed 81-83 % of identity with protein sequences on public databases (Figure 5.2). Higher homology was found with the VIVIPAROUS14 (VP14) gene isolated from maize, involved in the formation of the cyclic apocarotenoid abscisic acid (ABA) (Schwartz *et al.*, 1997). A phylogenetic tree was constructed using the UPGMA method (Figure 5.2), showing a short distance of 0.4 with reference to other plant orthologous genes. The amino acid sequence also reflected the presence of a conserved domain RPE65, which is characteristic of the enzymes involved in the biosynthesis of apocarotenoids. This domain has been well characterized in a broad variety of bacteria β -dioxygenases and in plant CCDs, such as the product of the NC1 gene in *Arabidopsis thaliana*, involved in the zeaxanthin breakage to produce neoxanthin (Auldridge *et al.*, 2006). A graphic scheme showing the conformation and the sites of the sequence isolated coding for the RPE65 domain described is presented in Figure 5.2. A high stringency Southern blot analysis was conducted to detect the copy number of the genes likely to be coding a CCD. In all our experiments at least 5 fragments sharing homology with our CCD probe were detected, suggesting the presence of a multigene family of CCDs in this plant (data not shown).

5.5.4 EXPRESSION OF THE *BoCCD2* GENE IN SEVERAL PLANT ORGANS AND DEVELOPMENTAL STAGES

BoCCD2 expression was evaluated in vegetative organs (young and mature leaves, stems and roots) and in reproductive tissues (flower, fruit and seeds in different developmental stages) by semiquantitative RT-PCR analysis (Figure 5.3). Leaves exhibited a high expression of the *BoCCD2* gene and this expression was maintained throughout plant development (Figure 5.3, panels B and F). In contrast, the plantlet roots and stalks showed a lower expression of this gene in comparison to the leaves (Figure 5.3, panel F). In the flower and its derived structures, *BoCCD2* expression was gradually repressed from the flower bud to green fruit stage (Figure 5.3, panel B). A more detailed analysis was carried out in order to gain information concerning how the *BoCCD2* expression profile could be related to pigment accumulation in immature seeds. *BoCCD2* expression drastically increased through seed maturation, reaching maximum levels at stage 6 of the immature seeds (Figure 5.3, panel D). After seed maturation and desiccation, *BoCCD2* expression was undetectable (Figure 5.3, panel B).

5.5.5 *BoCCD2* GENE EXPRESSION LOCALIZATION

Seeds and some other tissues with elevated amounts of apocarotenoids were chosen to analyze in detail the expression of this gene in several specific cells. In seeds, the CCD probe was detected in the oily cells layer located immediately below the aril (Figure 5.4, panel B) and in a high number of cells located in the aril layer in cells adjacent to bixin deposits (Figure 5.4, panel F); however, it was not detected in the endosperm (Figure 5.4, panel B). This suggests that *BoCCD2* protein could be involved in carotenoid metabolism and specifically with bixin production since these tissues coincided exactly with the major pigment contents detected (Table 5.1).

Similarly, the *BoCCD2* signal was clearly detected in cells corresponding to the xylem and surrounding the tubes of the phloem and in tissues where pigment accumulation was detected, such as in the cells of the parenchyma and periderm in the leaves (Figure 5.2; Figure 5, panels A to B).

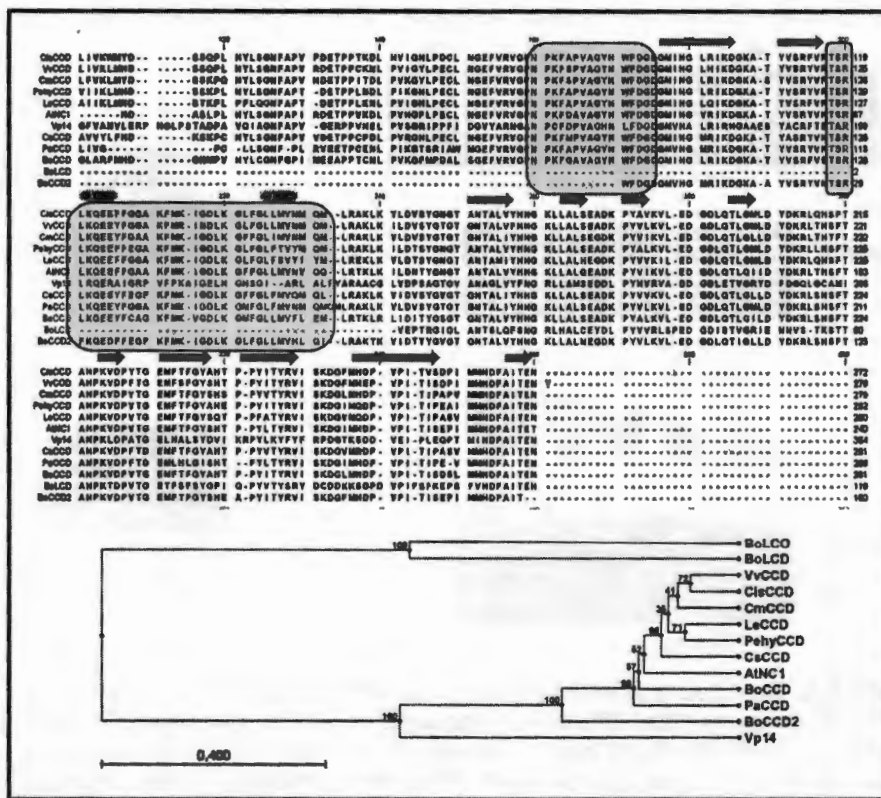


Figure 5.2. (A) Sequence alignment of the CCD probe isolated with other plant dioxygenases. Grey boxes indicate the Location of the RPE65 domain. Grey cylinders and plain arrows indicate the conserved alpha helices and beta strand motifs. (B) Phenogram obtained from the UPGMA phylogenetic analysis of the *B. orellana* CCD isolated. Numbers indicate the units of minimum distance between the different nodes of the tree. CisCCD: Citrus sinensis; VvCCD: Vitis vinifera; CmCCD: Cucumis melo; PeHyCCD: Petunia x hybrida; LeCCD: Lycopersicum esculentum; AtNC1: Neoxanthin Cleavage Enzyme NC1 de Arabidopsis thaliana (AAN17413); Vp14: Zea mays; CsCCD: Crocus sativus; PaCCD: Persea americana; CCD: Carotenoid Cleavage Dioxygenase of *Bixa orellana* (CAD71148); BoLCD: Lycopene Cleavage Dioxygenase of *Bixa orellana* (AJ489277); BoLCO: Lycopene Cleavage Oxygenase of *Bixa orellana* (CAD33263); BoCCD2: partial sequence of the CCD isolated from *B. orellana* (EF493214).

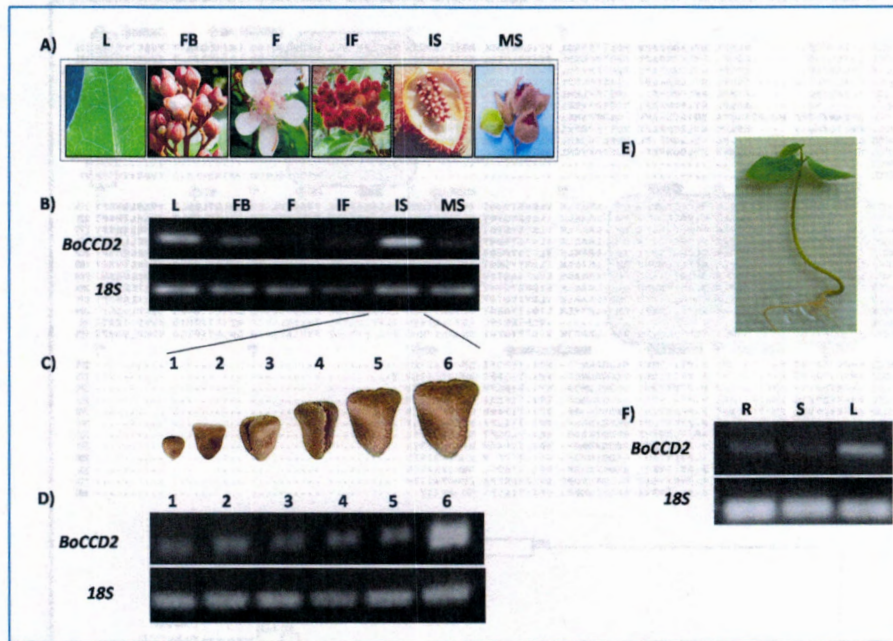


Figure 5.3. BoCCD2 expression throughout different organs of *B. orellana* plants. (A) Images of the different organs used for semi quantitative RT-PCR analysis. L: leaf, FB: floral bud, F: flower, IF: immature fruit, IS: immature seed, MS: mature seed. (B) BoCCD2 RT-PCR expression profile obtained for the tissues shown in (A). (C) Six different developmental stages of the immature seeds. (D) Expression profile of BoCCD2 obtained through seed development. (E) Photo of 30 day-old plantlet. (F) BoCCD2 expression profile obtained for *B. orellana* plantlets. R: root, S: stalk, L: leaf.

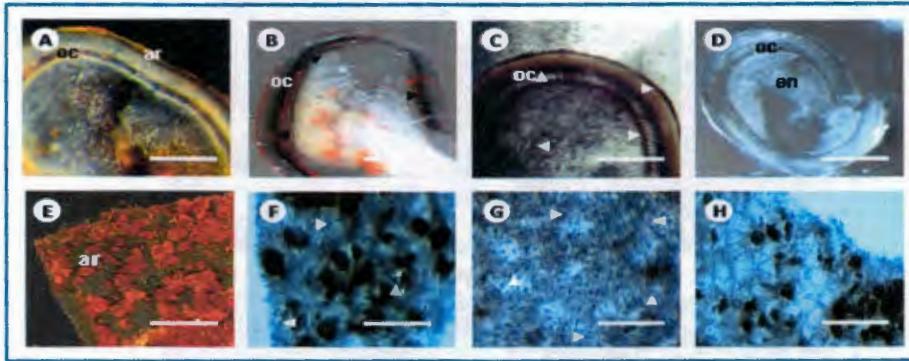


Figure 5.4. BoCCD2 gene location in seed preparations (A-D) and in the dissected aril layer (E-H) from the immature seeds of *B. orellana*. Seed and dissected aril fresh preparations are shown in panel A and E. In situ RT-PCR tissue preparations are shown in panels B to D and F to H, with the following treatments: (B) and (F) BoCCD2 amplification, (C) and (G) Actin amplification, (D) and (H) Digestion with RNase prior to BoCCD2.-Arrow heads point to RT-PCR positive cells. Tissue abbreviations: ar: aril; oc: oily cells; en: endosperm. Scale bars: 400 μm .

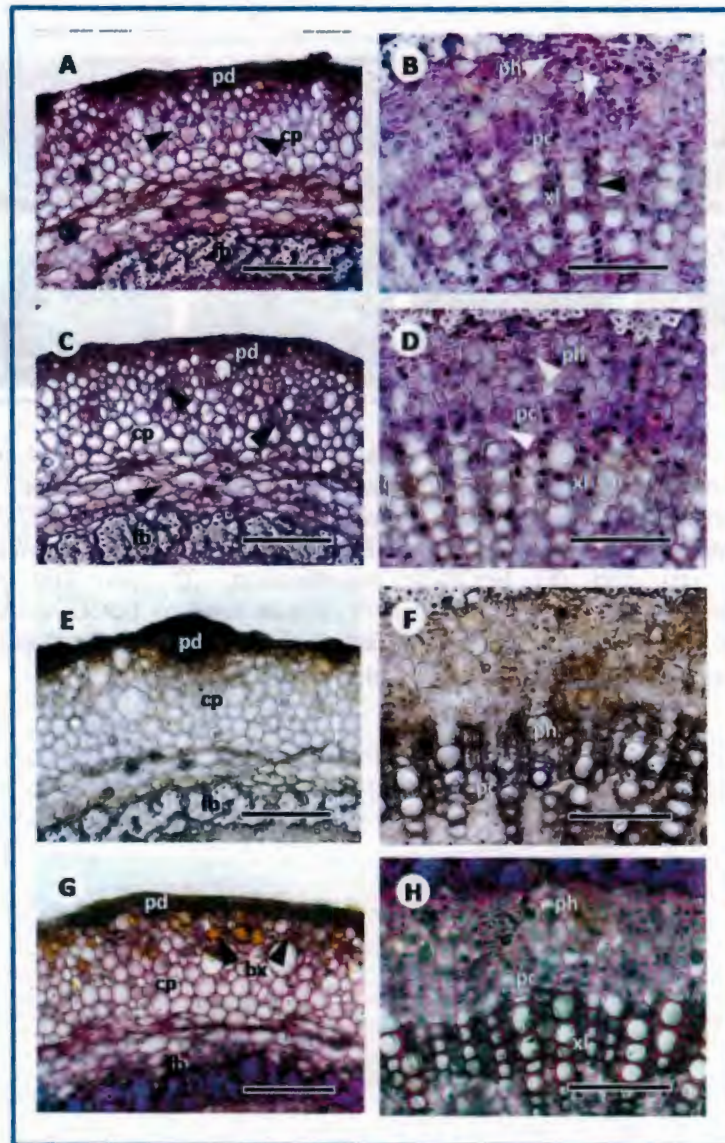


Figure 5.5. CCD gene Location in stalk preparations. A-B, BoCCD2; C-D, actin; E-F, RNase + BoCCD2; G-H, SPA staining. Scale bars: 100 μ m. pc: pericycle, ph: phloem, xl: xylem, cp: cells of parenchyma, pd: peridermis, fb: fibers, pt: pith, ph: phloem, bx: bixin inclusions. Arrow heads: RT-PCR positive cells.

5.6 Discussion

A plethora of apocarotenoid have been reported in the seeds of *B. orellana*, including methyl (9'Z)-apo-6'-lycopenoate, methyl (9Z)-6'-oxo-6,6'-diapocarotenoate and methyl (all-E)-8'-apo- β -caroten-8'-oate, with bixin being the most abundant (Bittencourt *et al.* 2005; Mercadante *et al.* 1997). However, an analysis of *in vivo* metabolic apocarotenoid production has not been conducted in this plant.

Results obtained in this study suggest that apocarotenoid production is not exclusive of seed tissues, since this metabolites were also detected in higher amounts in leaves, roots and stalk (Table 5.1), particularly in the cells surrounding the vascular tissues (Figure 5.1, panel A) and in the epidermal cells (Figure 1, panels D,E,G,H). In the seeds, where bixin is accumulated in higher concentrations and which have been the basis of studies directed towards clarifying its biosynthesis, bixin is located exclusively in the aril (Figure 5.1, panels I to L). Also, a constant increment in bixin production was observed during the development of immature seeds (Table 5.1). ABA was detected in all the adult analyzed tissues and accumulated in greater amounts in floral buds and immature fruits, in accordance with its role in development regulation and fruit maturation (Chernys and Zeevart, 2000; Rodrigo *et al.*, 2006)

Other pigments related to carotene precursors of bixin, such as lycopene (Bouvier *et al.*, 2003a) were undetected in all tissues analyzed suggesting its fast turnover during pigment biosynthesis. Interestingly, higher amounts of β -carotene occurred in the same tissues where bixin accumulation was also observed. Also, β -carotene accumulation was limited to the photosynthetic tissues (leaves and plantlet stalk) as is traditionally reported (Grotewold, 2006).

Carotenoid cleavage dioxygenases (CCDs) are enzymes involved in the production of carotenoids such as bixin. Three CCD genes have previously been isolated for *B. orellana*; however, only one of these has been proved to be responsible for bixin production and its role has been shown in a heterologous system (Bouvier *et al.*, 2003). Here, a new CCD gene was partially isolated (EF493214) and its sequence showed high homology with other plant CCD. Furthermore, the presence of the highly conserved RPE65 domain, which is responsible for the catalytic activity of the CCDs, was found in its sequence (Prescott and John, 1996) (Figure 5.2). Phylogenetic analysis conducted with the sequences of the previously isolated CCD genes for *B. orellana* (CAD33263, CAD71148, AJ489277) and for other

other plants showed that *BoCCD2* shares the same gene ancestor as another CCD isolated for *B. orellana* (CCD gene, **CAD71148**) although *BoLCD* (**AJ489277**), the gene involved in bixin biosynthesis, is located in another clade sharing the same gene ancestor as *BoLCO*, another CCD isolated by Bouvier *et al.*, (2003). *BoCCD2* had the same phylogenetic origin as the CCD isolated from *Persea americana* and that for *Zea mays* (Vp14), both of which are involved in the biosynthesis of the zeaxanthin-derived ABA (Bao-Cai *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997; Chernys and Zeevaart, 2000). In accordance with the above, molecular studies were performed to analyze the role of this new CCD isolated for *B. orellana* on carotenoid and bixin production.

In this sense, the primary expression profiles were obtained for different *B. orellana* tissues which have been analyzed and characterized in previous studies (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). The highest expression of the *BoCCD2* gene occurred in the leaves and immature seeds (Figure 5.3, panel B), both of which contain high levels of carotenoids (Table 5.1). Expression analyses carried out on the CCDs of several plant species have shown that individual genes have a tissue-specific expression profile, being controlled accordingly with the apocarotenoid production such as that involved in the developmental or stress response (Prescott and John, 1996, Bao-Cai *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997, Tan *et al.*, 2003, Bouvier *et al.*, 2003a, b). Here, *BoCCD2* expression was higher in immature seeds although the peak in carotenoids and bixin was observed in mature seeds. These results could mean that *BoCCD2* expression is induced when pigment production begins and is down-regulated when its biosynthesis is accomplished.

A new study was then designed to observe the role of the *BoCCD2* gene more closely in the production of apocarotenoids. Immature seeds corresponding to six different developmental stages were selected to analyze the expression profile of *BoCCD2*. Interestingly, *BoCCD2* mRNA showed a coordinated increment with the maturity of the seeds and with the production of apocarotenoids such as ABA and bixin (Table 5.1, Figure 5. 3, panels C, D). The major carotenoid precursors were absent in these tissues, which strongly suggests the rapid metabolism of these molecules to produce their derivatives. This last observation is also concordant with the high levels of expression of the *BoCCD2* gene, which could be acting in the cleavage of these carotenoids, rendering the high levels of apocarotenoids detected.

Since *BoCCD2* was also up-regulated in photosynthetic tissues of adult plants (Figure 5.3, panel B), a new *BoCCD2* RT-PCR expression profile was

obtained for the leaves, stalk and roots of *B. orellana* plantlets. Interestingly, *BoCCD2* mRNA was present in all of the tissues analyzed, again being up-regulated in the leaves of the plantlets (Figure 5.3, panels E, F). For a third time, it was possible to relate *BoCCD2* expression to apocarotenoids production since high levels of both ABA and bixin were detected in these tissues (Table 5.1, Figure 1, panels M to P). Similarly, in *Crocus sativus* the main CCD (*CsBCH1*) enzyme is present in leaves and stalks, in addition to the stigma of flowers, the traditional tissue source of saffron (Castillo *et al.*, 2005).

To observe the localization of the *BoCCD2* mRNA an *in situ* RT-PCR assay was realized in those tissues where the apocarotenoid production has been observed. Firstly the carotenoid content and distribution between different tissues and cell types was assessed. Results obtained in this study revealed that bixin granules were accumulated in the surface of the aril covering the seeds, which is located over a layer formed by oily cells (Figure 5.4, panel A). In addition, the *in situ* RT-PCR assay showed that the *BoCCD2* transcripts were located in this oily layer, indicating that apocarotenoid production probably starts in this tissue and that a possible translocation of the derived products could be considered (Figure 5.4, panel B). To define whether *BoCCD2* expression could be related to bixin, the major apocarotenoid produced in the seeds, a new *in situ* RT-PCR assay was carried out specifically on the layer of the aril where the bixin granules are finally observed. The results obtained indicated that *BoCCD2* mRNA location is concordant with bixin production because of the strong signal of the CCD probe obtained in this seed tissue (Figure 5.4, panel F).

Due to the fact that during the RT-PCR assay the *BoCCD2* transcripts were observed in the stalk of plantlets, the tissue where pigment contents, specifically the apocarotenoid bixin were highest (Table 5.1), an *in situ* RT-PCR assay was carried out on stalk sections. Results obtained by the analysis derived from the Periodic Acid-Schiff (PAS)/alcian blue preparations indicate that bixin is accumulated specifically in the cells that make up the peridermis (Figure 5.5, panel G). Furthermore, the *BoCCD2* expression was located in the cells surrounding the xylem and phloem tissues (Figure 5.5, panels A, B). In accordance with the above, it is likely that apocarotenoids such as bixin and ABA can be synthesized in the vascular tissues and later exported to the epidermal cells; also, a possible translocation of bixin from stalk and leaves into seeds could be considered. Some important apocarotenoids, such as ABA, act in different tissues from that which they were synthesized; studies aimed at isolating the genes involved in the regulation of ABA translocation within vegetative or seed tissues, or

encoding protein carriers are the goal for further investigation (Nambara and Marion-Poll, 2003). Also, the action of different CCD enzymes on the same carotenoid precursor to produce a specific apocarotenoid is not unusual. In *Persea americana* three genes encoding CCDs were isolated and two of them were strongly induced as the fruit ripened, both being recombinant enzymes capable of in vitro cleavage of 9-cis-xanthophylls into xanthoxin and C25-apocarotenoids (Chernys and Zeevart, 2000). Both translocation and biosynthesis through the action of different enzymes could be the case for bixin. However, further research needs to be conducted to confirm the role of *BoCCD2* on the apocarotenoid diversification in *B. orellana*.

5.7 Acknowledgments

This work was supported by the International Foundation for Science (IFS) F/2932-2 and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 46541 and UC Mexus-CONACYT. Rodríguez-Ávila was supported by CONACYT PhD grant (No 196432).

5.8 References

1. Auldridge ME, DR McCarty and HJ Klee (2006). *Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products*. Current Opinion in Plant Biology, 9(3), 315–321.
2. Bao-Cai T, SH Schwartz, JAD Zeevart and DR McCarty (1997). *Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize*. Proceedings of National Academy of Science, 94(22), 12235-12240.
3. Bittencourt C, MP Felicissimo, JJ Pireaux and LHoussiau (2005). *ToF-SIMS characterization of thermal modifications of bixin from Bixa orellana fruit*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(16), 16-19.
4. Bouvier F, O Dogbo and B Camara (2003a). *Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annato)*. Science, 300(5628), 2089-2091.
5. Bouvier F, C Suire, J Mutterer and B Camara (2003b). *Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in Crocus secondary metabolite biogenesis*. The Plant Cell(1), 15, 47-62.
6. Britton G (1995). UV/visible spectroscopy. In: *Carotenoids*, Vol. 1B, Britton G, S Liaaen-Jensen and H Pfander (eds). Birkhäuser Verlag, Basel Switzerland. pp. 13-62.
7. Castillo R, JA Fernandes and L Gomez-Gomez (2005). *Implications of carotenoid biosynthetic genes in apocarotenoid formation during the stigma development of Crocus sativus and its closer relatives*. Plant Physiology, 139(1), 674-689.
8. Chernys JT and JAD Zeevaart (2000). *Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado*. Plant Physiology, 124(1), 343-353.
9. Grotewold E (2006). *The genetics and biochemistry of floral pigments*. Annual Review of Plant Biology, 57(1), 761-780.
10. Iuchi S, M Kobayashi, T Taji, M Naramoto, M Seki, T Kato, S Tabata, Y Kakubari, K Yamaguchi-Shinozaki and K Shinozaki (2001). *Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid*

dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. The Plant Journal, 27(4), 325-333.

11. Matusova R, K Rani, FWA Verstappen, MCR Franssen, MH Beale and HJ Bouwmeester (2005). *The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic Striga and Orobanche spp. are derived from the carotenoid pathway.* Plant Physiology, 139(1), 920-934.
12. Mercadante AZ, A Steck and H Pfander (1997). *Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (Bixa orellana L.) seeds.* Phytochemistry, 46(8), 1379-1383.
13. Mercadante AZ, D Steck, Rodriguez-Amaya, H Pfander and G Britton (1996). *Isolation of Methyl 9'Z-Apo-6'-lycopenoate from Bixa orellana.* Phytochemistry, 41(4), 1201-1203.
14. Nambara E and A Marion-Poll (2003). *ABA action and interactions in seeds.* Trends in Plant Science, 8(5), 213-217.
15. Narváez-Zapata JA, MP Flores-Pérez, V Herrera-Valencia, F Castillo-González, R Ku-Cauich, B Canto-Canché, N Santana-Buzzy and R Rivera-Madrid (2001) *Development of molecular techniques for studying the metabolism of carotenoids in Bixa orellana L.* Scientia Horticulturae, 36(5), 982-986,
16. Prescott AG and P John (1996). *Dioxygenases: Molecular Structure and Role in Plant Metabolism.* Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 47(1), 245–71.
17. Rivera-Madrid R, RM Escobedo-Medrano, E Balam-Galera, M Vera-Ku and H Huges (2006). *Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (Bixa orellana L.)* Scientia Horticulturae, 109(2), 165–172.
18. Rodrigo MJ, B Alquezar and L Zacarías (2006). *Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (Citrus sinensis L. Osbeck).* Journal of Experimental Botany, 57(3), 633-643.

19. Rodriguez-Avila N, J Narvaez-Zapata, M Aguilar-Espinosa and R Rivera-Madrid (2009). *Full-length gene enrichment by using an optimized RNA isolation protocol in Bixa orellana recalcitrant tissues*. Molecular Biotechnology, 42(1), 84-90.
20. Schwartz SH, BC Tan, DA Gage, JAD Zeevaart and DR McCarty (1997). *Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of Maize*. Science, 276(5320), 1872-1874.
21. Simkin AJ, BA Underwood, M Auldridge, HM Loucas, K Shibuya, E Schmelz, DG Clark and HJ Klee (2004). *Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of beta-ionone, a fragrance volatile of petunia flowers*. Plant Physiology, 136(1), 3504-3514.
22. Tan BC, LM Joseph, WT Deng, L Liu, QB Li, K Cline and DR McCarty (2003). *Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family*. Plant Journal, 35(1), 44-56.
23. Wahlberg I and AM Eklund (1998). In *Carotenoids*, Vol. 3, Britton G, S Liaaen-Jensen, and H Pfander (eds). Birkhäuser Verlag, Basel Switzerland. pp. 195-216.
24. Wellburn AR (1994). *The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution*. Journal of Plant Physiology, 144(3), 307-313.

Conclusiones Generales

Se realizaron una serie de modificaciones al protocolo diseñado para el aislamiento de RNA total con el sistema "Pure-Link" Micro-to-Midi (Invitrogen), obteniéndose un nuevo protocolo de extracción optimizado que resultó adecuado para el aislamiento de RNA total a partir de los tejidos de flor y frutos de dos variantes de *B. orellana* L..

Se analizó por RT-PCR la expresión de cinco genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides (*DXS*, *PSY*, *PDS*, β -*LCY* y ϵ -*LCY*) en dos variantes de *B. orellana* L. En general, la expresión de la mayoría de dichos genes pudo asociarse con la acumulación de pigmentos. Así, en la "variante rosa" que tiene mayores contenidos de carotenoides, se observaron mayores niveles de transcritos. Asimismo, se observó una notable diferencia en los niveles de expresión de dichos genes entre ambas variantes, específicamente en los tejidos en donde se acumula más bixina.

Específicamente, el gen de la *DXS* se mostró activo durante todas etapas del desarrollo de la planta. Por su parte, la expresión del gen *PSY* coincidió con el inicio de la acumulación de carotenoides en las semillas inmaduras.

Por otro lado, el gen de la fitoeno desaturasa (*PDS*), mostró una mayor acumulación de mensajeros en la variante con mayor concentración de pigmentos y en una expresión sincronizada con el incremento en la acumulación de bixina en ambas variantes. Asimismo, este hecho correlaciona con la baja acumulación de licopeno, sugiriendo una rápida conversión de este carotenoide en otros carotenos y un probable papel regulatorio de esta enzima en la síntesis de carotenoides y bixina en *B. orellana* L.

Por lo que respecta a la expresión de β -*LCY* y ϵ -*LCY*, se encontraron diferencias entre ambas variantes. La expresión de ϵ -*LCY* se relacionó con la presencia de pigmentos fotosintéticos en las hojas de ambas variantes, así como en los frutos verdes de la "variante blanca". Por su parte, la expresión del gen β -*LCY* fue mayor en los tejidos de la "variante rosa", a excepción de las semillas maduras, en donde se detectó una mayor acumulación tanto de carotenoides como de bixina. Con base en estas observaciones, es posible hipotetizar que la "variante rosa" transforme más de sus C_{40} carotenoides en β -carotenoides y bixina, mientras que la "variante blanca" lo haga a pigmentos relacionados con la fotosíntesis.

En resumen, la mayoría de los genes relacionados con el proceso de carotenogénesis inducen su expresión durante la formación de las semillas de la “variante rosa”. Por el contrario, la “variante blanca” acumula una menor concentración de pigmentos en la mayoría de sus tejidos, debido a una expresión más baja de los genes implicados en su biosíntesis.

No fue posible obtener sondas moleculares para los genes que codifican a las enzimas *BoBADH* y *BonBMT*, de *B. orellana* L. Por lo tanto, para estos fines es necesaria la realización de nuevos experimentos. De forma contraria, se logró el aislamiento de un fragmento de 540 pb cuya secuencia corresponde al de una CCD de *Bixa orellana* L. el cual fue nominado *BoCCD2*.

BoCCD2 posee una mayor similitud con genes que codifican dioxigenasas de otras especies que con dioxigenasas de *B. orellana*. Dichas diferencias también se observan a nivel evolutivo. Sólo *BoCCD* parece compartir un mismo ancestro con *BoCC2*, la dioxigenasa aislada en este trabajo. Por lo tanto, es posible inferir que la carotenoide dioxigenasa aislada sea un nuevo miembro de la familia de dioxigenasas de *Bixa orellana* L.

La secuencia de *BoCC2* contiene el dominio RPE65, típico de dioxigenasas vegetales que están involucradas en el rompimiento oxidativo de la neoxantina, como es el caso de la enzima codificada por el gen NC1 de *Arabidopsis thaliana*.

Al analizar el perfil de expresión de *BoCC2*, se observó que la acumulación de mensajeros guarda una correlación directa con la acumulación de bixina y de pigmentos tanto en los tejidos, como a través del desarrollo de las semillas inmaduras de *B. orellana* L.

La expresión del gen *BoCCD2* en tejidos fotosintéticos y vegetativos de *B. orellana* L., complementados con la cuantificación paralela de pigmentos por HPLC confirmó que la producción de pigmentos, tanto de tipo carotenoide como apocarotenoide, no es específica de las semillas observándose la presencia de bixina en células epidérmicas de tallo, raíces y hojas.

Mediante experimentos de RT-PCR *in situ* sobre secciones de semillas inmaduras, se pudo correlacionar la expresión de *BoCCD2* con la producción de bixina, ya que únicamente se detectó la presencia de transcritos de *BoCCD2* en el arilo de la semilla. Esto permite sugerir que la maquinaria de síntesis de bixina está localizada en este tejido.

La presencia de transcritos de *BoCCD2* también fue confirmada por RT-PCR *in situ* sobre secciones de tallos, donde su expresión fue localizada alrededor del xilema y floema. Con esta observación, es posible hipotetizar que la síntesis de apocarotenoides, tales como ABA y bixina, se realiza en los tejidos vasculares de la planta para ser transportados hacia las células que conforman la epidermis de los tallos, donde se localiza la mayor acumulación de pigmentos.

Para la confirmación de los sitios de síntesis de la bixina, es necesario realizar nuevos experimentos como el análisis de la actividad de las enzimas involucradas en la ruta de síntesis. Mas aún, estos experimentos ayudarán a definir el papel de esta y otras dioxigenasa en el metabolismo de los carotenoides de *B. orellana* L.

...the ... of ...
...the ... of ...
...the ... of ...
...the ... of ...
...the ... of ...

...the ... of ...
...the ... of ...
...the ... of ...
...the ... of ...
...the ... of ...

Perspectivas

Los datos generados en este proyecto pueden ser utilizados como la base para la implementación de un programa de mejoramiento genético dirigido a incrementar el contenido de bixina, a través de la selección de genes que podrían utilizarse como marcadores moleculares de genotipos de *B. orellana* L. con altos niveles de este pigmento y/o la identificación de alelos relacionados con la producción de pigmentos.

Asimismo, los resultados derivados de este trabajo de investigación constituyen un avance en el entendimiento de las bases moleculares que gobiernan la síntesis de bixina en *B. orellana* L. La continuación de este trabajo deberá enfocarse a obtener la secuencia completa del gen *BoCCD2*, así como de los dos reportados para la síntesis de bixina a partir de licopeno. En este sentido, será de gran importancia el establecer nuevas estrategias que permitan el aislamiento de los genes *BoBADH* y *BonBMT*, así como el que codifica a la dioxigenasa ya caracterizada como responsable de la síntesis de la bixina (*BoLCD*). Resulta de especial interés el aislamiento de los extremos 5' y 3' de *BoCCD2* así como la realización de nuevos estudios, tales como la purificación de la proteína recombinante y la transformación genética de plantas con este gen, de forma tal que su papel en el metabolismo de los carotenoides pueda ser abordado con otras estrategias. Finalmente, el análisis de genes homólogos a *BoCCD2* y la detección de su polimorfismo entre otras variantes de *B. orellana* L., contrastantes en cuanto a su acumulación de bixina, pudiera ser una estrategia a implementar a corto plazo, para profundizar en el conocimiento que se tiene de esta importante familia de genes presente en el genoma de *B. orellana* L.

Phylogenetics

Phylogenetics is the study of the evolutionary relationships between organisms. It is a branch of biology that uses molecular data to determine the evolutionary history of a group of organisms. The most common method used in phylogenetics is the analysis of DNA sequences. By comparing the DNA sequences of different organisms, scientists can determine how they are related to each other and how they have evolved over time. Phylogenetics is used in a wide range of fields, including systematics, conservation biology, and medicine.

Phylogenetics is the study of the evolutionary relationships between organisms. It is a branch of biology that uses molecular data to determine the evolutionary history of a group of organisms. The most common method used in phylogenetics is the analysis of DNA sequences. By comparing the DNA sequences of different organisms, scientists can determine how they are related to each other and how they have evolved over time. Phylogenetics is used in a wide range of fields, including systematics, conservation biology, and medicine.

Full-Length Gene Enrichment by Using an Optimized RNA Isolation Protocol in *Bixa orellana* Recalcitrant Tissues

N. L. Rodríguez-Ávila · J. A. Narváez-Zapata ·
M. L. Aguilar-Espinosa · R. Rivera-Madriz

© Humana Press 2008

Abstract A reliable protocol is described for isolation of large full-length cDNA from *Bixa orellana* mature tissues containing large quantities of pigments, phenols, and polysaccharides. This protocol involves the optimization of a commercial RNA extraction protocol in combination with a long distance reverse transcript PCR protocol. The principal advantages of this protocol are its high RNA yield and quality. The resulting RNA is suitable for RNA expression evaluation and production of large, full-length cDNA. This is the first time RNA has been isolated from all mature tissues in the tropical perennial plant *B. orellana* and has been proved viable for downstream applications, especially important for molecular biology studies on this economically important pigment-producing plant.

Keywords *Bixa orellana* L. · Bixin · Carotenoids · RNA extraction · LD-RT-PCR

Introduction

Bixa orellana L. is one of the most important carotenoid-producing species worldwide and is the sole source of the apocarotenoid bixin, a commercially and culturally important pigment present on the external surface of its

seeds [1]. Study of gene expression during seed development and bixin accumulation will aid in understanding the physiological mechanism responsible for bixin accumulation in this plant.

A disadvantage of *B. orellana* plant tissues is that they contain high amounts of polyphenols, pigments, and gummy polysaccharides, which complicate RNA purification [2] and consequently make molecular biology studies of this plant difficult. RNA isolation protocols reported for recalcitrant plant tissues [3–5] have failed when directly applied to *B. orellana* tissues. In response, two protocols were developed to isolate total RNA in *B. orellana*. These have been successful for in vitro culture tissues, leaves and seeds [2, 6], but have failed in the recovery of total RNA from other tissues from the adult plant such as flowers, floral buds, and fruit capsules. This has limited genetic research in *B. orellana* to mature seeds [7] or heterologous systems [8], preventing suitable integration of these data into the in vivo system.

In an effort to overcome this problem, we present here a method for RNA extraction from different recalcitrant tissues from adult plants of *B. orellana* L. After several unsuccessful attempts to extract high-quality RNA, we decided to use the PureLink™ Micro-to-Midi™ Total RNA Purification System (Invitrogen, USA) because it was designed for difficult plant tissues. However, to obtain enough RNA to successfully carry out the reverse transcription reaction, modifications were made to the commercial protocol: RNA stabilizing agents were used with an additional organic washing step. The long distance reverse transcription (LD-RT-PCR) protocol was then run using SMART oligonucleotides (Clontech, USA) to increase the quantity and size of recovered cDNA. The LD-PCR method has been shown to be useful in synthesizing full-length cDNA from the upper 1 kb, particularly in

N. L. Rodríguez-Ávila · M. L. Aguilar-Espinosa ·
R. Rivera-Madriz (✉)
Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130,
Cpl. Chuburná de Bédigo, 97200 Mérida, Yucatán, México
e-mail: rrmadriz@ciicy.mx

J. A. Narváez-Zapata
Centro de Biotecnología Científica del Instituto Politécnico
Nacional, Blvd. del Maestro s/n, Cpl. Narco Mendoza,
88710 Rayón, Tuxtla Gutiérrez, México

Published online: 26 December 2008

Humana Press

limited RNA samples [9, 10]. However, in order to verify that the RNA isolated from our optimized method was intact and of high quality, an RNA gel blot analysis using the strongly conserved gene actin was performed and gave successful results in all tissues. Therefore, the protocol reported here results in the synthesis of large full-length cDNA in all development tissues, including floral buds, flowers, and fruit capsules; the most recalcitrant tissues in *B. orellana*. The RNA obtained here was successfully analyzed in further molecular applications.

Materials and Methods

Plant Material

Leaves, floral buds, flowers, immature fruit, and immature and mature seeds from adult *B. orellana* L. plants were harvested from commercially grown plants (La Extra, Plantation, Chicxulub, Yucatan, Mexico). Fresh collected tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

Determination of Polyphenols

Polyphenols are described as secondary metabolites which when cells are disrupted can come into contact with nuclei forming polysaccharide/polyphenol complexes that frequently co-precipitate with RNA. *Bixa orellana* has been described as a plant with high contents of these metabolites which made the RNA isolation and their use in downstream applications difficult [2, 6]. However, contents of polyphenols in *B. orellana* tissues have not been reported. In accordance with this, the determination of polyphenols was conducted using the optimized colorimetric method based on the Folin-Ciocalteu reagent that interacts with phenolic substances yielding a blue color, as described by Georgé et al., [11]. Polyphenols were extracted twice from 0.1 g of the different powdered freezing-dried tissues with 2.5 ml of methanol/water solution (70/30, v/v) and then sonicated for 15 min and centrifuged at $3,000\times g$ for 15 min, transferring the supernatant to a new tube. Extracts were water diluted 10-fold before colorimetric reaction; 2.5 ml of water diluted Folin-Ciocalteu reagent (1/10) were added to the different extracts, incubated for 2 min at room temperature, and 2 ml of sodium carbonate (75 g l^{-1}) were added. The mixture was incubated for 15 min at 50°C and finally cooled in a ice water bath. The specific absorbance at A_{760} was immediately measured. A blank was prepared by substituting distilled water for the phenol solution. The amount of polyphenols was determined by reference to a standard curve previously constructed with phenol reagent dilutions at concentrations ranging from 0 to 10 mg/l.

Determination of Polysaccharides

Sugar concentrations were evaluated in the different tissues analyzed as indicators of the amount of polysaccharide contaminants that should be removed during RNA extraction. Thus, a colorimetric test based on the phenol-sulfuric acid reaction as described by Dubois et al., [12] was performed. Total carbohydrates were extracted with 1 ml of TE buffer from 0.1 g of the different powdered freezing-dried tissues. To each extract 0.5 ml of 5% phenol solution in water (w/v) were added followed by 2.5 ml of concentrated sulfuric acid. Each mixture was vortexed for 1 min and left without shaking for 15 min. Then, sugar contents were determined by the dilution of an aliquot of 30 μl in 2,950 μl of water and by measuring the absorbance at A_{490} . A blank was prepared by substituting distilled water for the sugar solution. The total concentration of sugars was determined by reference to a standard curve previously constructed with glucoses at concentrations ranging from 0 to 80 mg/l.

Determination of Carotenoids

Total carotenoids, the most abundant metabolites in *B. orellana*, were evaluated as possible indicators of the presence of RNA co-extracted contaminants [1]. Following the method of Wellburn [13], carotenoids were extracted from the different powdered tissues (0.01 g for mature seeds and other tissues) by mixing them with 5 ml chloroform in semi-darkness. Each mixture was shaken vigorously for 5 min, filtered through 0.45 μm nylon membrane, and transferred to a 15 ml tube, always in semi-darkness and in an ice water bath. To quantify bixin and total carotenoids, 100 μl of each extract was adjusted to 3 ml of chloroform and then measured with a spectrophotometer (resolution ranged from 1–4 nm to 400–700 nm) (DU 650 Beckman Coulter) [14]. Total carotenoid extracts were measured at A_{404} to A_{480} nm, and chlorophylls a and b at A_{640} and A_{664} nm, respectively; total carotenoid content was then calculated using the equation reported by Wellburn [13]. Results are the mean of three replicates; each measured three times \pm standard error.

RNA Extraction Procedure: Modified from PureLink Micro-to-Midi Kit Protocol

Fifty milligrams of nitrogen-powdered sample mixture were poured into a 2 ml tube containing 875 μl of RNA lysis solution (PureLink Micro-to-Midi, Invitrogen, USA), 125 μl of Plant RNA Isolation AidTM reagent (Ambion, Austin, TX), and 10 μl of β -mercaptoethanol. The tubes were vortexed for 10 s, left at room temperature for 5 min, resuspended again in 0.5 volumes of chloroform:isoamyl

alcohol (24:1, v/v), and vortexed for 15 s. They were then centrifuged for 15 min at 12,000×g and 4°C, and the supernatant carefully transferred to a homogenizer cartridge (18080-051, Invitrogen, USA) to remove residual contaminants. The homogenized solution was transferred to a new 1.5 ml tube and 0.5 V absolute ethanol added under gentle agitation. After homogenization, 750 µl of the solution were transferred to RNA Spin Cartridges to continue following the standard PureLink Micro-to-Midi protocol. The isolated total RNA was treated with DNase I (Invitrogen, USA) and stored at -80°C in 10 µl aliquots until use.

RNA-Extraction Protocol Efficiency

Purity and concentration of the isolated RNA were assayed using spectrophotometry at A₂₆₀ and A₂₈₀ nm. Samples were diluted (1:50) in DEPC-treated water. RNA integrity was confirmed with a 5 µl aliquot of total RNA in EtBr-stained formaldehyde agarose gels (1.8%) after DNase I treatment.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

To test RNA quality, 50 ng of total RNA isolated from mature leaves, floral buds, flowers, fruit capsules, immature seeds, and mature seeds were reverse transcribed with Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen, USA) following the manufacturer's instructions and using forward (5'-CGGCTACGACATCCAAGGAA3') and reverse (5'-GCTGGAATTACCGCGGCT3') specific primers for constitutive 18S ribosomal (AF206968) expression. PCR conditions were 95°C for 3 min, followed by 25 cycles of denaturing at 95°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. The 35th cycle was followed by a final extension step at 72°C for 10 min. The PCR products were electrophoretically separated in EtBr-stained agarose gels (1.2%).

Long Distance Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (LD-RT-PCR)

First-strand cDNA was synthesized from 200 ng of total RNA using SuperscriptTM III reverse transcriptase (Invitrogen, USA) in a 10 µl reaction. A forward SMART primer (5'-AAGCACTGGTATCAACGACAGTGGCCATTACGCCTGG-3') and reverse SMART primer (5'-ATTCTA GAGGCGAGGGCGGCGCATG-d(T)₁₀-3') (BD Biosciences Clontech, USA) were used for full-size cDNA syntheses. The PCR conditions, adjusted for full-length and long size amplification, were 95°C for 5 min, followed by 10 cycles of denaturing at 95°C for 1 min and annealing at 68°C for 6 min. The 10th cycle was followed by a final

extension step at 72°C for 10 min. The resulting cDNA was re-amplified in a second LD-PCR round of 35 cycles (95°C for 30 s, 68°C for 6 min) followed by a final extension step at 72°C for 10 min. The PCR products were analyzed in 1% agarose gels.

Double Strand cDNA Detection

First-strand cDNA was synthesized from 200 ng of total RNA as described above and using SMART primers (BD Biosciences Clontech, USA) in a 25 µl reaction. Then, 2 µl of the single strand (ss) cDNA served as a template for LD-PCR based second strand synthesis, and was prepared as a probe by the incorporation of digoxigenin nucleotide DIG-dUTP (Roche, USA) and using 35 thermal cycles. Twenty microliters of ss cDNA were electrophoresed in 1% agarose gels stained with ethidium bromide, depurinated with a 0.2 N of HCl solution, and transferred with 2× SSC buffer (3 M sodium chloride with 0.3 M sodium citrate, pH 7) to a nylon membrane (Hybond N+, Amersham Biosciences; Piscataway NJ) positively charged overnight. Prehybridization and hybridization were performed at 42°C in a hybridization oven for 30 min and 24 h, respectively, using the DIG Easy Hyb solution (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Post-hybridization washing steps were conducted, with two steps with 2× SSC and 0.1% SDS at room temperature for 5 min and two steps at 65°C for 15 min with prewarmed 0.5× SSC and 0.1% SDS. Blocking and detection was performed with DIG Wash and Block Buffer set, Anti-DIG-alkaline phosphatase antibody and Ready-to-use CSPD (Roche Molecular Biochemicals, USA) according to the manufacturer's instructions.

RNA Gel Blot Analysis

Samples containing 5 µg of total RNA diluted in water were heated at 65°C for 15 min and then separated by electrophoresis in a 1.5% agarose gel containing 15% of formaldehyde and stained with ethidium bromide. The RNA samples were then transferred overnight by capillarity with a 20× SSC buffer to a positively charged nylon membrane (Hybond N+, Amersham Biosciences; Piscataway, NJ). The blot was prehybridized and probed at 48°C overnight in a commercial hybridization solution (DIG Easy Hyb solution; Roche Applied Science, Indianapolis IN) with a conserved actin DNA probe (EP672732) labeled with digoxigenin using the PCR DIG Probe Synthesis kit (Roche Applied Science) and following the manufacturer's instructions. Two low-stringency washes were realized at room temperature for 5 min with 2× SSC, 0.1% SDS, and twice with 0.1× SSC, 0.1% SDS for 15 min at 60°C. Blocking and detection was performed with DIG Wash and Block Buffer set, Anti-DIG-alkaline phosphatase antibody,

and Kossly-to-use CSPD (Roche Molecular Biochemicals, USA) according to the manufacturer's instructions.

Results and Discussion

Several standard RNA isolation protocols have been reported in recalcitrant plant tissues [2-4, 6, 15, 16]. These tissues exhibited high contents of polyphenols, polysaccharides, pigments, and other unidentified compounds that interfere with RNA extraction and complicate later applications. One of the principal secondary metabolites in *B. orellana* are pigments; for example, in immature and mature seeds pigments represent up to 7% of fresh weight. Other tissues also accumulate high amounts of pigments (Table 1). Pigments are considered contaminants that might co-precipitate during the extraction of nucleic acids when present in high concentrations in the sample. Similar pigment contamination has also been described during the establishment of an RNA extraction protocol in marigold flower tissues [17]. Recalcitrant RNA isolation condition was also analyzed by determining the amount of polyphenols and polysaccharides in different adult plant tissues (Table 1). Our results indicated that the tissues of mature leaves and floral buds were the most resistant to analysis because they contain high levels of pigment, gummy polysaccharides, and polyphenols. Floral buds and flowers have the highest levels of polyphenols, probably due to the accumulation of anthocyanins in these kinds of tissues [18]. Polyphenols are contaminants that interfere with initial homogenization as well as subsequent RNA purification steps such as precipitation and filtration [19, 20]. Some RNA may be recovered using these methods, but the resulting highly viscous RNA-polysaccharide complex makes it unsuitable for further analyses. This is why we tested RNA extraction protocols first on floral bud tissues and then confirmed the results in tissues from other developmental stages (Fig. 1). The recalcitrant condition of these tissues was also confirmed experimentally by using two RNA isolation protocols previously reported in the seeds and leaves of *B. orellana* [2, 6]. Our results indicated that these plant tissues have lower contents of secondary

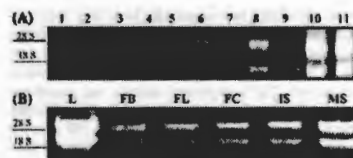


Fig. 1 Total RNA isolated obtained by modified the Pure-Link Micro-to-Midi protocol. a Ethidium bromide-stained 1.2% agarose formaldehyde gel of total RNA isolated from floral buds by different extraction procedures: Lanes 1-8 correspond to modifications described in Table 2, lane 9 = unmodified Pure-Link Micro-to-Midi protocol in floral bud tissue (negative control), lane 10 = proposed modified Pure-Link Micro-to-Midi protocol in mature seed tissue (positive control), lane 11 = unmodified Pure-Link Micro-to-Midi protocol in mature seed tissue (positive control). b Ethidium bromide-stained 1.2% agarose formaldehyde gel of total RNA isolated from *Bixa orellana* tissues using proposed protocol. L = leaves, FB = Floral buds, F = flowers, FC = fruit capsules, IS = immature seeds, MS = mature seeds

metabolites (Table 1). These *B. orellana* protocols are based on hot phenol and MATAB solution and do not include other important plant developmental tissues. When these protocols were applied to floral bud tissues, it was not possible to recover high yield and/or good quality RNA. We found the same to be true when using other standard RNA extraction protocols based on guanidinium thiocyanate, tri- borate, or phenol [3, 4, 15] (Table 2). Extraction of RNA from *B. orellana* consequently poses a technical challenge and can prevent later genetic analysis if performed inadequately. Only mature seed tissue produces a consistent, reliable RNA yield when using the reported protocols [6]. This could be explained by the minor amounts of polysaccharides shown when it is compared with other tissues; low contents of polysaccharides could be a result of the water deficit that is accelerated in seed development with the consequent reduction in sugar metabolism [21].

We selected a silica-based commercial kit (PureLink Micro-to-Midi, Invitrogen, USA) to try to overcome problems associated with different contaminants. This method is based on RNA affinity to a silica-based membrane included in the kit. As in the methods described

Table 1. Final total RNA recovered and contents of secondary metabolites from recalcitrant *B. orellana* L. plant tissues

Tissues	Polyphenols (µg/g DW)	Polysaccharides (mg/g DW)	Total chromoids (mg/g DW)	Total RNA (µg/g FW)	A_{260}/A_{280}
Mature leaves	17.35	52.27	133.16	800 ± 400	2.05
Floral buds	17.19	49.87	283.50	400 ± 120	1.89
Flowers	21.80	8.53	422.86	160 ± 80	2.08
Fruit capsules	13.71	46.67	48.92	400 ± 75	1.95
Immature seeds	8.95	59.73	83.40	760 ± 126	2.07
Mature seeds	2.00	26.13	664.70	500 ± 400	2.70

Table 2 RNA extraction protocols evaluated on *R. oviforme* floral buds

Protocol	Description	Result
MATAB solution ^a	Unmodified	Not obtained
Oxidation thiocyanate ^b	Unmodified	Not obtained
Hot-phenol ^c	Unmodified	Not obtained
Tri-boost ^d	Unmodified	Not obtained
Pure-Link Micro-to-Midi	Unmodified	Not obtained
Modifications applied^e		
Addition of RNA stabilizers in lysis buffer	Addition of 10 μ l β -mercaptoethanol	Lane 1 ^f
	Addition of 10% PVPP plus 30 μ l RNA Isolation Aid	Lane 2
	Addition of 10 μ l β -mercaptoethanol plus 250 μ l RNA Isolation Aid	Lane 3
	Addition of 10 μ l β -mercaptoethanol plus 125 μ l RNA Isolation Aid	Lane 4
Clearing of contaminants in homogenization buffer	Partition on 0.5 V phenol:chloroform:isoamyl alcohol (5:1:1, v:v:v)	Lane 5
	Partition on 1 V phenol:chloroform:isoamyl alcohol (8:1:1, v:v:v)	Lane 6
	Partition on 0.5 V chloroform:isoamyl alcohol (24:1, v:v)	Lane 7
	Partition on 0.5 V phenol:chloroform:isoamyl alcohol (94:4:2, v:v:v)	Lane 8

^a A_{260}/A_{280} Ratios (3, 4, 6, 13)

^b In this study on Pure-Link Micro-to-Midi protocol

^c See Figs. 1 and 3

above, the PureLink Micro-to-Midi method functioned reliably in mature seed tissues (Fig. 1), but failed to isolate total RNA from other developmental tissues. In an attempt to improve RNA recovery in the other tissues, we modified the initial homogenization process by adding RNA stabilizer agents associated with buffer lysis and a washing step using organic solvents. The reagents assayed at different concentrations were PVPP, β -mercaptoethanol, and the commercial reagents RNA Isolation AidTM (Ambion, Austin, TX). The organic solvents tested were combinations of phenol, chloroform, and isoamyl alcohol (Table 2). Use of these RNA stabilizer reagents and organic solvents has been widely reported in the initial extraction step of many protocols optimized for recalcitrant tissues [3, 4, 15, 16, 19, 20]. Results of the different treatments are shown in Fig. 1. Optimum results were produced with β -mercaptoethanol plus RNA Isolation AidTM (Ambion, Austin, TX), and a chloroform:isoamyl alcohol solution (Fig. 1a). The reagents used and the final concentrations are described above in Methods. Once method efficiency was confirmed with floral bud tissue, it was tested using other developmental tissues (Fig. 1b). RNA yield ranged from 160 to 800 μ g/g fresh sample, depending on tissue, with A_{260}/A_{280} ratios ranging from 1.8 to 2.0, indicating the purity of the recovered RNA. In comparison to RNA yields reported in mature seeds [6], the yields produced here were suitable (Table 1) for further experiments where higher amounts of total RNA were needed. Positive RNA extraction results using this optimized protocol even for more recalcitrant tissues suggested their potential use in other plants with similar characteristics.

RNA quality was successfully evaluated, as has been widely reported, using a conventional RT-PCR protocol [6, 22-24] with a constitutive 18S ribosomal gene (Fig. 2). The amplification of a 200 bp PCR-product obtained with this technique demonstrated that total RNA isolated from the different tissues was efficiently reverse-transcribed into cDNA with the consequent 18S gene amplification, indicating high quality and integrity of the RNA isolated.

In order to test the full size of total RNAs isolated by the different modifications assayed, these were long distance-reverse transcribed with a combination of SuperScriptTM III reverse transcriptase (Invitrogen, USA) and SMART primers (BD Biosciences Clontech, USA) (Fig. 3). Use of these reagents has been reported to result in large cDNA sequences [9, 10]. In the different treatments, LD-RT-PCR produced PCR products longer than 2 Kb. The best results were produced with the protocol summarized above in Methods, although all treatments resulted in some class of amplification, albeit with less abundant RNA templates

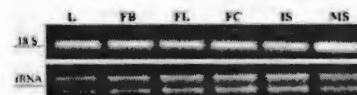


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified 200 bp 18S fragment from the cDNA synthesized for different *Rosa oviforme* plant tissues. Upper gel = RT-PCR, lower gel = total RNA. L = mature leaves, FB = floral buds, FL = flowers, FC = fruit capsule, IS = immature seeds, MS = mature seeds



Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of large, full-length cDNA obtained by LD-RT-PCR in recovered total RNA. Lane 1 = 1,000 bp ladder, lanes 2-8 = LD-RT-PCR from total RNA isolated from floral buds according to modifications to the Pico-Link Micro-to-Midi protocol, described in Table 2

a strong signal near to 1,400 pb in all the tissues of study. The large size of this gene is similar to other orthologues of actin genes reported in plants [25, 26]. Moreover, the size of this gene points to the presence of full-length genes in all plant development tissues analyzed.

In summary, the optimized commercial kit protocol described here, in combination with the LD-RT-PCR protocol, resulted in the recovery of large cDNA suitable for downstream applications even in RNA-limited conditions such as recalcitrant *B. orellana* tissues.

Acknowledgments This research was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) through projects 4654; IFS IV202-2 and UC-México. NLRA was supported by a post graduate scholarship from the CONACYT (Grant No. 196432).

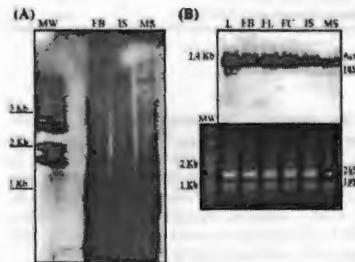


Fig. 4 Full-length gene analysis. a Single strand cDNA synthesized from 100 ng of total RNA isolated from floral buds, immature seeds, and mature seeds with modified method and probed with its corresponding double strand cDNA labeled with digoxigenin. b RNA gel blot analysis of the actin gene using the total RNA isolated from different *Bixa orellana* plant tissues. Upper gel = RNA gel blot analysis, lower gel = Ethidium bromide-stained 1.5% agarose formaldehyde gel of total RNA isolated. L = mature leaves, FB = floral buds, FL = flowers, FC = fruit capsules, IS = immature seeds, MS = mature seeds. MW = 0.5 kb RNA Ladder

(Fig. 1a). Similar full cDNA amplifications have been reported in the presence of limited amounts of RNA [9].

To confirm the size of ss cDNA obtained using the strategies described in this study, they were electrophoresed in 1% agarose gel and transferred and fixed in a nylon membrane to be probed with ds cDNA labeled with digoxigenin by LD-RT-PCR. Large cDNA fragments were detected (Fig. 4a). The use of SMART primers on optimized RNA samples has been successful in obtaining large full-length clones useful for molecular applications [19].

The total RNA isolated in this study was also reliable for the analysis of the expression of a conserved actin probe (Fig. 4b). RNA gel blot analysis made it possible to detect

References

1. Galliano, G., Rossi, C., & Brunley, P. M. (2003). To dye or not to dye: Biochemistry of anatto unveiled. *Trends in Biotechnology*, 21, 513-516. doi:10.1016/j.tibtech.2003.10.001.
2. Narváez, J. A., Flores-Pérez, P., Herrera-Valencia, V., Castillo, F., Ka-Caich, R., Canto-Cancha, B. B., et al. (2001). Development of molecular techniques for studying the metabolism of carotenoids in *Bixa orellana* L. *HortScience*, 36, 982-986.
3. De Vries, S., Hoge, H., & Bisseling, T. (1988). Isolation of total and polyoma RNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual*, 85, 1-13.
4. López-Gómez, R., & Gómez-Lim, M. A. (1992). A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *HortScience*, 27, 440-442.
5. Gesteira, A. S., Mitchell, F., Ferreira, C. F., & Cascardo, J. C. M. (2003). Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis perniciosa*. *BioTechniques*, 35, 494-500.
6. Rodríguez, S. M., Soares, V. L., Oliveira, T. M., Gesteira, A. S., Otonari, W. C., & Costa, M. O. (2007). Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols, polysaccharides and pigments of anatto (*Bixa orellana* L.). *Molecular Biotechnology*, 37, 220-224. doi:10.1007/s12033-007-0070-9.
7. Jäko, C., Couss, C., Ingerberg, R., Root, D. W., Pelcher, L. E., & Corvalán, P. S. (2002). Probing carotenoid synthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. *Plant Science*, 163, 141-145. doi:10.1016/S0168-9452(02)00083-5.
8. Bourvier, F., Doglio, O., & Camara, B. (2005). Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (anatto). *Science*, 300, 2049-2051. doi:10.1126/science.1085162.
9. Bao-xing, F., Jing-fen, S., Hao, L., Sheng-qi, W., Ping-xun, Z., & De-chang, W. (2002). LD-RT-PCR: A new method for labelling anco cDNA microarray probe. *Chinese Journal of Cancer Research* 14, 179-182. doi:10.1007/s11670-002-0040-5.
10. Wellenreuther, R., Schupp, I., The German cDNA Consortium, Pustka, A., & Wiemann, S. (2004). SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones. *BMC Genomics* 5, 36. doi:10.1186/1471-2164-5-36.
11. Georgy, S., Bru, P., Alms, P., & Amlot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1370-1373. doi:10.1021/jf048396h.

12. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, *28*, 350-356. doi:10.1021/ac60111a017.
13. Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, *144*, 307-313.
14. McKeown, G., & Mack, E. (1962). Paper chromatography of bixin and related compounds. *Journal of AOAC*, *45*, 761-766.
15. Chmieczyński, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*, 156-159. doi:10.1016/0003-2697(87)90021-2.
16. Zeng, Y., & Yang, T. (2002). RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*, *20*, 417a-417b. doi:10.1007/BF02772130.
17. Chi-Mazzareno, B., Robert, M. L., & Rivera-Madrid, R. (2000). Extraction of total RNA from a high pigment content plant: Marigold (*Tagetes erecta*). *Molecular Biotechnology*, *16*, 17-21. doi:10.1385/MB:16:1:17.
18. Wang, C., & Vodkin, L. (1994). Extraction of RNA from tissues containing high levels of procyanidins that bind RNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, *12*, 132-145. doi:10.1007/BF02668374.
19. Jaskolski, L., Pivalla, A. M., Halonen, M., & Holton, A. (2001). Isolation of high quality RNA from Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. *Molecular Biotechnology*, *19*, 201-203. doi:10.1385/MB:19:2:201.
20. Hu, C. G., Honda, C., Kita, M., Zhang, Z., Terada, Y., & Muraguchi, T. (2002). A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenolic compounds. *Plant Molecular Biology Reporter*, *20*, 69a-69g. doi:10.1007/BF02801935.
21. Pinheiro, C., Rodrigues, A. P., Saraiva de Carvalho, I., Chaves, M. M., & Cândido Pinto, R. (2005). Sugar metabolism in developing lupin seeds is affected by a short-term water deficit. *Journal of Experimental Botany*, *56*, 2705-2712. doi:10.1093/jxb/era263.
22. Sharma, A. D., Gill, P. K., & Singh, P. (2003). RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides. *Analytical Biochemistry*, *314*, 319-321. doi:10.1016/S0003-2697(03)00689-9.
23. Alzarez, J., Miralles, S., Rincón, L., & Brito, F. (2006). Urea as the only inactivator of RNase for extraction of total RNA from plant and animal tissues. *Analytical Biochemistry*, *358*, 143-145. doi:10.1016/j.ab.2006.03.040.
24. Phongsaisay, V., Perera, V. N., & Fry, B. N. (2007). Evaluation of eight RNA isolation methods for transcriptional analysis in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Microbiological Methods*, *68*, 427-429. doi:10.1016/j.jm.2006.09.002.
25. McElroy, D., Rothenberg, M., & Wu, R. (1990). Structural characterization of a rice actin gene. *Plant Molecular Biology*, *14*, 163-171. doi:10.1007/BF00018557.
26. McDowell, J. M., An, Y., Huang, S., McKinney, E. C., & Mansberger, R. B. (1990). The Arabidopsis ACT7/Actin gene is expressed in rapidly developing tissues and responds to several external stimuli. *Plant Physiology*, *111*, 699-711. doi:10.1104/pp.111.3.699.

