



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

**USO DE GENES INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS
DE CAROTENOIDES COMO MARCADORES
MOLECULARES DE PIGMENTOS EN ACHIOTE
(*Bixa orellana* L.)**

Tesis que presenta

ESTER MARTÍN RODRÍGUEZ

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Opción Bioquímica y Biología Molecular**

**Mérida, Yucatán, México
Noviembre 2010**





RECONOCIMIENTO



Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "**USO DE GENES INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE CAROTENOIDES COMO MARCADORES MOLECULARES DE PIGMENTOS EN ACHIOTE (*Bixa orellana* L.)**" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de **Bioquímica y Biología Molecular de Plantas** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la **Dra. Renata Rivera Madrid** Dentro de la Opción Bioquímica y Biología Molecular de Plantas perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Para los efectos que sean necesarios



Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela
Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Declaración de Propiedad

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.



Ester Martín Rodríguez.

AGRADECIMIENTOS

Profesores Investigadores

Dra. Renata Rivera Madrid.

Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano.

Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz.

Dra. Luisa Alhucema López Ochoa.

Dr. Jorge Santamaría Fernández.

Compañeros y amigos

M.C. María Geovana León Pech

Dra. Rubí Alejandra Valdez Ojeda

Dra. Eunice Gómez

Técnicos

Don Julian Cohello

M. C. Margarita Aguilar Espinoza

CONACYT por la beca N° 213454

A Mi Maravillosa Familia.

*A Gran Maestro Jedi Por Enseñarme Los Secretos y El Poder De La
Mente.*

*A El Destino Que Cambia Constantemente Para Que Mis Posibilidades Sean
Infinitas... ..*

ÍNDICE

ABREVIATURAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE CUADROS	IX
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
REFERENCIAS	9
CAPÍTULO I ANTECEDENTES	11
1.1. Generalidades achiote (<i>Bixa orellana</i> L)	11
1.1.1. Descripción Botánica	11
1.1.2. Condiciones agroecológicas del género	11
1.1.3. Polinización en achiote	12
1.2. Colorante natural bixina	12
1.3. Carotenoides	13
1.4. Biosíntesis de los carotenoides en las plantas superiores	14
1.4.1. Síntesis de los precursores de los carotenoides	16
1.4. 2. Síntesis de carotenos	17
1.4.2.1. Formación de fitoeno a partir de IPP y DMAPP	18
1.4.2.2. Reacciones de desaturación	19
1.4.2.3. Reacción de ciclación	21
1.4.2.4. Síntesis de xantofilas	22
1.4.2.5. Síntesis de apocarotenoides	24
1.4.2.6. Apocarotenos	25
1.5. Síntesis y acumulación de carotenoides	26
1.5.1. Regulación de la síntesis y acumulación de carotenoides en frutos	26
1.5.2. Catabolismo de los carotenoides	27
1.6. Marcadores morfológicos	27
1.6.1. Los marcadores genéticos-moleculares	28
1.6.2. Técnica Polimorfismo de Conformación de la Cadena Sencilla	30
1.6.3. Empleo de cebadores para secuencias de genes fitoeno	32

desaturasa y carotenoide dioxigenasas	
1.7. JUSTIFICACIÓN	33
1.8. HIPÓTESIS	35
1.9. OBJETIVOS	37
1.9.1. Objetivo general	37
1.9.2. Objetivos específicos	37
1.10. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	39
REFERENCIAS	41
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS	49
2.1. Selección de material vegetal	49
2.2. Extracción de ADN	50
2.3. Cuantificación de ADN	52
2.3.1. Prueba de integridad del ADN mediante el empleo de cebadores	53
18S	
2.4. Amplificaciones con cebadores sintetizados a partir de secuencias involucradas en la síntesis de carotenoides	54
2.5. Análisis de amplificaciones	56
2.6. Protocolo para la elaboración de la técnica Polimorfismo de Conformación de la Cadena Simple en <i>Bixa orellana</i> L.	56
2.6.1. Electroforesis de SSCP's en achote	57
2.6.2. Electroforesis empleando el equipo GIBCO BRL sequencing system modelo 52	58
2.6.2.1. Preparación de la acrilamida no desnaturalizante	58
2.6.2.2. Condiciones de electroforesis	59
2.6.3. Electroforesis empleando el equipo PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad)	59
2.6.3.1. Preparación de la acrilamida	59
2.6.3.2. Condiciones de electroforesis	60
2.6.4. Tinción de geles de acrilamida con plata	60
2.6.4.1. Proceso de revelado	61
REFERENCIAS	63
CAPÍTULO III RESULTADOS	65

3.1. Selección de once variantes de achiote	65
3.1.1. Características morfológicas de las plantas seleccionadas	65
3.1.2. Contenido de bixina en achiote	67
3.2. Resultados referentes a la extracción de ADN	67
3.2.1. Evaluación la calidad de ADN	69
3.2.1.1. Calidad de ADN medida por espectrofotometría	69
3.2.1.2. Indicadores de la pureza y concentración del ADN	71
3.2.1.3. Prueba de calidad de ADN por amplificación por PCR	72
3.3. Establecimiento de las condiciones de PCR para cebadores involucrados en la síntesis de carotenoides	75
3.4. Establecimiento de la metodología SSCP's para <i>Bixa orellana</i>	81
3.4.1 Electroforesis para secuencias del gen fitoeno desaturasa 2	83
3.4.2. Electroforesis para secuencias del gen fitoeno desaturasa 3	84
3.4.3. Electroforesis para secuencias del gen carotenoide dioxigenasa 1	86
3.4.4. Electroforesis para secuencias del gen carotenoide dioxigenasa 2	87
3.4.5. Electroforesis para secuencias del gen β -licopeno cidasa	89
3.4.6. Electroforesis para secuencias del gen carotenoide dioxigenasa	90
3.4.7. Características fenotípicas de las variantes y resultados SSCP's en secuencias de la ruta de los carotenoides para achiote	91
REFERENCIAS	95
CAPÍTULO IV DISCUSIÓN	97
4.1. Selección de variantes de achiote	97
4.2. Discusión referente a la extracción de ADN	97
4.3. Discusión referente al establecimiento de las condiciones de PCR para cebadores involucrados en la síntesis de carotenoides	98
4.4. Establecimiento de la metodología SSCP's para <i>Bixa orellana</i>	99
4.4.1. Discusión referente a secuencias del gen fitoeno desaturasa	100
4.4.2. Discusión referente a secuencias del gen β -licopeno ciclasa	101
4.4.3. Discusión referente a secuencias del gen carotenoide dioxigenasa	104
REFERENCIAS	105
CAPÍTULO V CONCLUSIONES	109
CAPÍTULO VI PERSPECTIVAS	111

CAPÍTULO VII ANEXOS	113
7.1. Medición del porcentaje de bixina	113
7.2. Determinación de calidad del ADN genómico	114
REFERENCIAS	115

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AFLP	Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos Amplificados
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
Bind-Silane	G-methacryloxypropyltrimethoxysilane
BoBADH	Bixina aldehído deshidrogenasa
BoLCD	Licopeno bixina dioxigenasa
BonBMT	Norbixina metil transferasa
ccd	Gen carotenoide dioxigenasa
CCD's	Dioxigenasas de corte de carotenoides
CDP-ME	4-difisfocetil-2-C-metil-eritritol
CMK	4-(histidina-5-difisfato)-2-C-metil-D-eritritol kinasa
CMS	2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato citidil transferasa
CRTISO	Caroteno isomerasa
dg	Cebadores degenerados para la carotenoide dioxigenasa
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
dig	Cebadores para secuencias de dioxigenasas de corte de carotenoides
DMAPP	Dimetil-alil-pirofosfato
dNTPs	Mezcla de trifosfatos desoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, cTTP)
DXP	1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato
DXR	1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato reducto isomerasa
DXS	1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato sintasa
FPP	Farnesil pirofosfato
G3P	D-gliceraldehído-3-fosfato
GA	Acido giberélico
GGDS	Geranil geranil pirofosfato sintasa
GGPP	Geranil-geranil pirofosfato
GGPS	Geranilgeranil pirofosfato sintasa
GPP	Geranil pirofosfato
Gu	Guatemala
HDR	Hidroximetil butenil difosfato reductasa
HMPBP	Hidroximetil butenil difosfato reductasa
HDS	Hidroximetil butenil difosfato sintasa
IDI	Isopentil pirofosfato isomerasa
IPP	Isopentenil pirofosfato
mA	Mili ampares
MCS	2-C-metil-eritritol 2, 4- ciclodifisfato sintasa
MDE	Gel para Detección de Mutaciones
ME-cPP	2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodofosfato
MEP	Sintetiza 2-C-metil-eritritol-4-fosfato

mM	Milimolar
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
MVA	Ácido mevalónico
NCEDs	<u>N</u> ine- <u>C</u> is- <u>E</u> poxy-carotenoid <u>D</u> ioxygenases
NSY	Neoxantina sintasa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<i>pds</i>	Gen fitoeno desaturasa
pH	Potencial de hidrógeno
PP	Pre-fitoeno
Pr	Peruana roja
PSY	Fitoeno sintasa
PTOX	Oxidasa terminal de plástidos
PVP	Polivinilpirrolidona
RAMPO	Amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites
RAPD	Amplificación aleatoria del ADN polimórfico
Repel-Silane	2% solution of dimethyldichlorosilane dissolved in octamethyl cyclo octasilane
REs	Restriction Enzymes
RFLP	Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción
rmp	Revoluciones por minuto
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SRAP's	Polimorfismo Amplificado de Secuencias Relacionadas
SSCP	Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple
SSR	Microsatélites o Secuencias simples repetidas
Ta	Temperatura de alineamiento
TBE	Trizma/ácido bórico/sal disódica del etilendiaminotetra-acético
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilnediamina
VDE	Violaxantina de-epoxidasa
Vp14	<i>Viviparous 14</i>
ZDS	ζ-caroteno desaturasa
ZEP	Zeaxantina epoxidasa
β-lyc	β-licopeno ciclasa
β-chx	β-caroteno hidroxilasa
β-lyc	β-licopeno ciclasa
ε-chx	ε-caroteno hidroxilasa
ε-lyc	ε-licopeno ciclasa

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema general de la biosíntesis de carotenoides en plantas	15
Figura 2	Esquema general de la biosíntesis de isoprenoides en plantas	17
Figura 3	Esquema general de la biosíntesis de fitoeno en plantas superiores	19
Figura 4	Esquema general de la biosíntesis de licopeno a partir de fitoeno	20
Figura 5	Esquema general de la ciclación del licopeno	21
Figura 6	Esquema general de la biosíntesis de xantofilas	23
Figura 7	Esquema de la biosíntesis de bixina	26
Figura 8	Marcador de peso molecular 1Kb Plus	52
Figura 9	Perfil de una reacción de PCR	54
Figura 10	Selección de fenotipos contrastantes de achiote	66
Figura 11	Extracción de ADN de tejido foliar joven de achiote	68
Figura 12	AND genómico empleando tres métodos de extracción	72
Figura 13	Análisis de Integridad del ADN genómico	73
Figura 14	Producto de amplificación por PCR de las 11 variantes de achiote	74
Figura 15	Producto de PCR con cebadores pds3	77
Figura 16	Producto de PCR con cebadores pds2	77
Figura 17	Producto de PCR con cebadores β -lyc	78
Figura 18	Producto de PCR con cebadores ccd2	79
Figura 19	Producto de PCR con cebadores ccd2 en agarosa 3%	79
Figura 20	Producto de PCR con cebadores dg	80
Figura 21	Producto de PCR con cebadores ccd1	81
Figura 22	Velocidad de migración de los productos de PCR con cebadores de ccd1, β -lyc, ccd2, pds2 y pds3	82

Índice de Figuras

Figura 23	Patrones de bandeo SSCP's para pds2	83
Figura 24	Patrones de bandeo SSCP's para pds3	85
Figura 25	Patrones de bandeo SSCP's para ccd1	87
Figura 26	Patrones de bandeo SSCP's para ccd2	88
Figura 27	Patrones de bandeo SSCP's para β -lyc	89
Figura 28	Patrones de bandeo SSCP's para dg	90

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Mezcla de reacción para la PCR	53
Cuadro 2	Cebadores para la amplificación de secuencias de genes involucrados en la síntesis de carotenoides en achiote	54
Cuadro 3	Componentes para la elaboración de geles de acrilamida para la detección de mutaciones	57
Cuadro 4	Contenido de bixina en semillas de achiote	67
Cuadro 5	Extracciones de ADN genómico en plantas de achiote	70
Cuadro 6	Cebadores empleados en la elaboración de SSCP's en achiote	76
Cuadro 7	Número de polimorfismos para 11 fenotipos de achiote	91

RESUMEN

El achiote (*Bixa orellana* L) es un cultivo originario de América tropical, productor del pigmento bixina, con gran demanda en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética, nacional e internacional. La variación en producción y calidad de pigmento presente en las plantas de achiote, ha motivado el desarrollo de nuevas metodologías para su mejoramiento genético. Los genes que codifican las enzimas fitoeno desaturasa (PDS), licopeno beta ciclasa (β -LCY) y carotenoide dioxigenasas (CCD) son clave en la síntesis de carotenoides. Así este estudio se enfocó en desarrollar marcadores moleculares a partir de estos genes, mediante la técnica de Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP). Los resultados de la aplicación de esta técnica en achiote, permitieron analizar la variación de once variantes de este cultivo. Los resultados obtenidos, revelaron que existe variación a nivel de secuencias de estos genes en las variantes analizadas. En el caso de la secuencia del gen *pds*, el análisis de los perfiles de este gen, mostraron asociación entre el color del fruto y el contenido de bixina en la semilla. En comparación con los perfiles de las secuencias del gen *pds*, los perfiles generados por las secuencias del gen *β -lyc*, detectan mayor polimorfismo. Los resultados coinciden con estudios realizados en papaya y toronja en los cuales la concentración de carotenoides es mayor en las variedades rojas, producto de la acumulación de licopeno; siendo el licopeno el principal precursor en la síntesis de bixina por acción de enzimas de corte de carotenoides. Concluimos que la metodología de SSCP es útil para identificar variación alélica y contribuir a desarrollar herramientas para la identificación de las plantas con altos rendimientos de carotenoides y/o permita la identificación específica para un carotenoide en particular.

ABSTRACT

Annatto (*Bixa orellana*L.) is a crop from tropical America that produces the pigment bixin, for which there is a high demand in pigment for the food industry, pharmaceuticals and cosmetics, both nationally and internationally. The variation in production and quality of the pigment found in annatto has motivated the development of methodologies for its genetic improvement. The genes that codify Phytoene desaturase (PDS), Lycopene beta cyclase (β -LCY) and Carotenoid dioxygenases (CCD) are crucial for carotenoid biosynthesis. Thus this study focuses on developing molecular markers for these genes using Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP). The results of the application of this technique in annatto enabled eleven varieties of this crop to be studied. The results revealed a variation at sequence level in those genes of the analyzed varieties. In the case of the *pds* gene sequence, the band patterns revealed by the analysis of this gene showed an association with fruit color and bixin accumulated in seeds. In comparison, whit patterns from *pds* gene sequence, the patterns obtained from *β -lyc* gene sequence showed more polymorphism. These results concur with those of studies performed on papaya and grapefruit, in which the carotenoid concentration was higher in red varieties, as a result of the lycopene accumulation; because lycopene is the main precursor on bixin synthesis by carotenoid cleavage enzymes. We conclude that the SSCP methodology is useful to identify allelic variation and can contribute to development of tools for the identification of plants with high yields of carotenoids and allow specific carotenoids to be identified.

INTRODUCCIÓN

Bixa orellana L., es un arbusto perenne, nativo de los Neotrópicos (Arce, 1999), de una región del Amazonas en el Brasil (Cujo, 1989), conocida en México como achiote. Entre las Angiospermas es una especie de pequeño contenido de ADN nuclear ($4C = 0.78$ pg), y número cromosómico de $2n = 14$ (Krishnan y Ayyangar, 1987; Hanson *et al.*, 2001). El achiote es productor del pigmento bixina, el cual se acumula principalmente en sus semillas y presenta gran demanda a nivel mundial en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética por sus propiedades no tóxicas en la salud (Antonio *et al.*, 2005, Sasaki *et al.*, 1980; Haveland-Smith, 1981; Ishidate *et al.*, 1984; Fujita *et al.*, 1988).

La variación en producción y calidad de pigmento presente en las variantes agronómicas de achiote, ha motivado a nuestro grupo de investigación a desarrollar metodologías que permitan generar líneas mejoradas con características agronómicas deseables, así como promover la producción de β -caroteno principal precursor de la vitamina A, cuya deficiencia en la dieta humana conlleva a graves problemas de salud a nivel mundial. Es por ello que durante los últimos años, se han desarrollado bases genético moleculares en el laboratorio de la Dra. Rivera (Narváez *et al.*, 2001; Rivera-Madrid *et al.*, 2006; Valdez-Ojeda *et al.*, 2008) que han permitido ahondar en el conocimiento de los genes implicados en la ruta de síntesis de carotenoides, principalmente de bixina en *Bixa orellana*, así como la caracterización morfológica y molecular de los distintos morfotipos de este cultivo (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008), con el fin de aportar metodologías que permitan desarrollar herramientas para el mejoramiento genético de achiote, para incrementar la producción y calidad de pigmentos en esta planta.

Estudios realizados por el grupo de la Dra. Rivera-Madrid evidenciaron que los genes que codifican a las enzimas fitoeno desaturasa (PDS), licopeno ciclasas (beta y épsilon ciclasas: β -LCY, ϵ -LCY respectivamente) y carotenoide dioxigenasa (CCD) (Rodríguez-Ávila, *et al.*, en preparación) fueron los que mostraron los mayores cambios en su expresión con respecto a la variación en la producción de pigmentos; reportados como

genes clave en síntesis y acumulación de pigmentos en otros cultivos como toronja, papaya, maíz, trigo y azafrán (Zhu *et al.*, 2008; Harjes *et al.*, 2008; Aluru *et al.*, 2008). Por lo tanto, el presente trabajo inició con el uso de secuencias de los genes clave en la síntesis de carotenoides en *Bixa orellana* mencionados anteriormente, para generar marcadores moleculares con potencialidad para la detección de carotenoides específicos en las distintas variantes de achiote. A partir de los estudios de caracterización de tres poblaciones de la península de Yucatán realizados por Valdez-Ojeda *et al.* (2008), se seleccionaron plantas de achiote con características fenotípicas contrastantes de la plantación de Chicxulub Pueblo Yucatán, la cual presenta una población representativa de las variantes presentes, en la Península de Yucatán (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008).

En este sentido, éste estudio se enfocó en la obtención de marcadores moleculares específicos secuencias de los genes *pds*, *β-lyc* y *ccd*, mediante la técnica de SSCP (Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla) como herramienta para estudiar la variación genética presente en achiote, detección y selección de plantas promisorias en la acumulación de carotenoides, con el fin de lograr la detección de polimorfismos en dichas variantes, de esta manera se enfocó en obtener marcadores moleculares específicos para genes que participan en la síntesis de carotenoides, empleando fragmentos de secuencias de genes de *B. orellana* los cuales codifican enzimas involucradas en la síntesis de carotenoides como la enzima fitoeno desaturasa (PDS), enzima β-licopeno ciclasa (β-LCY), así como la enzima carotenoide dioxigenasa (CCD) involucrada en la síntesis de bixina, mediante la técnica de SSCP (Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla).

La aplicación de la técnica SSCP en achiote empleando las secuencias *pds2*, *pds3* y *β-lyc*, permitió analizar la variación presente en los genes clave en la biosíntesis y acumulación de carotenoides en achiote. Además se encontró que las plantas de achiote con características fenotípicas de fruto rojizo y bixina en la semilla superior al 2.15%, presentaron perfiles SSCP's para el gen *pds* distintos de los individuos de fruto verde y bixina en la semilla inferior al 2.15%. Contrariamente a las secuencias *pds*, los perfiles generados por las secuencias *β-lyc*, no presentaron asociación con alguna característica

particular, sin embargo detectaron un mayor número de polimorfismos que las secuencias pds. Los resultados coinciden con estudios realizados en papaya y toronja en los cuales la concentración de carotenoides es mayor en las variedades rojas, producto de la acumulación de licopeno; siendo en achiote el licopeno el principal precursor en la síntesis de bixina por acción de enzimas de corte de carotenoides.

Este estudio contribuirá al conocimiento genético de dicha especie al permitir la obtención de marcadores moleculares específicos para la detección de variantes productoras de mayor cantidad de pigmentos. De esta forma servirán como marcadores para la detección temprana de variantes productoras de mayor cantidad de pigmento. Concluimos que las variaciones en los perfiles SSCP's, en las variantes de achiote, pueden conducir al desarrollo herramientas para la identificación de las plantas con altos rendimientos de carotenoides.

REFERENCIAS

- Aluru M, Xu Y, Guo R, Wang Z, Li S, White W, Wang K, Rodermeil S. (2008). Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *Journal of Experimental Botany* 59, 3551–3562.
- Antonio C.T.S. Júnior, Lídia M.B.O. Asad, Eduardo B. de Oliveira, Karla Kovary, Nasser R. Asad and Israel Felzenszwalb. (2005). Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. *Genet. Mol. Res.* 4 (1), 94-99.
- Arce, J. (1999). El achiote *Bixa orellana* L. Cultivo promisorio para el trópico, In: Earth, first (ed). Turrialba, Costa Rica, p. 149.
- Cujo, P. (1989). Cultivo de especies. En compendio de Agronomía Tropical Tomo 4. San José Costa Rica, IIGA. pp. 629-633.
- Fujita, H., Nakano, M. and Sasaki, M. (1988). Mutagenicity test of food additives with *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102. *Kenkyu Nenpo-Tokyo-Toritsu Eisei Kenkyusho* 39, 343-350.
- Hanson, L., K.A. Mc Mahon; M.A.T. Jonson and M.D. Bennet. (2001). First nuclear ADN C-values for another 25 angiosperm families. *Ann. Bot.* 88, 851–858.
- Harjes C., Torbert R. Rocheford, Ling Bai, Thomas P. Brutnell, Catherine Bermudez Kandianis, Stephen G. Sowinski, Ann E. Stapleton, Ratnakar Vallabhaneni, Mark Williams, Eleanore T. Wurtzel, Jianbing Yan, Edward S. Buckler. (2008). Tapped for Maize Biofortification Natural Genetic Variation in Lycopene Epsilon. *Science*, 319-330
- Haveland-Smith, R.B. (1981). Evaluation of the genotoxicity of some natural food colours using bacterial assays. *Mutat. Res.* 91, 285-290.
- Ishidate, M., Sofuni, K., Yoshikawa, K., Hayashi, M., Nohmi, M. and Matsuoka, A. (1984). Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food Chem. Toxicol.* 22, 623-636.
- Krishnan, N. y K.R. Ayyangar. (1987). Taxonomical relationships of *Bixa* L. In: Proceedings of the Indian Science Congress Association vol. 74 (3, VI) p. 105.

Narváez, J., P. Flores., Herrera-Valencia, E. Castillo. R. Ku-Cahuich; B. Canto-Canché., N. Santana-Buzzy., y R. Rivera-Madrid. (2001). Development of molecular techniques for the study the metabolism of carotenoids in the high pigment producer plant *Bixa orellana* L. HortScience. 36, 982-986.

Rivera-Madrid, R., R.M. Escobedo-GM, E. Balam- Galera, M. Vera-Ku, and H. Harries. (2006). Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). Sci. Hort. 109,165–172.

Sasaki, M., Sugimura, K., Yoshida, M. and Abe, S. (1980). Cytogenetic effects of 60 chemicals on cultured human and Chinese hamster cells. *Senshokutai* 20, 574-584.

Valdez-Ojeda R, Aguilar-Espinosa M, Ortiz R. Quiros CF, Stefanoni-Hernández, JL, and Rivera-Madrid R. (2008). Assessing genetic variation for morphological traits and molecular markers in annatto (*Bixa Orellana* L.) in Yucatan, México. HORTSCIENCE 43(7), 2013–2017.

Zhu J, Verslues PE, Zheng X, Lee BH, Zhan X, Manabe Y, Sokolchik I, Zhu Y, Dong CH, Zhu JK (2005). HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 9966-997

CAPÍTULO I ANTECEDENTES

1.1. Generalidades achiote (*Bixa orellana* L)

La familia Bixaceae está representada por un solo género, *Bixa* (Paiva *et al.*, 2003). *Bixa orellana* L., es la única especie cultivada comercialmente, siendo actualmente explotada en las zonas tropicales y subtropicales de América, Asia, África y Oceanía (Michelangeli *et al.*, 2002). El achiote cultivado a nivel local es empleado como colorante y sazónador en la cocina Maya Yucateca (Godoy, 2000). Plotkin (1993) menciona que en Brasil el pigmento es usado por los indígenas para adornar y proteger sus cuerpos. Arce (1999), cita que: de las seis especies del género *Bixa*, únicamente *Bixa orellana* L. se cultiva a escala comercial, las restantes aún no han sido domesticadas y solamente se encuentran en forma silvestre en su lugar de origen.

1.1.1. Descripción Botánica

De acuerdo a Izco *et al.*, (2004) la clasificación taxonómica de *Bixa orellana* es la siguiente: División: Spermatophyta; Subdivisión: Angiospermae; Clase: Magnoliopsida; Subclase: Ranunculidae (Eudicotiledóneas); Super orden: Rutanae; Orden: Malvales; Familia: Bixaceae; Género: *Bixa*; Especies: *Bixa orellana* L. (sin *B. purpurea* Hort.); *Bixa arborea* Huber; *Bixa excelsa* Gleason & Krukoff; *Bixa platycarpa* R. & P.; *Bixa urucurana* Willd (sin *B. sphaerocarpa*); *Bixa upatensis* Gr.; azara Retp.

1.1.2. Condiciones agroecológicas del género

El achiote (*B. orellana* L.) prospera bien en los climas tropicales y subtropicales que están comprendidos entre los 0 a los 1 500 msnm. En México este cultivo tiene una amplia distribución, que va desde los 50 a los 1 500 msnm, encontrándose en los estados de Puebla, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Tabasco, Chiapas,

Campeche y Yucatán. Si durante la floración el viento es intenso, la polinización de las flores por parte de los insectos (especialmente las abejas) se dificulta grandemente, causando de ésta manera la merma considerable en la producción de cápsulas y semillas, (Balam, 2003 y Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Así mismo, es recomendable que el lugar donde se va establecer la plantación no sea ventoso, pues ese fenómeno es el responsable de la caída de muchas flores, frutos, ramas y plantas. En plantaciones a escala, los árboles plantados a espacios de 5 metros, producen un rendimiento de 80-100 Kg ha⁻¹ de semilla (Heywood, 1993).

1.1.3. Polinización en achiote

En el estado de Yucatán, México, la época de floración del achiote se presenta en los meses de septiembre, octubre y noviembre. En un estudio hecho por Rivera-Madrid *et al.*, 2006, se encontró que la viabilidad del polen en achiote declina cerca del 50% a las 24 h después de ser liberado por la antera. Esto es significativo porque la viabilidad del polen es relativa a la fecundidad y podría limitar la producción de semillas (Huang *et al.*, 2004), además la receptividad del estigma es conocida por ser un estado esencial en la maduración floral y esto podría influenciar significativamente en el rango de autopolinización y polinizaciones sucesivas en el ciclo de vida floral (Dafni y Motte, 1998).

1.2. Colorante natural bixina

El pigmento presente en la cubierta de las semillas de achiote contiene bixina y norbixina (Rodríguez *et al.*, 2005b), la bixina es un apocarotenoide, constituido de 25 carbonos (C₂₅H₃₀O₄), su formación se da partir de carotenos de 40 carbonos, es de color rojo-naranja, muy apreciado por tener una importancia económica por su alta demanda en el ámbito nacional e internacional. Se emplea como colorante en la industria de alimentos, ya que se usa para mejorar la presentación del color de los derivados lácteos, cárnicos, grasas y en los cosméticos, pues los aceites emolientes de la planta contienen carotenoides, los cuales poseen cualidades antioxidantes (Márquez y Del Amo, 1982;

Cuadra, 1994; Godoy, 2000), además los carotenoides han sido extensamente estudiados por su potencial para reducir el riesgo para el cáncer y otras enfermedades (Collins, 2001). Evidencias fuertes sugieren que las dietas ricas en carotenoides pueden prevenir algunas enfermedades crónicas como hipertensión, y enfermedades de la próstata (Giovannucci, 2002 y Mares-Perlman *et al.*, 2002). Según Römer y Fraser (2005) los carotenoides, son el grupo de pigmentos más ampliamente encontrados en la naturaleza; en las plantas actúan como precursores de fitohormonas (Schwartz *et al.*, 2003); en la dieta humana ejercen funciones antioxidantes y son precursores de la vitamina A (Griffiths *et al.*, 2007; Harjes, *et al.*, 2008; Morris *et al.*, 2004.; Pecker *et al.*, 1996 y Pogson *et al.*, 1996).

1.3. Carotenoides

La biosíntesis de los carotenoides se inicia por la isomerización de moléculas de isopentenil pirofosfato (IPP), dando lugar a la dimetilalil difosfato (DMAPP), el cual es sustrato para la geranyl difosfato sintetasa, para la producción de geranyl difosfato (GPP), y éste último actúa como sustrato para la geranyl-geranyl difosfato sintasa, originándose el geranyl geranyl difosfato (GGPP). Los carotenoides se originan en los plástidos de las células vegetales y son moléculas de 40 carbonos con dobles enlaces conjugados derivados de la dimerización de dos moléculas de 20 carbonos de GGPP, siendo éste último el precursor de múltiples isoprenoides de importancia como el tocoferol, clorofila, quinonas y giberelinas (Fraser *et al.*, 1995). En el inicio de la ruta de biosíntesis se lleva a cabo la isomerización de moléculas de IPP a su forma activa alílica, formando el dimetilalil difosfato (DMAPP), actuando este último como sustrato para la geranyl difosfato sintetasa para producir GPP al cual le será agregada una nueva molécula de DMAPP para dar lugar al farnesil pirofosfato (FPP); a su vez, la enzima geranyl-geranyl difosfato sintetasa produce GGPP a partir del farnesil difosfato. Es a partir del geranyl geranyl pirofosfato que se lleva a cabo la biosíntesis del fitoeno, el cual es el primer compuesto de tipo carotenoide (Simkin, *et al.*, 2007), como se puede apreciar en la Figura 1.

La relevancia de los carotenoides a nivel biológico radica en que estos compuestos son los responsables de proporcionar una gran variedad de colores tanto en animales como en plantas y microorganismos. Por ejemplo, el color naranja característico de la carne del salmón y el rojo del exoesqueleto de las langostas son debidos al ceto-carotenoide astaxantina (Grotewold, 2006). En plantas, además tienen un papel importante como componentes del mecanismo de defensa, de desarrollado, como respuesta de los organismos expuestos a alta irradiación solar, brindando foto protección durante la fotosíntesis y actuando como antioxidantes y reguladores de la fluidez de la membrana celular (Unmeno *et al.*, 2005), además de servir como precursores de la fitohormona ácido abscísico (ABA) (Grotewold, 2006).

La posterior conversión de fitoeno a licopeno, por su parte se lleva a cabo mediante la acción de dos enzimas desaturasas, la fitoeno desaturasa (PDS) y la ζ -caroteno desaturasa (ZDS), las cuales introducen cuatro dobles enlaces que convierten al fitoeno en licopeno, vía fitoflueno y neurosporeno (Cunningham y Gantt, 1998).

1.4. Biosíntesis de los carotenoides en las plantas superiores

Todos los isoprenoides derivan de la unidad fundamental de 5 átomos de carbono, isopentenil difosfato (IPP), y de su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP), que son sintetizados en las plantas superiores a través de dos rutas independientes y compartimentalizados. La ruta del ácido mevalónico (MVA), de la que derivan los isoprenoides mitocondriales y citosólicos (ubiquinona, esteroides, citoquininas y brasinosteroides) tienen lugar en el citosol y/o en el retículo endoplasmático. La biosíntesis de IPP plastídico y sus derivados isoprenoides (carotenoides, monoterpenos, la cadena lateral de las clorofilas, plastoquinona y tocoferoles, y las hormonas vegetales giberelinas y ácido abscísico) transcurre mediante una ruta independiente de MVA, descrita por primera vez por Rohmer *et al.*, (1993), de la que se han identificado todos los genes implicados, tanto en plantas como en bacterias, aunque la contribución de cada enzima al control del flujo metabólico en esta ruta, así como su participación en el contenido final de IPP y DMAPP disponibles en la síntesis de isoprenoides, aún no ha

sido esclarecida en detalle. Diversos estudios indican que existe intercambio de metabolitos entre ambas rutas, aunque el tráfico parece ocurrir preferencialmente del plástido al citosol, y únicamente en determinadas condiciones ambientales (Rodríguez-Concepción y Boronat 2002).

La biosíntesis de carotenoides en las plantas superiores ha sido objeto de estudio en los últimos años (Cunningham y Gantt 1998; Sandmann 2001; Hirschberg 2001; Cunningham 2002; Sandmann 2002; Romer y Fraser 2005). En la Figura 1 se presenta un esquema general de la ruta de biosíntesis de carotenoides a partir de GGPP en plantas, donde se indican las enzimas responsables de cada etapa.

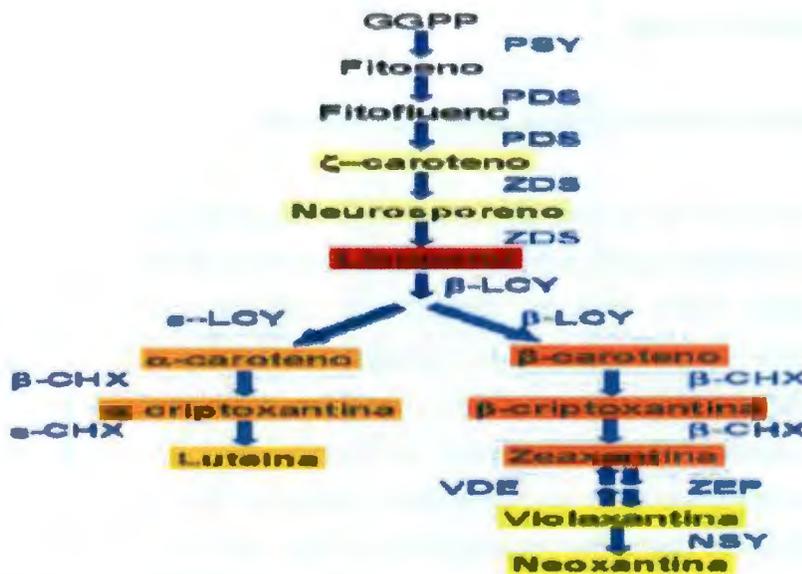


Figura 1: Esquema general de la biosíntesis de carotenoides en plantas. En azul se indican las enzimas que catalizan cada reacción: GGPP (Geranilgeranil pirofosfato) PSY (Fitoeno sintasa), PDS (Fitoeno desaturasa), ZDS (ζ -caroteno desaturasa), β -LCY (β -licopeno ciclasa), ϵ -LCY (ϵ -licopeno ciclasa), β -CHX (β -caroteno hidroxilasa), ϵ -CHX (ϵ -caroteno hidroxilasa, ZEP (zeaxantina epoxidasa), VDE (violaxantina de-epoxidasa) NSY (neoxantina sintasa).

El primer paso específico de la ruta de los carotenoides, mediado por la fitoeno sintasa (PSY), consiste en la condensación de dos moléculas de geranil-geranil pirofosfato (GGPP) para dar lugar al fitoeno. Cuatro desaturaciones sucesivas de este compuesto, catalizadas por las enzimas fitoeno desaturasa (PDS) y ζ -caroteno desaturasa (ZDS), dan lugar al licopeno, cuya molécula es modificada por acción de las ϵ - y/o β -caroteno

hidroxilasas (ϵ -CHX, β -CHX) y zeaxantina epoxidasa (ZEP) dan lugar a la formación de xantofilas (carotenoides oxigenados). Todas las enzimas implicadas en la biosíntesis de carotenoides en plantas superiores están codificadas por genes nucleares y poseen en el extremo amino-terminal un péptido señal de localización en plástidos, donde tienen lugar las reacciones de biosíntesis de carotenoides (Sandmann 1994).

Recientemente se han reportado diferentes revisiones bibliográficas sobre la biosíntesis de carotenoides en las que se detallan los últimos conocimientos adquiridos sobre genes y enzimas implicadas en esta ruta (Fraser y Bramley 2004; Bouvier *et al.*, 2005; Howitt y Pogson 2006; Della Penna y Pogson 2006; Sandmann *et al.*, 2006). A continuación se describen, brevemente, las reacciones, los genes y las enzimas, implicadas en la biosíntesis de carotenoides.

1.4.1. Síntesis de los precursores de los carotenoides

La primera reacción de la ruta de Rohmer consiste en la producción a partir de D-gliceraldehído-3-fosfato (G3P) e (hidroximetil) tiamina derivada de piruvato, de 1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato (DXP), mediante condensación catalizada por la DXP sintasa (DXS) (Figura 2). En el siguiente paso de la ruta plastídica de biosíntesis de isoprenoides, la enzima DXP reductoisomerasa (DXR) sintetiza 2-C-metil-eritritol-4-fosfato (MEP) mediante la reordenación intramolecular y reducción de DXP. Dado que este último compuesto es el precursor de las vitaminas B1 (tiamina) y B6 (piridoxol), se considera el MEP como el primer compuesto específico de la ruta, y se ha consensuado su uso para dar nombre a la misma (Rodríguez-Concepción y Boronat 2002; Liu *et al.*, 2005).

En las siguientes reacciones las enzimas CMS (2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato citidil transferasa), CMK (4-(histidina-5-difosfato)-2-C-metil-D-eritritol kinasa) y MCS (2-C-metil-eritritol 2, 4- ciclodifosfato sintasa) median la formación secuencial de 4-difosfocetil-2-C-metil-eritritol (CDP-ME), CDP-ME 2-fosfato y 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (ME-cPP), respectivamente. La reducción de este último compuesto, catalizada por la enzima hidroximetil butenil difosfato (HMPBP) sintasa (HDS) produce HMPBP, que es finalmente convertido en una mezcla de IPP y DMAPP (5:1), por la acción de la enzima HMPBP

reductasa (HDR) Rodríguez-Concepción y Boronat 2002; Liu *et al.*, 2005). En plantas superiores, a excepción de DXS, en el resto de enzimas de la ruta MEP se predice un dominio ubicado en su amino-terminal que podría actuar como señal de importación a plástidos, siendo la forma madura de las proteínas de plantas superiores muy similares a las homólogas bacterianas, excepto HDS, que contiene un dominio específico de plantas (Querol *et al.*, 2002).

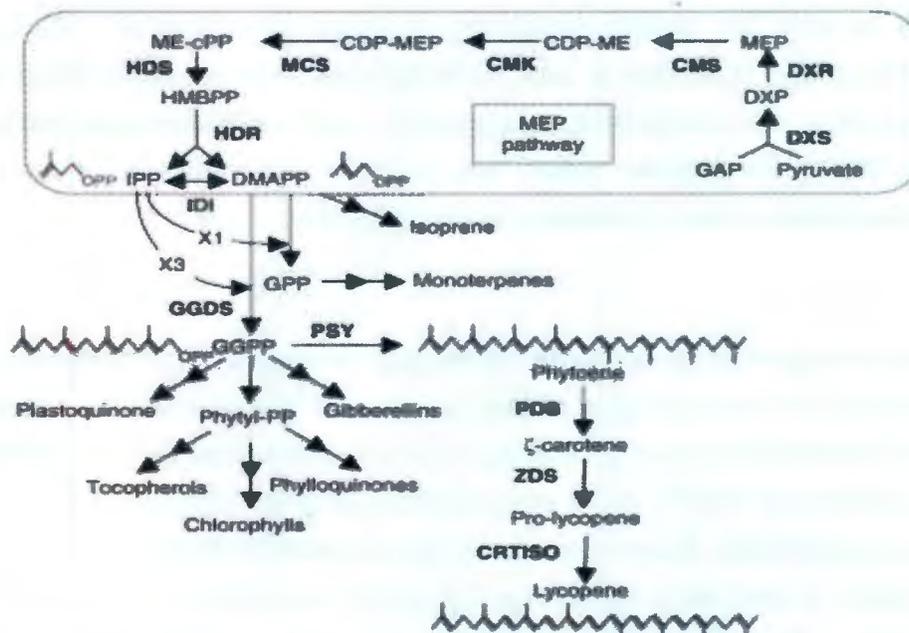


Figura 2: Esquema general de la biosíntesis de isoprenoides en plantas. Según Botella Paiva y Rodríguez-Concepción (2006). DXS (1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato sintasa), DXR (1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato reducto isomerasa), CMS (2-C-metil-eritritol-4-fosfato citidil transferasa), CMK (4-(histidina-5-difosfato)-2-C-metil-D-eritritol kinasa), MCS (2-C-metil-eritritol 2, 4- ciclodifosfato sintasa), HDS (hidroximetil butenil difosfato sintasa) HDR (hidroximetil butenil difosfato reductasa), IDI (Isopentil pirofosfato isomerasa), GGDS (Geranyl geranyl pirofosfato sintasa), PSY (Fitoeno sintasa), ZDS (ζ-caroteno desaturasa), CRTISO(caroteno isomerasa).

1.4.2. Síntesis de carotenos

1.4.2.1. Formación de fitoeno a partir de IPP y DMAPP

La condensación de una molécula de IPP (C_5) con una molécula de DMAPP (C_5), da lugar al intermediario geranyl pirofosfato (GPP, C_{10}) que se condensa con una molécula

adicional de IPP, formando farnesil pirofosfato (FPP, C₁₅). Este compuesto junto con otra molécula adicional de IPP, produce geranylgeranyl pirofosfato (GGPP, C₂₀), precursor común de carotenoides, clorofilas y giberelinas. Esta serie de reacciones de condensación ocurren mediante ataque de un ion carbonilo al doble enlace C-3,4 de la molécula de IPP, con la consiguiente pérdida del fosfato inorgánico. Cada una de estas reacciones está mediada por la acción de una enzima, denominada GGPP sintasa (GGPS). En *Arabidopsis* se han identificado 12 genes que podrían codificar enzimas con actividad GGPS, 5 de ellas con posible localización plastídica (Okada *et al.*, 200; Lange y Ghassemian 2003). Dado que el paso catalizado por este tipo de enzimas es una ramificación de la ruta de biosíntesis de isoprenoides, podría suponerse que alguna de las proteínas GGPS identificadas fueran una isoforma específica de la síntesis de carotenoides (Botella Paiva y Rodríguez-Concepción 2006).

El primer paso específico de la ruta de carotenoides consiste en la condensación de dos moléculas de GGPP para dar lugar al fitoeno (Figura 3). Esta reacción, catalizada por la fitoeno sintasa (PSY) ocurre en dos etapas. La primera etapa consiste en la condensación de dos moléculas de GGPP, previa eliminación de un grupo difosfato de una de ellas, dando lugar al prefitoeno. A continuación, el prefitoeno sufre un reordenamiento molecular que conlleva a la eliminación de un grupo difosfato y neutralización de un carbocatión (Boubier *et al.*, 2005). El producto mayoritario de las PSY de plantas es 15-*cis*-fitoeno (Goodwin 1983). La correcta actividad enzimática de PSY requiere asociación a membrana (Schledz *et al.*, 1996). Los genes que codifican la síntesis de PSY han sido estudiados en diversas plantas, como en: *Arabidopsis thaliana*, esta proteína parece estar codificada por un único gen, mientras que en jitomate (*Solanum lycopersicon*) y tabaco (*Nicotiana plumbaginifolia*) existen dos genes que codifican PSY funcionales (Fraser *et al.*, 1999; Fraser y Bramley 2004). En el caso del jitomate, la isoforma PSY-1 es la responsable de la síntesis de fitoeno en tejido cromoplástico, mientras que PSY-2 lo es en tejido cloroplástico (Fraser *et al.*, 1999). Pese a que los genes codifican ambas isoformas de PSY son 91% idénticos, la disfunción de PSY-1 no es compensada eficazmente por PSY-2 (Fraser *et al.*, 1999).

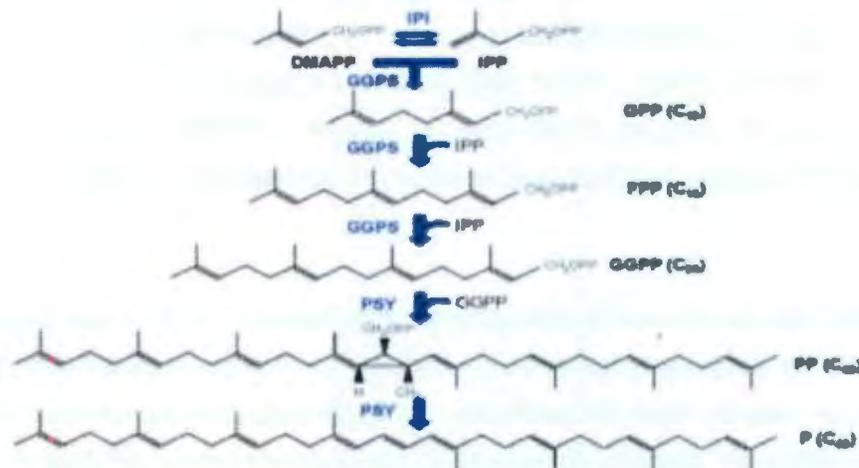


Figura 3: Esquema general de la biosíntesis de fitoeno en plantas superiores. Adaptado de Fraser y Bramley (2004). En azul se indican las enzimas de fitoeno que catalizan cada reacción, GGPS (geranilgeranil pirofosfato) y PSY (fitoeno sintasa y, en negro los compuestos, DMAPP (dimetil-alil-pirofosfato), IPP (isopentenil pirofosfato), GPP (geranil pirofosfato), FPP (farnesil pirofosfato), GGPP (geranilgeranil pirofosfato), PP (prefitoeno), P (fitoeno).

1.4.2.2. Reacciones de desaturación

En plantas superiores la síntesis de licopeno a partir de 15-*cis*-fitoeno conlleva cuatro desaturaciones sucesivas catalizadas por dos enzimas, PDS y ZDS (Figura 4).

Cada una de estas enzimas introduce dos dobles enlaces simétricos en ambos extremos de la molécula de sustrato. La introducción secuencial de dobles enlaces en los carbonos 11 y 11' de la molécula de fitoeno está catalizada por la PDS. Esta desaturación de la molécula viene acompañada de isomerización *cis* de los enlaces 9 y 9' produciéndose fitoflueno (15,9'-*dicis*-fitoflueno) y ζ-caroteno (9, 15, 9'-*tricis*-ζ-caroteno). A continuación el doble enlace 15-*cis* es isomerizado a la forma *trans*, originándose 9,9'-*dicis*-ζ-caroteno. La forma en que esta isomerización (enzimática o no) tiene lugar aún no ha sido del todo resuelta. En el siguiente paso la enzima ZDS introduce dobles enlaces en *cis* en los carbonos 7 y 7', formándose neurosporeno (7,9, 9'-*tricis*-neurosporeno) y finalmente prolicopeno (7,9,7',9'-*tetracis*-neurosporeno) (Breitenbach y Sandmann 2005). Por último, el prolicopeno es isomerizado a forma *trans* por acción de la caroteno isomerasa (CRTISO) (Isaacson *et al.*, 2002). Los genes que codifican las enzimas PDS y ZDS han

sido identificados en diversas plantas superiores. Las secuencias codificantes de PDS y ZDS son 33-35% similares y todas ellas poseen un dominio de unión a dinucleótido (FAD/NADP) en el extremo amino-terminal (Fraser y Bramley 2004). La correcta funcionalidad enzimática de PDS requiere asociación a membrana (al-Babili *et al.*, 1996).

La eliminación de dos átomos de hidrógeno en cada reacción de desaturación requiere el acoplamiento de estas reacciones a una cadena de transporte electrónico que utiliza oxígeno como aceptor final de electrones. Algunos componentes de esta cadena de transporte electrónico, como la ubiquinona y una oxidasa terminal de plástidos (PTOX), han sido identificados a partir de la caracterización de mutantes de *Arabidopsis* (*immutans*) y jitomate (*ghost*) (Carol y Kuntz 2001; Barr *et al.*, 2004).

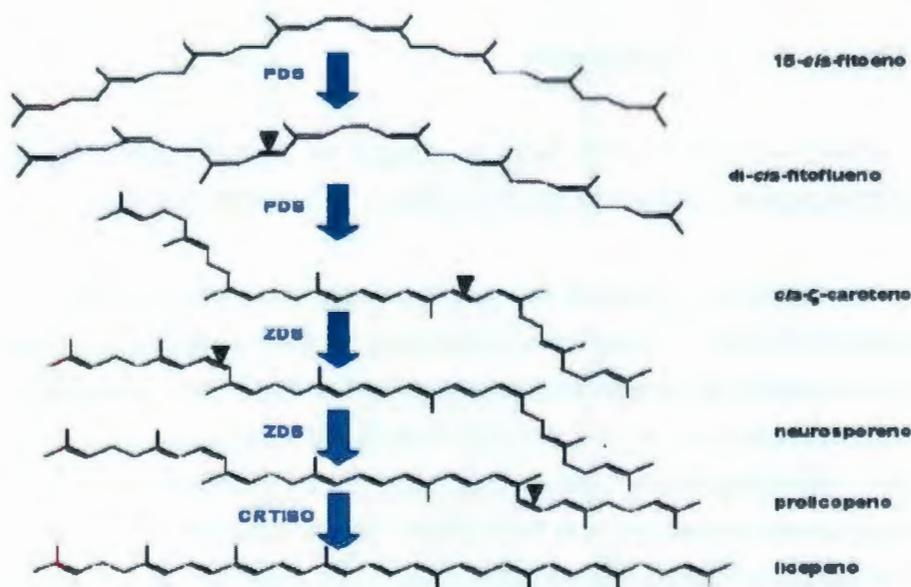


Figura 4: Esquema general de la biosíntesis de licopeno a partir de fitoeno. Propuesto por Breitenbach y Sandman, 2005. En Azul se indican las enzimas que catalizan cada reacción: PDS (fitoeno desaturasa), ZDS (ζ -caroteno desaturasa), CRTISO (Caroteno isomerasa).

1.4.2.3. Reacción de ciclación

La ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas superiores se bifurca en la ciclación del licopeno, dependiendo del tipo de ciclación que sufran los extremos de esta molécula (Figura 5). Pueden producirse dos tipos de anillos, ϵ - ó β , que únicamente difieren en la posición de un doble enlace en el anillo ciclohexano. El tipo de anillo producido depende de la enzima 'licopeno ciclasa' (LYC) que actúa sobre el extremo de la molécula. En plantas superiores se han identificado dos tipos de LCYs: β - LYC, que cataliza la formación de anillos β -, y ϵ - LYC que introduce anillos ϵ -. La enzima β - LYC puede actuar secuencialmente sobre ambos extremos de la molécula de licopeno dando lugar al β -caroteno, produciéndose γ -caroteno como intermediario. Sin embargo, ϵ - LYC únicamente puede introducir un anillo en uno de los extremos de la molécula de licopeno, originándose δ -caroteno. La acción de β - LYC sobre el extremo lineal del δ -caroteno da lugar al α -caroteno (Hirschberg 2001; Fraser y Bramley 2004; Boubier *et al.*, 2005), únicamente en algunas especies de lechuga (*Lactuca sativa*) se ha descrito la existencia de una ϵ - LYC capaz de introducir dos anillos ϵ - en ambos extremos de la molécula de licopeno, generándose lactucaxantina (Cunningham y Gantt 2001).

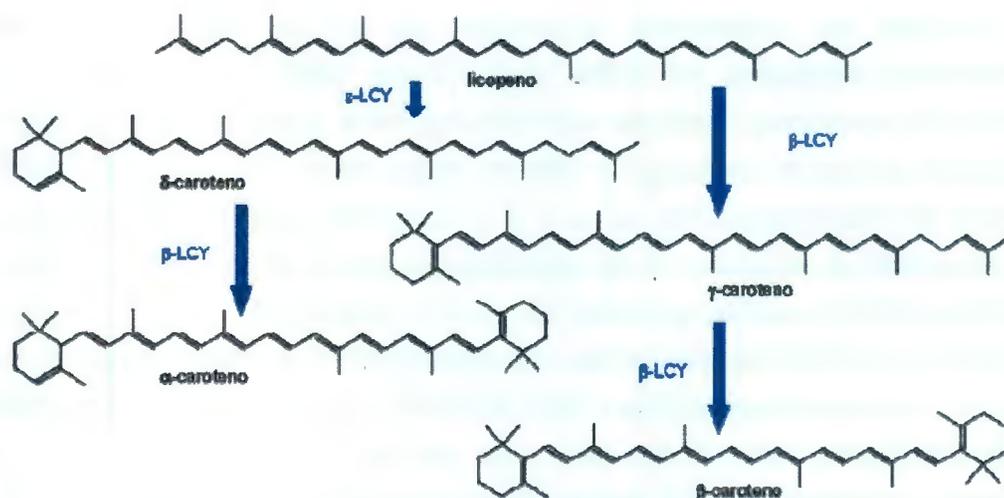


Figura 5: Esquema general de la ciclación del licopeno. (Propuesto por Fraser y Bramley, 2004). En azul se indican las enzimas que catalizan cada reacción: β - LYC (β -licopeno ciclasa), ϵ - LYC (ϵ -licopeno ciclasa).

Genes que codifican enzimas β -LYCs han sido identificados en jitomate, zanahoria, tabaco, diversas especies de cítricos y pimiento, entre otras plantas superiores, presentando todas ellas un porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos de al menos el 78%. Las proteínas maduras presentan un sitio de unión a dinucleótido (FAD/NADH) que parece estar implicado en su activación alostérica (Hornero-Mendez y Britton 2002) y dos motivos conservados característicos de este tipo de enzimas (Hugueney *et al.*, 1995). En jitomate se han descrito la existencia de una segunda β -LYC (β -LYC2) específica de tejido cromoplástico, que es 53% idéntica a nivel de aminoácidos a la β -LYC canónica (Ronen *et al.*, 2000). Es interesante mencionar que β -LYC2 muestra mayor identidad de secuencia con la capsantina-capsorubina sintasa (CCS) de pimiento, una enzima bifuncional que cataliza la formación de capsantina y capsorubina (carotenoides específicos de pimiento) a partir de anteraxantina y violaxantina, respectivamente, y que además posee actividad β -LYC (Hugueney *et al.*, 1995).

1.4.2.4. Síntesis de xantofilas

Las xantofilas son carotenoides oxigenados que en los frutos se encuentran habitualmente esterificados con ácidos grasos (Gross 1987). El α -caroteno y el β -caroteno son modificados, mediante oxidación enzimática, produciéndose xantofilas. La hidroxilación secuencial en los C-3 y 3' de los anillos del α - y el β -caroteno resulta la formación de luteína y zeaxantina, vía α - y el β -criptoxantina, respectivamente (Figura 6). La hidroxilación de los anillos β - es catalizada por acción de la enzima β -caroteno hidroxilasa (β -CHX), mientras que sobre los anillos ϵ - actúa ϵ -CHX. Los tipos de origen y las funciones de CHXs de plantas han sido revisados (Tian y DellaPenna 2004; Inoue 2004). En *Arabidopsis thaliana* (Tian y DellaPenna 2001), pimiento (Bouvier *et al.*, 1998) y jitomate (Hirschberg 2001) se han identificado dos genes que codifican β -CHX y, en *Arabidopsis existens* indicios de la presencia de una tercera β -CHX (Tian *et al.*, 2003). En jitomate, una de las isoformas β -CHX se expresa en tejido verde, mientras que la otra parece ser específica de tejidos cromoplásticos (Hirschberg 2001; Galpaz *et al.*, 2006). Las enzimas β -CHX son monooxigenasas dependientes de ferredoxina, caracterizadas por una serie de residuos de histidina, indispensables para su actividad catalítica, y con

posible localización trans-membranal. La enzima ϵ -CHX es una monooxigenasa dependiente de citocromo P-450 que hasta la fecha únicamente ha sido caracterizada en *Arabidopsis* (Tian y DellaPenna, 2004).

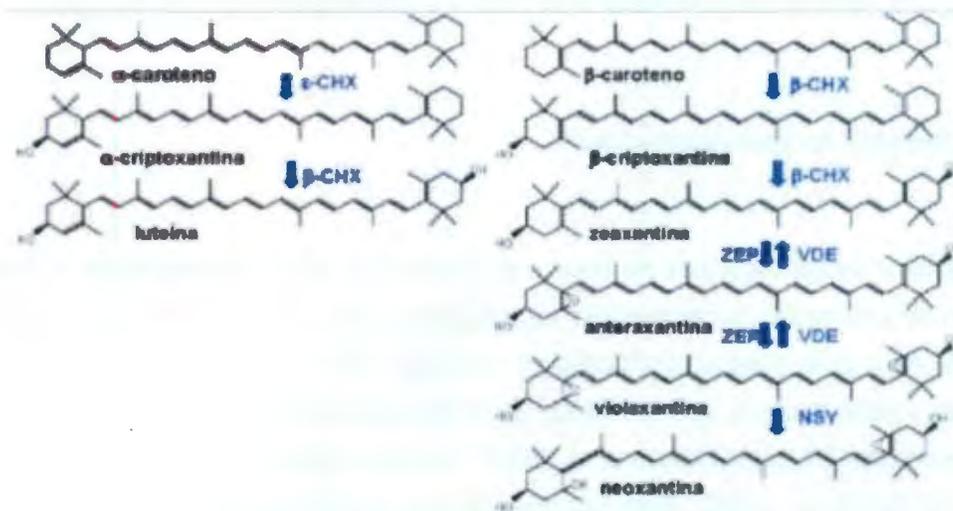


Figura 6: Esquema general de la biosíntesis de xantofilas. (Propuesto por Fraser y Bramley, 2004). En azul se indican las enzimas que catalizan cada reacción: β -CHX (β -caroteno hidroxilasa), ϵ -CHX (ϵ -caroteno hidroxilasa), ZEP (zeaxantina epoxidasa), VDE (Violaxantina de-epoxidasa), NSY (neoxantina sintasa).

La luteína es el producto final de la rama β, ϵ - de la ruta de biosíntesis de carotenoides, mientras que las xantofilas de la rama β, β - sufren modificaciones adicionales (Figura 6). La introducción secuencial, catalizada por la zeaxantina epoxidasa (ZEP), de grupos epoxi en posiciones C-5,6 y C-5', 6' de la zeaxantina da lugar a la formación de anteraxantina y violaxantina. Esta secuencia de reacciones es reversible, y la violaxantina puede ser reconvertida a zeaxantina mediante de-epoxidación catalizada por VED (violaxantina de-epoxidasa) (Figura 6). Este conjunto de reacciones reversibles se engloba bajo el nombre de 'ciclo de las xantofilas' (Gross 1987; Demmig Adams *et al.*, 1996). Genes que codifican ZEP y VDE han sido identificados en distintos vegetales (Fraser y Bramley 2004; Bouvier *et al.*, 2005). Tanto ZEP como VDE son una clase de proteínas con estructura de barril- β que interacciona con pequeñas moléculas hidrofóbicas. La actividad enzimática ZEP es dependiente de FAD y Ferredoxina, mientras que VDE requiere ascorbato para su actividad.

La enzima neoxantina sintasa (NSY) cataliza la conversión de violaxantina a neoxantina, la última xantofila de la rama β , β - de la ruta de biosíntesis de carotenoides (Figura 6). Se han clonado genes que codifican enzimas con reducida actividad NSY *in vitro* de jitomate (Bouvier *et al.*, 2000), papa (al-Babili *et al.*, 2000) y *Arabidopsis* (North *et al.*, 2007).

1.4.2.5. Síntesis de apocarotenoides

El mecanismo bioquímico que conduce a la producción de apocarotenoides es el corte oxidativo de una molécula carotenoides. La naturaleza de estas reacciones aún no ha sido elucidada para cada caso en particular, sin embargo, cada vez más evidencias sugieren que están catalizadas por una familia de proteínas denominadas *carotenoides* *dioxygenases* de corte de carotenoides (CCDs) (Guiliano *et al.*, 2003, Cámara y Bouvier, 2004, Lewinsohn *et al.*, 2005; Aldridge *et al.*, 2006). Este tipo de enzimas parecen tener alta especificidad en cuanto al punto de corte en el carotenoides. En *Arabidopsis*, azafrán, jitomate, uva y melón se han caracterizado CCDs específicas del enlace 9-10 (Schwartz *et al.*, 2001; Bouvier *et al.*, 2003a; Simkin *et al.*, 2004a; Mathieu *et al.*, 2005; Ibdah *et al.*, 2006). También en azafrán se ha caracterizado una CCD con punto de corte específico en los enlaces 7-8 y 7'-8' que utiliza zeaxantina como sustrato (Bouvier *et al.*, 2003a). En *B. orellana* se ha aislado una CCD que cataliza el corte del licopeno en las posiciones 5-6 y 5'-6' (Bouvier *et al.*, 2003a).

La subfamilia de CCDs que cataliza el corte, en el doble enlace 11-12, de C_{40} -9-*cis*-epoxycarotenoides se denomina NCEDs (del inglés *nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenases*). En plantas superiores las NCEDs catalizan la ruptura de 9'-*cis*-neoxantina y/o 9'-*cis*-violaxantina, produciendo xantoxina, compuestos de C_{15} precursor directo del ABA. Estudios de sobreexpresión y mutantes defectivos de NCEDs en tabaco, jitomate, chícharo y *Arabidopsis* han puesto de manifiesto la naturaleza limitante de la reacción catalizada por estas enzimas en la biosíntesis de ABA (Taylor *et al.*, 2005).

1.4.2.6. Apocarotenos

Los apocarotenos son compuestos derivados de la acción oxidativa de enzimas del tipo dioxigenasas sobre los carotenoides; dichas enzimas catalizan la ruptura de los dobles enlaces de una gran variedad de carotenoides originando moléculas más pequeñas y con características muy diferentes a las del compuesto precursor (Bao-Cai *et al.*, 2001; Linting y Vogt, 2004; Snowden *et al.*, 2005; Guiliano *et al.*, 2003; Schwartz *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2004; Simkin *et al.*, 2004). Los primeros trabajos que se realizaron acerca de este particular grupo de enzimas dioxigenasas, estuvieron dirigidos a elucidar el mecanismo de biosíntesis del ácido abscísico (ABA) a partir del rompimiento oxidativo 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 homóloga en frijol, la PvNCED1 (Qin y Zeevart, 1999). En estudios recientes se han identificado nuevas dioxigenasas cuyos sustratos son los carotenoides, por lo que se han denominado enzimas CCDs ó enzimas de corte de carotenoides, (Carotenoid Cleavage Dioxygenases). De esta forma, en *Arabidopsis*, se identificaron dos CCDs involucradas en la biosíntesis de un compuesto relacionado con la inhibición de las ramificaciones laterales en el meristemo axilar (Schwartz *et al.*, 2004).

Bouvier *et al.*, (2003) demostraron en *Escherichia coli* los pasos involucrados para sintetizar bixina. Así usando la cepa recombinante de *E. coli* para producir licopeno, la co-transformaron con tres enzimas: licopeno dioxigenasa (BoLCD); la cual lleva a cabo el rompimiento de dos dobles enlaces en las posiciones 5 y 6 del licopeno para dar lugar a la formación de bixina aldehído; la segunda enzima es una bixina aldehído deshidrogenasa (BoBADH); que conlleva a la síntesis de norbixina, y, finalmente mediante la acción de la tercera enzima norbixina metil transferasa (BonBMT), enzima que convierte la norbixina en un compuesto idéntico a la bixina natural y trazas de bixindimetil ester, de esta forma se obtuvo la síntesis de bixina en este organismo heterólogo (Figura 7).

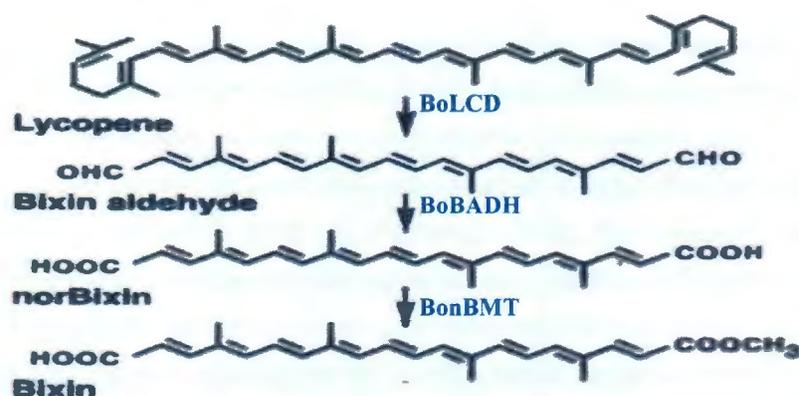


Figura 7. Esquema de la biosíntesis de bixina. (Propuesta por Bouvier *et al.*, 2003). En azul se indican las enzimas que catalizan cada reacción: BoLCD, licopeno bixina dioxigenasa; BoBADH, bixina aldehído deshidrogenasa; BonBMT, norbixina metiltransferasa.

1.5. Síntesis y acumulación de carotenoides

1.5.1. Regulación de la síntesis y acumulación de carotenoides en frutos

En frutos, los carotenoides pueden acumularse en distintos tipos de plástidos, siendo los más característicos los cloroplastos y los cromoplastos. Los cloroplastos son abundantes durante los estadios inmaduros de los frutos, transformándose durante la maduración del fruto en cromoplastos. Durante esta transformación las membranas tilacoidales se desintegran, las clorofilas y la mayor parte de los componentes de los complejos fotosintéticos desaparecen, y se produce una acumulación masiva de carotenoides en los cromoplastos. En los plástidos el contenido de carotenoides puede regularse a cuatro niveles:

- 1) Mediante la formación de estructuras capaces de almacenar/estabilizar los carotenoides (Vishnevetsky *et al.*, 1999 y Li *et al.*, 2001)
- 2) Mediante regulación de la transcripción de los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides

- 3) Mediante la regulación postranscripcional de las enzimas implicadas en la biosíntesis de carotenoides
- 4) Mediante el catabolismo de carotenoides (Fraser y Bramley 2004; Howitt y Pogson 2006).

1.5.2. Catabolismo de los carotenoides

Genes que codifican enzimas CCDs han sido recientemente caracterizados en frutos de jitomate (Simkin *et al.*, 2004a), uva (Mathieu *et al.*, 2005), melón (Ibdah *et al.*, 2006) y algunos cítricos (Kato *et al.*, 2006; Agustí *et al.*, 2007). Los genes *ccd1* de jitomate, melón y cítricos se inducen durante la maduración de los frutos y están implicados en la formación de apocarotenoides volátiles importantes para el aroma, como la β -ionona (Simkin *et al.*, 2004a; Mathieu *et al.*, 2005; Ibdah *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2006). Las enzimas *ccd1* catabolizan varios carotenoides, tanto cíclicos como lineales, sin embargo, parece que su actuación no determina el nivel final de carotenoides acumulados en su tejido (Simkin *et al.*, 2004a; Kato *et al.*, 2006). En crisantemo se ha identificado un gen, *ccd4a*, cuyos niveles de expresión correlacionan inversamente con el contenido de carotenoides de los pétalos (Ohmiya *et al.*, 2006). La expresión de *ccd4a*, en los pétalos conduce a la degradación de los carotenoides sintetizados, presentando el tejido color blanco debido a la práctica ausencia de carotenoides, presentando los pétalos color amarillo. En frutos cítricos se han identificado dos genes ortólogos de *ccd4*, sin embargo, se desconoce la función de la proteína que codifican (Agustí *et al.*, 2007).

1.6. Marcadores morfológicos

Existen dos clases de marcadores que nos interesan si se piensa en el fito-mejoramiento del cultivo del achiote: los morfológicos y los genéticos - moleculares (Tanksley 1983). En primer orden, la caracterización e identificación tradicional de variedades se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos (Rallo *et al.*, 2002). No obstante, el uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión está sujeta a factores ambientales o fenológicos; por ejemplo la presencia o

ausencia de espinas en los cítricos. Con frecuencia es posible evaluar los marcadores ambientales o fenológicos a nivel de toda la planta y cuando esta llega a su estado adulto. Para la gran mayoría de frutales tropicales esto significa una espera, no deseable, de varios años. Además, pueden ocurrir cambios epigenéticos que limitan el número de marcadores que pueden ser evaluados sin equivocación en la población segregante (Powell 1992; Phillips *et al.*, 1995). Arce (1999) identificó las siguientes características morfo-agronómicas en *B. orellana*, dentro de las cuales se encuentran: color de la flor, tamaño (longitud y ancho), densidad de espinas y color de la cápsula, número promedio de semillas por cápsula, contenido de bixina, dehiscencia (apertura de la cápsula en la madurez) o indehiscencia (la cápsula en la madurez permanece cerrada), así como disposición de las cápsulas en la planta y tamaño de la misma (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008). Los caracteres morfo-agronómicos mencionados para efecto del mejoramiento genético, deberán evaluarse en los individuos de *B. orellana* en función al rendimiento (preferentemente contenido de bixina) e indehiscencia de la cápsula, debido a que la exposición directa del arilo de las semillas a la radiación solar, disminuye el contenido de bixina (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Sin embargo, Medina *et al.*, (2001) sugieren que igualmente, la densidad y longitud de las espinas, deben ser criterio de selección en los parentales, debido a que la baja densidad de las espinas y espinas cortas, facilita la cosecha manual de las cápsulas, tal como se presenta en el estudio hecho por Valdez-Ojeda *et al.*, 2008.

1.6.1. Los marcadores genéticos-moleculares

Gracias a los avances en la biología molecular se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que superan, en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales. Actualmente la mayoría de los estudios genéticos utilizan técnicas que analizan el ADN, pues los segmentos de ADN que se analizan, suelen estar menos influidos por factores ambientales, proporcionan estimaciones con mayor precisión que permiten realizar comparaciones entre organismos a nivel intra e inter específicos.

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente. Se puede considerar que cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso sea un marcador. Los marcadores idóneos son los de ADN, siendo válido cualquier fragmento que se encuentre muy cerca del gen o de la secuencia de interés y que lógicamente no afecte al carácter en estudio (Sidta 1999). Para Valadez y Kahl (2000) un marcador se refiere a cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía, y definen un marcador genético como cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente. Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos.

Las técnicas empleadas para tales análisis son muy diversas, y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards 1998). Algunos ejemplos de marcadores codominantes son los Polimorfismos de la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) y los Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR). Ejemplos de marcadores dominantes son la Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD), el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP), Amplificación Aleatoria del Polimorfismo de Microsatélites (RAMPO) (Rallo *et al.*, 2002).

Recientemente se han desarrollado varias metodologías para estudios de la genética y biología molecular de *B. Orellana*, caracterizado algunos de los genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides y bixina de esta planta para su uso como herramienta en el mejoramiento de la producción de achiote (Narváez *et al.*, 2001; Jaco *et al.*, 2002; Bouvier *et al.*, 2003; Guiliano *et al.*, 2003). Las propiedades que presenta *B. orellana* han motivado el desarrollo de estrategias que permitan la mejora genética de este cultivo.

En trabajos previos de investigación en genética-molecular de achiote, se estableció el uso de marcadores moleculares SRAP's Polimorfismo Amplificado de Secuencias Relacionadas (Sequence-Related Amplified polymorphism) en *B. orellana*, para su caracterización genética (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008), facilitando su empleo en estudios

genético-moleculares para el mejoramiento genético de esta especie, tales como la selección de germoplasma élite, medición de la tasa de entrecruzamiento y la obtención de una mapa genético preliminar de esta especie.

1.6.2. Técnica Polimorfismo de Conformación de la Cadena Sencilla

Los fragmentos producidos por la amplificación por PCR o por digestión de ADN con REs (Restriction enzymes) son clasificados de acuerdo a su tamaño y/o conformación por electroforesis en gel. A pH neutro el enlace azúcar-fosfato del ADN se encuentra negativamente cargado, causando que la molécula migre a través de un campo eléctrico. El medio de gel empleado, agarosa o poliacrilamida, forma una densa matriz a través de la cual los fragmentos pequeños pueden moverse más fácilmente que los fragmentos largos. Para cadenas de ADN dobles, la distancia de migración es típicamente proporcional al logaritmo del peso molecular. Los fragmentos de tamaños conocidos son empleados en el gel para actuar como señales internas de comparación con los cuales otros fragmentos son estimados por interpolación de una curva de calibración. Sin embargo, la migración de los fragmentos a través de un gel neutro de poliacrilamida es afectada también por la conformación de los mismos (estructura secundaria), esto de acuerdo a Singh y colaboradores (1987). Las hebras simples o parcialmente desnaturalizadas de ADN, migran más lentamente que las de doble cadena. La movilidad de la cadena sencilla de ADN, depende de las pautas de plegamiento o re-naturalización. Esas propiedades proveen las bases para la detección de heteroduplex, SSCP, y usando gradientes de desnaturalización química (ejemplo urea) temperatura, para el método DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

SSCP es la separación electroforética de una sola hebra ácidos nucleicos basada en sutiles diferencias en la secuencia (a menudo un solo par de bases) que se traduce en una estructura secundaria y una diferencia medible en la movilidad a través de un gel. La movilidad de la doble cadena de ADN en electroforesis en el gel depende tamaño y longitud de la cadena, pero es relativamente independiente de la secuencia particular de

nucleótidos. La movilidad de las hebras individuales (ADN de cadena sencilla), sin embargo, son notablemente afectadas por pequeños cambios en la secuencia de nucleótidos. Estos pequeños cambios son notables debido a la naturaleza relativamente inestable de la cadena sencilla de ADN, en ausencia de una hebra complementaria, la hebra única puede experimentar plegamientos de pares de bases, resultando en lazos y pliegues que dan a la hebra una estructura 3D única, independientemente de su longitud. Un cambio de nucleótido podría afectar dramáticamente a la movilidad de la hebra sencilla a través de un gel, por alterar plegamientos de pares de bases y su consiguiente conformación 3D (Melcher, 2000). Es decir, esta conformación sería dependiente de la hibridación entre distintas regiones de un segmento de ADN replegado sobre sí mismo.

En los análisis SSCP se toma ventaja de esta cualidad de la cadena sencilla de ADN. En 1989 se anunció por primera vez a la técnica SSCP como un nuevo medio de la detección de polimorfismos de ADN, o variaciones de secuencias (Orita *et al.*, 1989), además la técnica SSCP ofrece un método de análisis económico, conveniente y sensible para determinar la variación genética (Sunnucks *et al.*, 2000). La técnica de SSCP permite una evaluación de la variación interpoblacional, ya que permite realizar un estudio de mayor resolución (Orita *et al.*, 1989; Lessa y Applebaum, 1993) por la posibilidad del análisis a nivel de secuencias. La metodología de SSCP detecta estructuras secundarias de ADN de cadena sencilla, para la evaluación de polimorfismos en diferentes marcadores o fragmentos específicos, mediante la desnaturalización de ADN de doble cadena a 95° C y su inmediata reestructuración a 4° C, en la que se presenta la conformación de estructuras secundarias de cadena sencilla (Orita *et al.*, 1989).

Una vez detectados los polimorfismos o variantes del fragmento, éstos pueden secuenciarse y presentan la ventaja de que se pueden conocer las secuencias de toda una colección de organismos sin el costo de la secuenciación particular de cada fragmento de todos los individuos de cada muestra (Sunnucks *et al.*, 2000). La sensibilidad de SSCP se ve afectada por el pH. Fragmentos de Doble cadena de ADN suelen ser desnaturalizados por la exposición a condiciones básicas. Kukita *et al.*, (1997) reportaron que la adición de glicerol al gel de poliacrilamida reduce el pH de la

electroforesis de amortiguación - más concretamente, el amortiguador de Tris-borato - y el resultado es una mayor sensibilidad y claridad de los datos SSCP. La longitud de los fragmentos también afecta el análisis de SSCP para unos resultados óptimos, el tamaño del fragmento de ADN debe estar dentro del rango de 150 a 300 pb, aunque el análisis de SSCP ARN permite un mayor tamaño de fragmento (Wagner, 2002). Aplicar glicerol en el gel, también puede permitir que un fragmento de ADN más grande en tamaño presente una sensibilidad aceptable (Kukita *et al.*, 1997), siendo los fragmentos amplificados por PCR para secuencias del gen *ccd* de alrededor de 500 pb. En condiciones óptimas, de aproximadamente de 80 a 90% de cambios de base potenciales son detectables por SSCP (Wagner, 2002).

1.6.3. Empleo de cebadores para secuencias de genes fitoeno desaturasa y carotenoide dioxigenasas

El interés en el uso de cebadores específicos para obtener amplificaciones de secuencias de los genes *pds* y *ccd*, se debe a que, en las plantas superiores como es el caso de *B. orellana*, la síntesis de licopeno a partir de 15-*cis*-fitoeno, conlleva cuatro desaturaciones sucesivas catalizadas por dos enzimas, la PDS y ZDS; siendo la enzima PDS la que introduce dos dobles enlaces en los carbonos 11 y 11' de la molécula de fitoeno, precursor de todos los carotenoides. La importancia de la enzima CCD radica en que el mecanismo bioquímico que conduce a la producción de apocarotenoides es el corte oxidativo de una molécula de carotenoides de 40 Carbonos; ya que existen evidencias que sugieren que dichos procesos están catalizados por una familia de proteínas denominadas dioxigenasas de corte de carotenoides (CCDs). Guiliano *et al.*, 2003, Cámara y Bouvier, 2004, Lewinsohn *et al.*, 2005; Aldridge *et al.*, 2006). Este tipo de enzimas parecen tener alta especificidad en cuanto al punto de corte en el carotenoide. Ejemplo de ello es una CCD que cataliza el corte del licopeno en las posiciones 5-6 y 5'-6' que ha sido aislada de *Bixa orellana* L. (Bouvier *et al.*, 2003), produciéndose un aldehído central que dará origen a la bixina. Por lo tanto, PDS y CCD son enzimas importantes dentro de la síntesis de pigmentos.

1.7. JUSTIFICACIÓN

El achiote (*Bixa orellana* L.), es un cultivo originario de América tropical, de gran demanda comercial en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética a nivel mundial, con grandes posibilidades de producción en el país, gracias a su gran adaptabilidad y amplia gama de condiciones agroecológicas. Debido a la extensa variación que presenta *Bixa orellana* en cuanto a rendimiento y calidad de pigmento producido en las distintas variantes agronómicas, puesto que el cultivar de achiote no se ha sometido a un programa de mejoramiento sistemático, nuestro grupo de trabajo se ha enfocado a la selección de plantas de achiote con alto rendimiento de bixina y características que favorezcan el incremento de la producción de bixina en las semillas, tales como cápsulas indehiscentes, mayor número de semillas por cápsula y mayor cantidad de pigmento por semilla.

Los marcadores moleculares no se habían empleado para analizar la variabilidad genética de *Bixa orellana*, sin embargo en estudios recientes realizados por Valdez-Ojeda *et al.*, (2008), en nuestro grupo de trabajo, se emplearon por primera vez marcadores moleculares SRAP (Polimorfismo de Amplificación de las Secuencias Relacionadas) en la caracterización genética de este cultivar, enmarcados en la base de un mejoramiento genético de este cultivo. Nuestro interés actual es poder desarrollar marcadores moleculares asociados a producción de carotenoides y bixina como herramientas para la selección de plantas con características agronómicas deseables para pigmentos a nivel comercial, por ello éste estudio se enfocó en la obtención de marcadores moleculares específicos de genes involucrados en la síntesis de carotenoides, como el gen fitoeno desaturasa (*pds*), gen licopeno β -ciclase (*β -lyc*) y gen carotenoide dioxigenasa (*ccd*), reportados como genes clave en la síntesis de carotenoides tanto en achiote como en otros cultivos, mediante la técnica de SSCP (Polimorfismo de conformación de cadena sencilla), como herramienta para estudiar la variación genética observada en achiote, la identificación de nuevos alelos relacionados con la síntesis y acumulación de pigmentos, así como la detección temprana de plantas promisorias en la acumulación de pigmentos.

1.8. HIPÓTESIS

Si existe variación a nivel de secuencias en los genes *pds*, *b-lyc* y *ccd*, involucrados en la síntesis de carotenoides en *Bixa orellana* L., estos pueden ser empleados como herramientas para el desarrollo de marcadores moleculares asociadas a plantas productoras de carotenoides.

1.9. OBJETIVOS

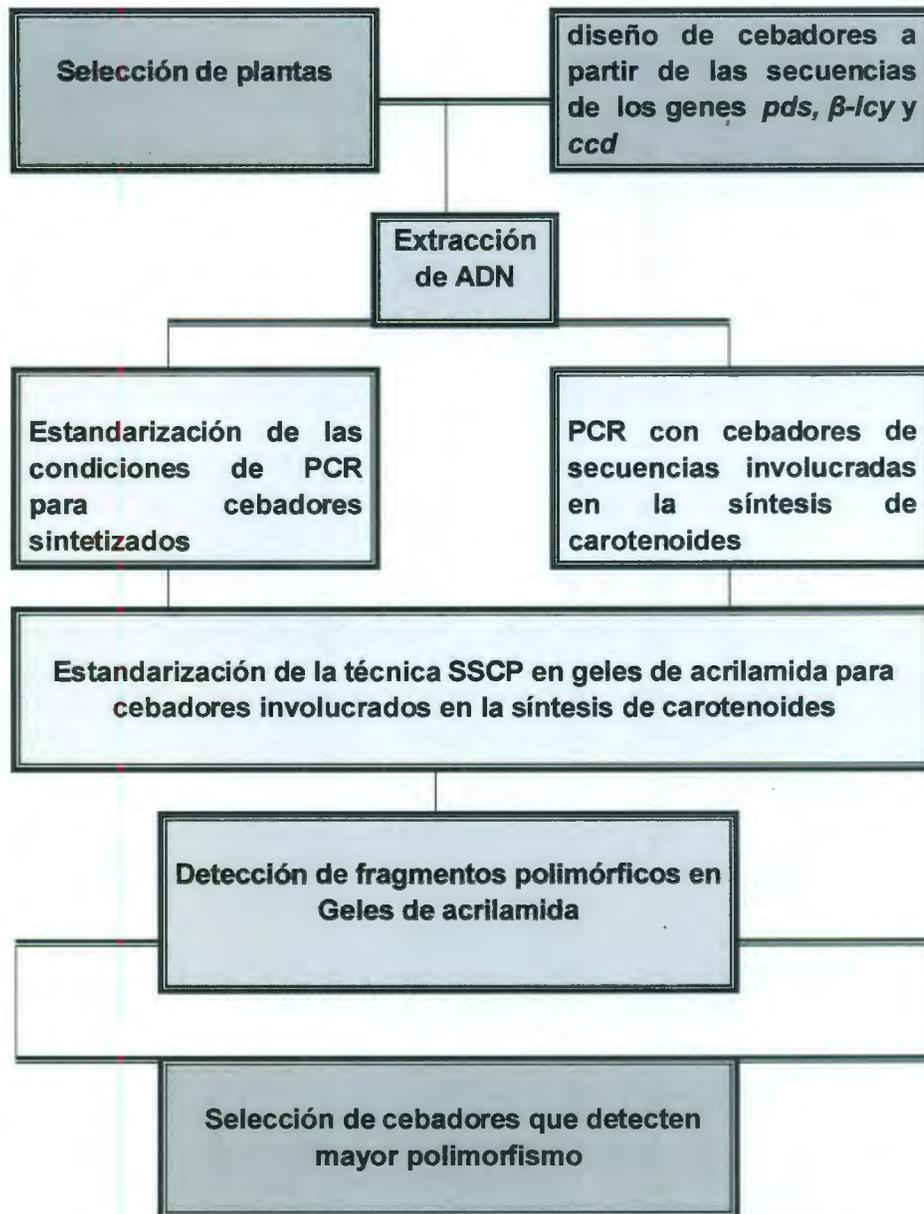
1.9.1. Objetivo general

Identificar la variación genética presente en los genes fitoeno desaturasa (*pds*), la licopeno β -ciclase (*β -lyc*) y carotenoide dioxigenasa (*ccd*), clave en la síntesis y acumulación de carotenoides y bixina en achiote, mediante el desarrollo y la aplicación de la técnica SSCP, para eventualmente ser empleados como marcadores moleculares de pigmentos.

1.9.2. Objetivos específicos

- Seleccionar y caracterizar los fenotipos más contrastantes de achiote en cuanto a su contenido de bixina, color de flor y fruto.
- Diseñar cebadores a partir de las secuencias de genes clave en la biosíntesis de carotenoides, como fitoeno desaturasa (*pds*), Licopeno β -ciclase (*β -lyc*) y carotenoide dioxigenasa (*ccd*).
- Estandarizar las condiciones de PCR para cebadores que amplifican secuencias de los genes *pds*, *β -lyc* y *ccd* en achiote.
- Estandarizar la técnica de Polimorfismo de Conformación de la Cadena Sencilla (SSCP) en *Bixa orellana*, para las secuencias de genes clave involucrados en la síntesis de carotenoides y bixina.
- Identificar la variación genética presente en los genes *pds*, *β -lyc* y *ccd* involucrados en la síntesis de carotenoides y bixina.
- Detectar y analizar los perfiles de bandeo SSCP's generados a partir del uso cebadores específicos para las secuencias de los genes *pds*, *β -lyc* y *ccd* en las distintas variantes morfológicas de achiote.

1.10. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



REFERENCIAS

- Agustí, J., Zapater, M., Iglesias, D. J., Cercós, M., Tadeo, F. R., y Talón, M. (2007). Differential expression of putative 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenases and abscisic acid accumulation in water stressed vegetative and reproductive tissues of citrus. *Plant Sci.*, 72(1), 85-94.
- al-Babili S, von Lintig J, Haubruck H, Beyer P. (1996). A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is Hsp70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation. *Plant J* 9, 601-612.
- Aldridge ME, McCarty DR, Klee HJ. (2006). Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol.* 9, 315-321
- Arce, J. (1999). El achiote *Bixa orellana* L. Cultivo promisorio para el trópico. In, Earth, first (ed). Turrialba, Costa Rica, p. 149.
- Balam, E. (2003). Metodología preliminar de polinización controlada en achiote (*Bixa orellana* L.). Tesis Profesional. Instituto Tecnológico Agropecuario N° 2, Conkal Yuc., pp. 3-20.
- Bao-Cai T, Schwartz SH, Zeevart JAD, McCarty DR. (1997). Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 12235-12240.
- Bao-Cai T, Cline K, McCarty DR. (2001). Localization and targeting of the VP14 epoxycarotenoid dioxygenase to chloroplast membranes. *Plant J.* 27, 373-382.
- Barr J, White WS, Chen L, Bae H, Rodermel S. (2004). The GHOST terminal oxidase regulates developmental programming in tomato fruit. *Plant Cell Environ.* 27, 840-852.
- Botella-Pavia P, Rodríguez-Concepción M, (2006). Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Plant Physiol* 126, 369-381.
- Bouvier, F., R.A. Backhaus, and B. Cámara. (1998). Induction and Control of Chromoplast-specific Carotenoid Genes by Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 273, 30651-30659.
- Bouvier, F., d'Harlingue, A., Backhaus, R. A., Kumagai, M. H., y Cámara, B. (2000). Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *Eur. J. Biochem.*, 267 (21), 6346-6352.
- Bouvier F, Dogbo O, Cámara B. (2003). Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annato). *Science* 300, 2089-2091.
- Bouvier, F., Dogbo, O., y Cámara, B. (2003a). Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment Bixin (annato). *Science*, 300, 2089-2091.

- Bouvier, F., Rahier, A., Cámara, B. (2005), Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog. Lipid Res.*, 44, 357-429.
- Breitenbach, J., and G. Sandmann. (2005). *zeta*-Carotene *cis* isomers as products and substrates in the plant poly-*cis* carotenoid biosynthetic pathway to lycopene. *Planta* 220, 785-793.
- Cámara, B. y Bouvier, F. (2004). Oxidative remodeling of plastids carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 430(1),16-21.
- Carol P, Kuntz M. (2001). A plastid terminal oxidase comes to light, implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends Plant Sci* 6, 31–36.
- Collins, A. (2001). Carotenoids and genomic stability. *Mutat. Res.* 475, 1-28.
- Cuadra, J. (1994). Los carotenoides pintan bien. *Tecno industria.* 17, 24-27.
- Cunningham, F.X. (2002). Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure Appl. Chem.* 74, 1409-1417.
- Cunningham. F.X., and E. Gantt. (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 557-583.
- Cunningham FX Jr, Gantt E (2001) One ring or two?, Determination of ring number in carotenoids by lycopene epsilon-cyclases. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 2905–2910
- Dafni, A. y M. Motte. (1998). A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. *Sex. Plant Reprod.* 11, 177-180.
- DellaPenna D, Barry J. Pogson BJ (2006) Vitamin synthesis in plants, tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology* 57, 711-738.
- Demming Adams, B., Gilmore, A. M. y Adams, W. W. (1996). Carotenoids.3. In vivo Functions of Carotenoids in higher plants. *FASEB.* 10(4), 403-412.
- Fraser P, Truesdale M, Bird C, Schuch W, Bramley P. (1995). The effect of reduced activity of phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from gibberellin pathway. 8,693-701
- Fraser PD, Kiano JW, Truesdale MR, Schuch W, Bramley PM. (1999). Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Mol. Biol.* 40, 687-698.
- Fraser PD and Bramley PM (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* 43, 228-265.
- Galpaz, N., Ronen, G., Khalfa, Z., Zamir, D., y Hirschberg, J. (2006).. A chloroplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato White-flower locus. *Plant Cell*, 18(18), 1947-1960.

- Giovannucci, E. (2002). Lycopene and prostate cancer risk. Methodological considerations in the epidemiologic literature. *Pure Appl Chem* 74,1427-1434.
- Godoy, H. G. (2000). El achiote, una especie subexplotada. *Ciencia y Desarrollo*. 152, 34-39.
- Goodwin, T.W. (1983). Developments in carotenoid biochemistry over 40 years. *Biochem. Soc. Trans.*, 11(5), 473-483.
- Griffiths DW, Dale MF, Morris WL, Ramsay G. (2007). Effects of season and postharvest storage on the carotenoid content of *Solanum phureja* potato tubers. *J Agric Food Chem* 55, 379-385.
- Gross, J. (1987). *Pigments in fruits*. London, Academic Press.
- Grotewold E. (2006). The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 761-80
- Guiliano, G alibi., al-Babili, S. y Von Lintig, J. (2003). Carotenoid oxygenases, Cleave it or leave it. *Trends in Plants Sci.*, 8(4), 145-149.
- Harjes, Harjes C., Torbert R. Rocheford, Ling Bai., Thomas P. Brutnell, Catherine Bermudez Kandianis, Stephen G. Sowinski, Ann E. Stapleton, Ratnakar Vallabhaneni, Mark Williams, Eleanore T. Wurtzel, Jianbing Yan, Edward S. Buckler. (2008). Tapped for Maize Biofortification Natural Genetic Variation in Lycopene *Epsilon Science*, 319, 330
- Heywood, V. *Flowering plants of the world*. New York, Oxford University Press. 1993. 426p.
- Hirschberg J (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin, Plant Biol.* 4, 210-218
- Hornero-Mendez D, Britton G (2002). Involvement of NADPH in the cyclization reaction of carotenoid biosynthesis. *FEBS Lett* 515, 133-136
- Howitt, C.A. y Pogson, B. J. (2006). Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment*, 29(3), 435-455.
- Huang, Z., J. Zhu., X. Mu., J. Lin. (2004). Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. *Ann. Bot.* 93, 295-301.
- Huguene, P, A. Badillo, H.C. Chen, A. Klein, J. Hirschberg, B. Cámara, and M. Kuntz. (1995). Metabolism of cyclic carotenoids, a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplast. *Plant J.* 8,417-424.
- Ibdah, M., Azulay, Y., Portnoy, V., Wasserman, B., Bar, E., Meir, A., Burger, Y., Hirschberg, J., Schaffer, A. A., y Katzir, N. (2006). Funcional Characterization of

- CmCCD1, a carotenoide Cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry*, 67 (15), 1579-1589.
- Inoue, K. (2004). Carotenoid Hydroxylation –P450 finally! *Trends Plant Sci.*, 9(11), 515-517
- Isaacson T, Ronen G, Zamir D, Hirschberg J (2002) Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell* 14, 333–342
- Izco J., E. Barreno., M. Brugués., M. Costa., J.A. Devesa., F. Fernández, T. Gallardo., X. Limona., C. Prada., S. Talavera y B. Valdés (2004). *Botánica 2ª Edición*. Subsidiary of the McGraw-Hill companies. ISBN, Madrid España. pp. 4-609.
- Jaco 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. *J. Plant Sci.* 163, 141-145.
- Karp, A., Edwards, K. (1998). ADN markers, a global overview. *In*, G. Caetano- Anollés, P.M. eds. ADN markers, protocols, aplicaciones and overviews. Gresshoff. New York. p. 1-13.
- Kato, M., Matsumoto, H., Ikoma, Y., Okuda, H., y Yano, M. (2006). The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation in citrus fruit. *J.Exp. Bot.*, 57 (10), 2153-2164.
- Kukita, Y. (1997), SSCP análisis de fragmentos de ADN de largo bajo el pH en el gel. *Mutación Humanos*. 10, 400-7.
- Lange BM, Ghassemian M. (2003). Genome organization in *Arabidopsis thaliana*, a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol Biol.* 51, 925-948.
- Lessa, E.P. y Applebaum, G, (1993) Screening techniques for detecting allelic variation in ADN sequences. *Molecular Ecology* 2(2),119-129.
- Lewinsohn, E, Sitrit, Y, Bar, E, Azulay, Y, Ibdah, M. Mier, A. Yosef, E. Zamir, D. y Tadmor, Y. (2005). Non just colors-carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma in tomato and watermelon fruit. *Trends in food science and Technology*, 16 (9), 407-415.
- Li, L., Paolillo, D. J., Parthasarathy, M. V., Dimuzio, E. M., y Garvin, D. F. (2001). A novel gene mutation that confers abnormal patterns of β -carotene accumulation in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). *Plant J.*, 26(1), 59-67.
- Lintig J, Vogt K. (2004). Vitamin A formation in animals, Molecular identification and functional characterization of carotene cleaving enzymes. *J. Nutr.* 134, 251S-256S.
- Liu Y, Wang H, Ye HC, Li GF (2005) Advances in the plant isoprenoid biosynthesis pathway and its metabolic engineering. *J. Integ. Plant Biol.* 47, 769782.

- Mares-Perlman J.A., A.E. Millen., T.L. Ficek and S.E. Hankinson. (2002). The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. *J Nutr.* 132, 518-524.
- Márquez, W. Y S. Del Amo. (1982). El Achiote. Comunicado No.11 sobre recursos bióticos potenciales del país. Editado por el Instituto Nacional de investigaciones de recursos bióticos. México. pp. 1-4.
- Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F., y Guanta, Z. (2005). A carotenoid Cleavage Dioxygenase from *Vitis vinifera* L., functional Characterization and expression during grape berry development in relation to C-13 norisprenoid accumulation. *J. Exp. Bot.*, 56 (420), 2721-2731.
- Medina AM, Michelangeli C, Ramis C, Díaz A. (2001). Caracterización Morfológica de frutos de onoto (*Bixa orellana* L) y su correspondencia con patrones de proteínas e isoenzimas. *Acta Científica Venezolana* 52, 14-23.
- Melcher, Ulrich. SSCPS. 2003. [Http, //opbs.okstate.edu/melcher /MG/MGW1/ MG11129.html](http://opbs.okstate.edu/melcher/MG/MGW1/MG11129.html)>.
- Michelangeli, C., A.M. Medina, P ,Artioli., J.Mata. (2002). Microsporogénesis y micogametogénesis de onoto (*Bixa orellana* L). *Acta Cient Venz, ACV.* 53, 171-175.
- Morris WL, Ducreux L, Griffiths DW, Stewart D, Davies HV, (2004) Carotenogenesis during tuber development and storage in potato. *J Exp Bot* 55, 975–982.
- Narváez, J., P. Flores., Herrera-Valencia., E. Castillo., R. Ku-Cahuich., B. Canto-Canché., N. Santana-Buzzy., y R. Rivera-Madrid. (2001). Development of molecular techniques for the study the metabolism of carotenoids in the high pigment producer plant *Bixa orellana* L. *HortScience.* 36, 982-986.
- North, H. M., Almeida, A., Boutin, J. P. Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B., y Marion-Poll, A. (2007). The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *The Plant Journal*, 50 (5), 810-824.
- Ohmiya, A., Kishimoto, S., Aida, R., Yoshioka, S., y Sumitomo, K. (2006). Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in *Chrysanthemum* petals. *Plant Physiol.* p106.
- Okada, K., Saito, K., Nakagawa, T., Kawamukai, M., Kamiya, Y. (2000) Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in Arabidopsis. *Plant Physiology* 122, 10451056.
- Orita M., Iwahana H., Kanasawa H. Hayashi K. y Sekita T. (1989) Detection of polymorphisms of human ADN by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86,2766-2770.

- Paiva, V., T. Mota and W. Otoni. (2003). Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 80 (4), 32-38.
- Pecker I., R. Gabbay, F. X. Cunningham Jr., J. Hirschberg. (1996). *Plant Mol. Biol.* 30, 807.
- Phillips, W., Rodríguez, H., Fritz, P. (1995). Marcadores de ADN, Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico # 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. p 183.
- Plotkin, M. (1993). *Tales of a Shaman's apprentice*. New York, Penguin Books. 233p.
- Pogson B., K. A. McDonald, M. Truong, G. Britton, D. DellaPenna. (1996). *Plant Cell* 8, 16-27.
- Powell, W. (1992). Plant genomes, gene markers, and linkage maps. *In*, Moss, J. P. ed. *Biotechnology and crop improvement in Asia*. Patancheru, India. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. p. 297-322.
- Qin X, Zeevaart JAD. (1999). The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proc. Natl. Acad.*
- Rallo, P., Belaj, A., De La Rosa, R., Trujillo, I. (2002). Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España.
- Rivera-Madrid, R., R.M. Escobedo-GM, E. Balam- Galera, M. Vera-Ku, and H. Harries. (2006). Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). *Sci. Hort.* 109,165–172.
- Rodríguez, J., I. Peters and A. Couto. (2005b). Isozymic variability in a Brazilian collection of annatto (*Bixa orellana* L.) *Pesq. agropec. Brasil, Brasilia.* v.40, n.7, p 653-660.
- Rodríguez-Concepción M, Boronat A. (2002). Elucidation of the methyl erythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids, a metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology* .130, 1079–1089.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. & Sahm, H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria, A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* 295, 517-524.
- Romer, S. and P. Fraser. (2005). Recent advances in carotenoid biosynthesis regulation and manipulation. *Planta* 221, 305-308.
- Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D. and Hirschberg, J. (2000). An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of *Beta* (*B*) and *old-gold* (*og*) colour mutations in tomato. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97, 11102-11107.

- Sandmann G. (1994). Phytoene desaturase, Genes, enzymes and phylogenetic aspects. *J Plant Physiol* 143, 444-447
- Sandmann, G. (2001). Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 4-12.
- Sandmann, G. (2002). Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants. *Physiol. Plant* 116, 431-440.
- Sandmann G, Romer S, Fraser PD (2006). Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metab. Engin.* 8, 291-302.
- Schledz, M., Al-Bebili, S., v. Lintig, J., Haubruck, H., Rabbani, S., Kleinig, H. and Beyer, R. (1996). Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*, Functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering. *Plant J.* 10, 781-792.
- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD. (2001). Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *Biochem J.* 276, 208-25211.
- Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JAD, McCarty DR. (1997). Specific Oxidative cleavage of carotenoides by VP14 of Maize. *Science* 276, 1872-1874.
- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD. (2001). Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *Biochem J.* 276, 25208-25211.
- Schwartz, SH., X. Qin and JAD. Zeevaart. (2003) Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes and enzymes. *Plant Physiol* 131, 1591-1601.
- Schwartz SH, Qin X, Lowen MC. (2004). The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *Biochem J.* 279, 46940-46945.
- Sidta. 1999. Los marcadores moleculares en ingeniería genética y en mejora vegetal. España. Disponible en, [http://www.jcyl.es/jcyl/cag/dgiadr/svidta/boletin/dic99/bold.html# los%20marcadores %20 moleculares %20en% 20ingenieria %20genetica](http://www.jcyl.es/jcyl/cag/dgiadr/svidta/boletin/dic99/bold.html# los%20marcadores%20moleculares%20en%20ingenieria%20genetica).
- Simkin AJ, Schwartz SH, Auldridge M, Taylos MG, klee HJ. (2004). The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant J.* 40, 882-892.
- Simkin AJ, Schwartz SH, Auldridge M, Taylos MG, klee HJ. (2004a). The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant J.* 40, 882-892.

- Singh, G., N. Neckleman and D. C. Wallace (1987). Conformational mutations in human mitochondrial ADN. *Nature*. 329, 270-272.
- Snowden KC, Simkin AJ, Janssen BJ, Templeton KR, Loucas HM, Simons JL, Karunairetnam S, Gleave AP, Clark DG, Klee HJ. (2005). The decreased apical dominance 1/petunia hybrid carotenoid cleavage dioxygenase gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell*. 17, 746-759.
- Sunnucks P., Wilson A.C.C., Beheregaray L.B., Zenger K., French J. y Taylor A.C. (2000) SSCP is not so difficult, the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology* 9, 1699-1710.
- Tanksley, S. (1983). Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1, 3-8.
- Taylor, I. B., Sonneveld, T., Timothy, D. H. B., y Thompson, A. J. (2005). Regulation and Manipulation of the Biosynthesis of Abscisic Acid, Including the Supply of Xanthophyll Precursors. *J. Plant Growth Regul*, V24 (4), 253-273.
- Tian, L., Magallanes Lundback, M., Mutter, J., y DellaPenna, D. (2003). Functional analysis of β and ϵ ring carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15, 1320-1333.
- Tian, L., and DellaPenna, D. (2001). Characterization of a second carotenoid β -hydroxylase gene from *Arabidopsis* and its relationship to the *LUT1* locus. *Plant Mol. Biol.* 47, 379-388.
- Tian, L., and D. Dellapenna. (2004). Progress in understanding the origin and functions of carotenoid hydroxylases in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 430, 22-29.
- Umeno D, Tobias AV, Arnold FH. (2005). Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by direct evolution. *Microbiol. Mol. Biotech. Rev.* 69, 51-78.
- Valadez E. y G. Kahl. (2000). *Huellas de ADN en genomas de plantas*. Universidad, Autónoma Chapingo. México.
- Valdez-Ojeda R, Aguilar-Espinosa M, Ortiz R. Quiros CF, Stefanoni-Hernández, JL, and Rivera-Madrid R. (2008). Assessing genetic variation for morphological traits and molecular markers in annatto (*Bixa Orellana* L.) in Yucatan, México. *HORTSCIENCE* 43(7), 2013-2017.
- Vishnevetsky, M., Ovadis, M. y Vainstein, A. (1999). Carotenoid sequestration in plants, the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci.*, 4(6), 232-235.
- Wagner, John. Métodos de cribado para la detección de mutaciones puntuales desconocidas (2002). <~ [Http:// www-users.med.cornell.edu/ jawagne / screening_for_mutations.html](http://www-users.med.cornell.edu/jawagne/screening_for_mutations.html) # solo Strand. Conformational. Polymorphism>.

CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección de material vegetal

La colecta de plantas de achiote se llevó a cabo en la plantación comercial “La Extra,” empresa Fundada en 1945, dedicada a la producción de condimentos empleados en la cocina regional. Dicha plantación cuenta con aproximadamente 500 plantas de achiote, de las cuales 58 individuos son representativos de las poblaciones agrícolas Cooperativa y Yaxcabah (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008). De las 58 plantas representativas, se seleccionaron diez ejemplares, empleando los descriptores morfológicos propuestos por Valdez-Ojeda *et al.*, 2008, para la caracterización de *Bixa orellana*, basándonos en sus atributos fenotípicos contrastantes como son color de flor, color de fruto y porcentaje de bixina acumulado en las semillas, que a partir de ahora mencionaremos como: Pr (Peruana roja), 13, 19, 29, 40, 45, 46, 48, 49, 52.

Además de los diez ejemplares de achiote pertenecientes a la plantación comercial “La Extra”, se agregó una variante más de achiote al este estudio, debido a las características agronómicas particulares de dicho ejemplar, denominado Gu (Guatemala); el cual fue caracterizado de igual forma que los ejemplares anteriores, perteneciente a la comunidad UAF, Dzetabay, de Ticul, Yucatán.

La cuantificación del contenido de bixina en los distintos ejemplares de achiote seleccionados se llevó a cabo empleando las semillas de cada planta; para realizar la extracción del pigmento presente en el arilo de las semillas, se empleó cloroformo y se procedió a realizar las mediciones de absorbancia de las diluciones en un espectrofotómetro, mediante la ejecución de tres repeticiones por muestra, de acuerdo al método reportado por Mckeown y Mark (1962), tal como se describe en anexos.

Al término de la incubación, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 5 min, posteriormente se agregaron a cada tubo 500 μ L de acetato de potasio 5M, seguidamente se colocaron en hielo durante una hora. Transcurrida la hora, se procedió a centrifugarlos a 14,000 rpm durante 30 min a 10°C. Se recuperó el sobrenadante de cada muestra y transfirió a otro tubo eppendorf estéril, en seguida se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 min a 10°C. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se le añadió a cada muestra 5 μ L de RNAsa (10 mg/mL), y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Después de esta etapa se adicionó 1 mL de isopropanol y 20 μ L de acetato de sodio 3M a cada muestra y se incubaron a -80 °C (Forma Scientific, Bio Freezer) durante media hora, tras la cual se centrifugaron a 14,000 rpm por 20 min a 4°C. Después se retiró el sobrenadante y se lavó la pastilla 2 veces con 0.5 mL etanol al 70% y centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min a 4°C se eliminó el etanol y secó la pastilla a temperatura ambiente. Posteriormente la pastilla se resuspendió en 300 μ L de amortiguador TE a 40°C en baño María (Cole-Parmer, 1200-00), para resuspender la pastilla de ADN, tras lo cual se centrifugó durante 10 min a 13 000 rpm a 10°C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se adicionó igual volumen de isopropanol y 1/10 acetato de potasio al tubo de cada muestra, e incubó a -20°C 1 hora, tras lo cual se procedió a centrifugar nuevamente a 13 000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y lavó la pastilla 2 veces con etanol al 70% (500 μ L, 12 000 rpm durante 5 minutos a 4°C). Finalmente, la pastilla de cada muestra se resuspendió en 50 μ L de agua bidestilada estéril.

En el caso del segundo y tercer método de extracción de ADN, se siguieron las instrucciones del protocolo:

- a. Kit QIAGEN DNeasy Blood & tissue para tejido animal con ligeras modificaciones del protocolo de manufactura. No. Cat. 2726.
- b. Kit QIAGEN para tejido vegetal DNeasy Plant Mini de acuerdo al protocolo de manufactura. No. Cat. 69106.

2.3. Cuantificación de ADN

Se cuantificó la concentración de ADN en ng/μL de cada una de las muestras producto de la extracción de ADN, mediante un espectrofotómetro empleando longitudes de onda de 230, 260, 270, 280 y 320 nm (Allen *et al.*, 1972; Berger, 1987), también se llevó a cabo la determinación de compuestos contaminantes (Sambrook *et al.*, 1989), realizando 3 mediciones por cada muestra. Además de lo anterior, se procedió a verificar la calidad del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, tomando 5 μL de cada muestra de ADN más 2 μL de azul de bromofenol como amortiguador de carga, empleando 2 μL de marcador de peso molecular de 1 Kb (invitrogen, 1kb Plus ADN Ladder; Figura 8), la electroforesis se llevó a cabo a 74 V durante 35 min, gel teñido con 0.5 μL de bromuro de etidio. La visualización de las bandas se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta (90 nm), la fotodocumentación se llevó a cabo mediante fotografía digital.



Figura 8: Marcador de peso molecular 1Kb Plus. Se puede apreciar la estructura de los fragmentos en 1 Kb Plus ADN Ladder en agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio.

2.3.1 Prueba de integridad del ADN mediante el empleo de cebadores 18S

Una vez confirmada la calidad del ADN, se realizó una prueba de amplificación por PCR del ADN extraído, empleando los cebadores que están dirigidos contra el gen constitutivo 18S, (18SF CGGCTACCACATCCAAGGAA y 18SR GCTGGAATTACCGCGGCT), 189 pb. De igual manera se emplearon los cebadores 18S para verificar el funcionamiento óptimo de los reactivos empleados en la reacción de PCR, todos los ensayos se realizaron con reacciones con un volumen final de 10 μL ; una vez ajustadas las condiciones de PCR se emplearon reacciones con un volumen final de 50 μL , como se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Mezcla de reacción para la PCR

Reactivo para PCR	1 reacción de 10 μL	1 reacción de 50 μL
ADN (20-30ng/ μL)	0.5 μL	2 μL
Amortiguador de PCR 10X	1. μL	5 μL
MgCl ₂ 50 mM	0.5 μL	2 μL
Cebador F 10 mM	0.5 μL	2 μL
Cebador R 10 mM	0.5 μL	2 μL
DNTP's 10 mM	0.2 μL	1 μL
Taq Polimerasa <i>Invitrogen</i>	0.08 μL	0.4 μL
H ₂ O	6.72 μL	35.6 μL
Volumen final	10 μL	50 μL

Una vez conocida la concentración de ADN de cada muestra y verificada su integridad mediante el empleo de cebadores 18S, se procedió a realizar las amplificaciones con los cebadores sintetizados a partir de secuencias involucradas en la síntesis de carotenoides.

2.4. Amplificaciones con cebadores sintetizados a partir de secuencias involucradas en la síntesis de carotenoides

Se diseñaron cebadores para los genes involucrados en la ruta de síntesis de los carotenoides, basándose en secuencias reportadas en el GenBank involucradas en la síntesis de carotenoides (Cuadro 2), tomando en cuenta los siguientes parámetros: el tamaño de los cebadores entre 18 y 30 pb, contenido de G+C entre 40 y 60%, evitando la presencia de regiones con largas secuencias de una sola base, así como secuencias que puedan producir estructuras secundarias internas; extremos 3' no complementarios, para evitar la formación de dímeros, evitando la presencia de tres G ó C cerca del extremo 3' del cebador (Henegariu, 2000) Posteriormente se realizaron pruebas de amplificación por PCR empleando cebadores (10 Mm) en sentido o forward y (10 Mm) antisentido o reverse sintetizados con base en secuencias reportadas en el GenBank involucradas en la síntesis de carotenoides, con el ADN de los 11 fenotipos de *Bixa orellana* seleccionados. Los dos parámetros que comúnmente se optimizan en el perfil cíclico de PCR, son la temperatura y el tiempo de alineamiento. Los tiempos y temperaturas del resto de las etapas usualmente no varían significativamente (Henegariu, 2000). Por ello se llevó a cabo la aplicación de un gradiente de temperatura para establecer la temperatura de alineamiento (Ta) para cada juego de cebadores en particular (Figura 9).

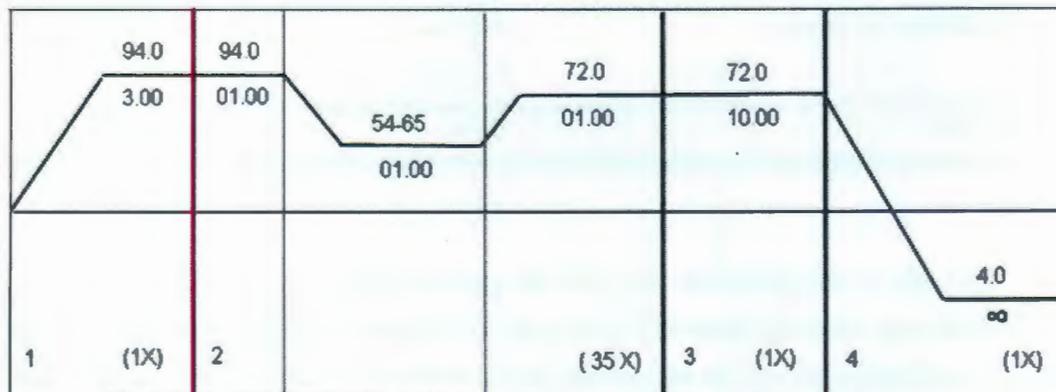


Figura 9: Perfil de una reacción de PCR. Para establecer la temperatura de alineamiento a cada par de cebadores se aplicó un gradiente de temperatura de 54°C a 65°C.

Cuadro 2: Cebadores para la amplificación de secuencias de genes involucrados en la síntesis de carotenoides en achiote

Oligonucleótido	Secuencia de los cebadores	Ta
psyf3	5'GAAGACATATTCGCCGAAA3'	63.7
psyr3	5'AATCGTTTGCCTCAATCTCG3'	64.0
psyf4	5'GCCCTTGGTATAGCCAATCA3'	63.6
psyr4	5'TCGAAGAACATTCTTGCTCGT3'	63.7
psyf3	5'GAAGACATATTCGCCGAAA3'	63.7
psyr4	5'TCGAAGAACATTCTTGCTCGT3'	63.7
psyf4	5'GCCCTTGGTATAGCCAATCA3'	63.6
psyr3	5'AATCGTTTGCCTCAATCTCG3'	64.0
pdsf1	5'GGCATACAAAGCCTCTCAGG3'	63.6
pdsr2	5'TATGCCCTGTTTCCTCATCC3'	63.7
pdsf1	5'GGCATACAAAGCCTCTCAGG3'	63.6
pdsr3	5'AAACCGGTTCAAAGCAATCA3'	64.2
pdsf2	5'AGCCGATTTGATTTCCAGA3'	63.3
pdsr2	5'TATGCCCTGTTTCCTCATCC3'	63.7
pdsf3	5'TTGGACTACTGCCAGCAATG3'	63.8
pdsr3	5'AAACCGGTTCAAAGCAATCA3'	64.2
β -lycf	5'TGCCTTGACACCACCTGGAG3'	68.7
β -lycr	5'TTCGATTTCTCTCCCTC3'	63.3
dgf	5'TggTTYgAYggNgAYggNATg3'	58.7
dgr	5'gTDATNgCRAARTCRTgCATCAT3'	63.8
ccd_espr1	5'gCgAAgTCgTgCATCATgATTg3'	60.0
ccd_espf1	5'TTTgATggAgATgggATggTTC3'	60.0
ccd_espr1	5'gCgAAgTCgTgCATCATgATTg3'	60.0
ccd_espf2	5'gATggAgATgggATggTTC3'	60.0
ccdf1	5'ATTGGCCTGTTGGATTACGA3'	64.1
ccdr1	5'GTGCATCATGATTGGCTCTG3'	64.3
ccdf2	5'TCATCATGGCAAATTCTGG3'	63.6
ccdr2	5'GGTGCCTCATGTGAATAGCC3'	64.4

2.5. Análisis de amplificaciones

Se verificó la amplificación de cada par de cebadores, empleando 5 μ L del producto de PCR (psy3, psy4, pds1, pds2, pds3, lyc, dg, ccd1 y ccd2) y 2 μ L de azul de bromofenol como amortiguador de carga, en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y 2 μ L de marcador de peso molecular 1 Kb Plus ADN Ladder (Figura 8). La visualización del producto de PCR se realizó en un trans-iluminador de luz ultravioleta (90 nm) y finalmente se tomó una fotografía digital para corroborar la calidad del amplicon de cada muestra, para ser empleado en la técnica de SSCP.

2.6 Protocolo para la elaboración de la técnica Polimorfismo de Conformación de la Cadena Sencilla en *Bixa orellana* L.

Se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida empleando la técnica de polimorfismo de conformación de la hebra sencilla (SSCP, por sus siglas en inglés: Single Strand Conformation Polymorphism), la cual consiste en la separación electroforética de ácidos nucleicos basada en diferencias sutiles en su secuencia, frecuentemente de un sólo par de bases, que resulta en una estructura secundaria particular, lo cual se traduce en una diferencia perceptible a través de la movilidad electroforética de la secuencia en gel de acrilamida no desnaturalizante (velocidad de migración electroforética), y es útil para detectar el polimorfismo o la variación en los fragmentos de ADN amplificadas por PCR.

Para ello, se purificaron 100 μ L de producto de PCR de los distintos juegos de cebadores, empleando el kit de purificación "High Pure PCR" (Roche Cat. No. 11 732 668 001), antes de ser cargados en el gel de acrilamida no desnaturalizante, para eliminar los residuos de cebadores, dNTP's y/o nucleótidos no incorporados durante la reacción, para evitar falsos positivos durante la elaboración de los SSCP's. El resultado de la purificación del producto de PCR, se corroboró comparando 5 μ L de producto de PCR purificado, contra 5 μ L de producto de PCR no purificado, realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con de bromuro de etidio. En la elaboración de los geles de acrilamida no desnaturalizantes, se empleó la solución de acrilamida 2X^{MR} especial para detección de

mutaciones, (Prod. A5934 Sigma). La equivalencia de la acrilamida especial para detección de mutaciones 2X^{MR}, corresponde una solución de poliacrilamida convencional al 50%. A partir de las instrucciones del proveedor se realizaron ensayos para determinar la concentración de acrilamida adecuado al tamaño en pares de bases de la secuencia a analizar, manejando concentraciones de acrilamida de 0.5X (12.5%) y al 0.6X (15%) (Cuadro 3).

2.6.1. Electroforesis de SSCP's en achiote

Se emplearon dos equipos de electroforesis, con el objetivo de corroborar que los patrones de bandeo para cada par de cebadores fueran reproducibles: 1) Equipo de electroforesis vertical GIBCO BRL sequencing system modelo 52, con acrilamida al 0.5X independientemente del tamaño del fragmento analizado. 2) Equipo de electroforesis vertical PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad), con acrilamida al 0.5X ó 0.6X dependiendo del tamaño del fragmento a analizar.

Cuadro 3: Componentes para la elaboración de geles de acrilamida para la detección de mutaciones

Equipo de secuenciación	GIBCO BRL sequencing system 52	PROTEAN® II xi Cell system BioRad	PROTEAN® II xi Cell system BioRad
Concentración acrilamida	0.5 X (12.5%)*	0.5 X (12.5%)*	0.6X (15%)*
Tamaño fragmento	200-1300	500-1300	200-540
2X Mutation Detecion Gel Solution	16.25 mL	5 mL	6 mL
10X TBE	4.87 mL	1.5 mL	1.5 mL
Agua bidestilada	43.87 mL	13.5 mL	12.5 mL
TEMED	87 µL	26.8 µL	26.8 µL
Persulfato de amonio al 10%	270 µL	83.0 µL	83.0 µL
volumen final	65 mL	20 mL	20 mL

*Equivalencia correspondiente al % de poliacrilamida convencional.

2.6.2. Electroforesis empleando el equipo GIBCO BRL sequencing system modelo 52

La preparación de los cristales del equipo se llevó a cabo de la siguiente manera: se lavaron los vidrios con detergente Extran®, empleando algodón para evitar rayarlos, una vez secos se les aplicó isopropanol a las caras de interés, se dejaron secar y llevaron a una campana de extracción, para aplicarles Bind-Silane (1 mL de agua bidestilada estéril más 4 µL de Bind-Silane, vidrio pequeño) y Repel-Silane (Vidrio grande), y se dejaron secar por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a armar los juegos de cristales de la siguiente manera: se colocó el vidrio grande, los separadores laterales, el cristal pequeño y se alinearon los separadores, colocando las caras de interés de los cristales orientadas hacia adentro, evitando que se toquen. Se colocaron los sujetadores y se procedió a realizar el montaje de los geles, una vez hecho lo anterior, se colocaron los cristales en un ángulo de 45° para proceder a verter la acrilamida dentro de los cristales.

2.6.2.1. Preparación de la acrilamida no desnaturizante

Se prepararon 65 mL de acrilamida "2X^{MR} Mutation Detection Gel Solution" al 0.5X (Cuadro 3), la solución se pasó por un filtro de Nylon de 0.2 µm, posteriormente se le agregó TEMED y persulfato de amonio al 10%, se mezcló por agitación suave, se colocaron los cristales montados en forma inclinada a 45° para verter la solución, se evitó formar burbujas con la acrilamida, para prevenir deformidades en el patrón de bandeó. Se colocó el peine y el gel se dejó polimerizar 1 hora a temperatura ambiente. Una vez polimerizada la acrilamida se retiró el peine, se enjuagaron los pozos con agua destilada estéril. Se preparó amortiguador de electroforesis TBE 1X, se pre enfrió a 4°C y se añadió a la cámara superior (450 mL), se verificó que no existiera alguna fuga en la parte superior de la cámara, una vez verificado se procedió a agregar el resto del amortiguador a la cámara inferior (450 mL).

2.6.2.2. Condiciones de electroforesis

Se realizó una precorrida con el amortiguador de carga (azul de bromofenol/xilencianol 1:4 formamida preparada en fresco) a 7 watts, 418 volts, 17 mA, durante 30 minutos. Tras lo cual se enjuagaron los pozos con amortiguador frío TBE 1X (4°C), amortiguador de carga se colocó en el primer pozo. En el segundo y tercer pozo se depositó el marcador de peso molecular de 1kb Plus (Invitrogen) y a partir del cuarto pozo se colocaron las muestras. De cada muestra se tomaron 8 µL de producto de PCR purificado, al cual se le agregaron 5 µL de Amortiguador de carga (azul de bromofenol/xilencianol 1:4 formamida preparada en fresco) y se desnaturalizaron a 94°C 5 minutos e inmediatamente se colocaron en hielo para evitar la renaturalización de las cadenas de ADN. Las condiciones de electroforesis que se emplearon fueron: 25°C, 7 watts, 418 volts, 17 mA, de 18 a 20 hrs dependiendo de la secuencia a analizar.

2.6.3. Electroforesis empleando el equipo PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad)

Para la preparación de los vidrios, se procedió de la misma manera que lo descrito en el punto 7.6.2., para el equipo de electroforesis vertical GIBCO BRL sequencing system modelo 52.

2.6.3.1. Preparación de la acrilamida

Se prepararon 20 mL de la acrilamida "2X^{MR} Mutation Detection Gel Solution" al 0.5X ó al 0.6 dependiendo del peso molecular de la muestra a analizar (Cuadro 3); y se pasó la solución por un filtro de Nylon de 0.2 µm, se le agregó TEMED y el persulfato de amonio al 10%, se mezcló por agitación suave, y se procedió a verter entre los cristales montados de acuerdo a las instrucciones de manufactura, con la ayuda de una micro pipeta de 5 mL. Una vez lleno el molde del gel, se colocó el peine y se dejó polimerizar la acrilamida 1 hora a temperatura ambiente (25 °C), transcurrido el tiempo de polimerización, se retiró

el peine, se procedió a enjuagar los pozos con agua destilada estéril. Se prepararon 2.2 L de amortiguador de electroforesis TBE 1X, y se pre enfrió a 4°C. Posteriormente se añadió el amortiguador se mezcló por agitación suave TBE 1X a la cámara superior (400 mL), se verificó que no exista fuga, una vez verificado lo anterior, se agregó el resto del amortiguador a la cámara inferior (1,800 mL), se eliminaron las burbujas de aire de ambas cámaras, con ayuda de una jeringa para evitar deformidades en los patrones electroforéticos.

2.6.3.2. Condiciones de electroforesis

Se realizó una precorrida con el amortiguador de carga (azul de bromofenol/xilenecianol 1:4 formamida preparada en fresco) 7 watts, 418 volts, 17 mA, durante 30 minutos. Posteriormente se enjuagaron los pozos con amortiguador de electroforesis TBE 1X (4°C), se procedió a colocar en el primer pozo amortiguador de carga, en el segundo y tercer pozo colocó marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen), y a partir del cuarto pozo se procedió a cargar las muestras que se prepararon como se describe a continuación: se tomaron 8 µL de producto de PCR purificado y se les agregó 5 µL de Amortiguador de carga (azul de bromofenol/xilenecianol 1:4 formamida preparada en fresco), posteriormente las muestras se desnaturalizaron a 94°C 5 minutos e inmediatamente se colocaron en hielo para evitar la renaturalización del ADN de cadena sencilla, antes de proceder a depositar las muestras en el gel de acrilamida. Las condiciones electroforéticas fueron: 4-10°C, 7 watts, 418 volts, 17 mA, 14 Hrs.

2.6.4. Tinción de geles de acrilamida con plata

1. Solución fijadora

Se preparó el ácido acético glacial al 10%, justo antes del término de la electroforesis y conservó a temperatura ambiente, (200 mL de ácido acético glacial aforado a 2,000 mL).

2. Solución de tinción Nitrato de plata

Se pesaron 2 g de Nitrato de plata, se disolvieron en 2 litros de agua y se le agregaron 3 mL de formaldehído al 37%. La plata es altamente foto sensible por lo cual se preparó y conservó en oscuridad a 4°C.

3. Solución de revelado

Se pesaron 60 g de carbonato de sodio y se disolvieron en 2 litros de agua destilada, además se le agregaron 3 mL de formaldehído al 37%, y 400 µL thiosulfato de sodio (2.5 g de thiosulfato de sodio disolver en 250 mL de agua para tomar 400 µL). Se agregaron el formaldehído y el thiosulfato en fresco, por lo cual preparó el carbonato de sodio y almacenó a 4°C hasta el momento de su uso.

2.6.4.1 Proceso de revelado

Al finalizar la electroforesis, se procedió a desmontar los vidrios de la cámara y se retiraron los separadores laterales, y se separaron los vidrios cuidadosamente para evitar daño al gel de acrilamida. El gel quedó adherido al vidrio pequeño, el cual posteriormente se colocó en la solución fijadora, durante 30 minutos a 75 rpm. Se preparó el carbonato de sodio y se mantuvo en refrigeración 4°C. Posteriormente se retiró la solución fijadora y se reservó para su uso posterior, se procedió a realizar 3 lavados de 5 min con agua destilada al cristal con el gel adherido. Tras los cuales se escurrió el exceso de agua del gel y se colocó en un recipiente con la solución de tinción, donde se mantuvo en agitación por 30 minutos a 75 rpm 10 minutos, antes de finalizar la tinción se debe agregar a la solución de revelado el formaldehído al 37% y el thiosulfato de sodio.

Transcurrido el tiempo de tinción, se escurrió el gel y se realizó un lavado rápido de 10 segundos con agua destilada. Se colocó el cristal con el gel en el recipiente de revelado y se agitó suavemente. Cuando las bandas de interés aparecieron se precedió a finalizar el proceso de revelado sumergiendo el cristal con el gel en la solución fijadora (ácido acético al 10%), y se mantuvo en agitación suave por 2 minutos. Posteriormente se

enjuagó el gel con agua destilada por dos minutos y se dejó secar por 24 hrs. a temperatura ambiente para su posterior foto documentación.

La fotodocumentación se llevó a cabo empleando un escáner BENQ S2W4300U, resolución de 171 Kilo bits, con opción de salida en imagen plana en escala de grises, archivo de imagen JPEG.

REFERENCIAS

- Allen, F. S. (1994). Usefulness of Plant Genome Mapping to Plant Breeding. In: Gresshoff, P. (editors). Plant Genome Analysis. Current Topics in Plant Molecular Biology. CRC Press Inc. United States of América. pp 11-18.
- Berger, S. (1987) P-Labeled and Unlabeled Nucleic Acids. Methods in Enzymology. Academic. Press, Inc. Vol. 52, 49-50.
- Dellaporta SL, Wood J, and Hicks JB. (1983). A plant DNA miniprep: version II. Plant Mol Biol Rep 1, 19-21.
- Echevarria-Machado I, L.A. Sánchez-Cach, C. Hernández-Zepeda, R. Rivera-Madrid, O.A. Moreno-Valenzuela. (2005). Mol. Biotechnol. 31, 129.
- Henegariu O., Bray-Ward P., Ward D C. (2000). Custom fluorescent-nucleotide synthesis as an alternative method for nucleic acid labeling. Nature biotechnology. 18 (3), 345-8.
- Mckeown, G.G. and Mark, E. (1962). The Composition Of Oil-soluble Annatto Food Colors. J. Of The A.O.A.A. 45, 761-766.
- Rodríguez AL, 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. Mol Biotech 41, 1-6.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. (2nd edn), Cold Spring Harbor, New York.
- Valdez-Ojeda R, Aguilar-Espinosa M, Ortiz R. Quiros CF, Stefanoni-Hernández, JL, and Rivera-Madrid R. (2008). Assessing genetic variation for morphological traits and molecular markers in annatto (*Bixa Orellana* L.) in Yucatan, México. HORTSCIENCE 43(7), 2013-2017.

CAPÍTULO III RESULTADOS

3.1. Selección de once variantes de achiote

En el trabajo de Valdez-Ojeda *et al.*, 2008, se caracterizaron morfológica y genéticamente dos poblaciones de achiote de la región agrícola de Yucatán: Cooperativa, Yaxcabá, y se caracterizó morfológicamente la población comercial “La Extra” de Chicxulub Pueblo, Yucatán, en dicho estudio se encontró que la plantación comercial “La Extra” cuenta con individuos muy variables morfológicamente, y que los individuos de las poblaciones agrícolas Cooperativa y Yaxcabá se encuentran representados morfo-agronómicamente en la de plantación comercial de achiote “La Extra” de Chicxulub Yucatán. Con base en lo anterior, 10 de los individuos empleados en este estudio, se colectaron en la plantación comercial de Chicxulub Pueblo, tomando en cuenta los individuos más representativos de las poblaciones Chicxulub Pueblo, Cooperativa y Yaxcabá. En el caso del ejemplar Guatemala (Gu), este se colectó en la población UAF, Dzetabay, de Ticul, Yucatán, (Figura 10) y se eligió por sus características agronómicas particulares, las cuales no se encuentran representadas en las poblaciones agrícolas, Chicxulub Pueblo, Cooperativa y Yaxcabá.

3.1.1. Características morfológicas de las plantas seleccionadas

Tomando en cuenta los parámetros morfológicos, empleados por Valdez-Ojeda *et al.*, (2008), para *Bixa orellana* L: color de la flor, tamaño (longitud y ancho), densidad de espinas y color de la cápsula, número promedio de semillas por cápsula, contenido de bixina, dehiscencia (apertura del fruto maduro) o indehiscencia (fruto maduro cerrado), así como la disposición de las cápsulas en la planta y tamaño de la misma, se puede observar gran heterogeneidad en cuanto a las características morfológicas de las 11 variantes de achiote elegidas para este estudio representativas de las poblaciones Chicxulub Pueblo, Cooperativa, Yaxcabá y Ticul, (Figura 10).



Figura 10: Selección de fenotipos contrastantes de achiote. Variantes de achiote (*Bixa orellana* L) de la región agrícola de Yucatán; Chicxulub Yuc.* Ticul Yuc.** Otras variantes***

3.1.2. Contenido de bixina en achiote

Los resultados muestran que el porcentaje de bixina en las plantas con características fenotípicas de flor blanca (13, 19, 29, 40 y 49) poseen un contenido de bixina menor en comparación con las plantas con flor violeta (48, Gu, 45 y 46), siendo la excepción la planta 52 que presenta flor blanca y un contenido de bixina superior al 2%. Cabe señalar que el contenido de bixina a nivel comercial debe ser superior al 2.65% (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008), basándonos en lo anterior, la variante con mayor contenido de bixina fue la variante 46, en tanto que las variantes 45, Gu, 52, 48, Pr, 40 y 49 presentan un contenido de bixina superior al 2%, las variantes, 29, 19 y 13 tienen un porcentaje de bixina menor al 2%, siendo la variante 13 la planta que presentó el menor contenido de bixina, ordenando las variantes de achiote de menor a mayor porcentaje de bixina como se observa en el Cuadro 4.

Cuadro 4: Contenido de bixina en semillas de achiote

Planta	13	19	29	49	40	Pr	48	52	Gu	45	46
Flor											
Fruto inmaduro											
Bixina%	1.12	1.30	1.44	2.0	2.14	2.16	2.18	2.21	2.33	2.50	3.53
Apertura del fruto maduro	no	no	no	no	si	si	si	no	no	si	si

3.2. Resultados referentes a la extracción de ADN

Para la extracción de ADN se probaron tres métodos, debido a que se requiere ADN de buena calidad, tomando en cuenta antecedentes en extracción de RNA, en tejidos foliares de achiote, donde se observó, que los principales contaminantes presentes en los tejidos de la planta adulta de hoja son los polifenoles 17.35 mg/g peso seco, polisacáridos 52.27

mg/g peso seco, carotenoides 838.16 mg/g peso seco (Rodríguez *et al.*, 2009). Dados estos, antecedentes se probaron los siguientes métodos de extracción de ADN:

1. Dellaporta y colaboradores (1983), con modificaciones sugeridas por Itzá y Muhammad (en preparación).
2. kit QIAGEN DNeasy Blood & tissue para tejido animal con ligeras modificaciones del protocolo de manufactura.
3. kit QIAGEN para tejido vegetal DNeasy Plant Mini de acuerdo al protocolo de manufactura.

El método de extracción de Dellaporta y colaboradores (1983), con modificaciones hechas por Itzá y Muhammad (en preparación). En esta primera etapa se determinó además la cantidad de tejido foliar óptima para obtener un ADN de buena calidad, en la Figura 11 podemos observar según la nitidez de la banda que los mejores resultados se obtuvieron cuando se emplearon cantidades de tejido foliar menores a 0.1 g, optándose por emplear para las subsecuentes extracciones de 0.1 a 0.075 g de tejido foliar joven, ya que el emplear una cantidad de tejido superior a 0.1 g arrojaba como resultado una gran cantidad de contaminantes en el ADN, los cuales que inhibían la reacción en cadena de la polimerasa (Figura 11b).

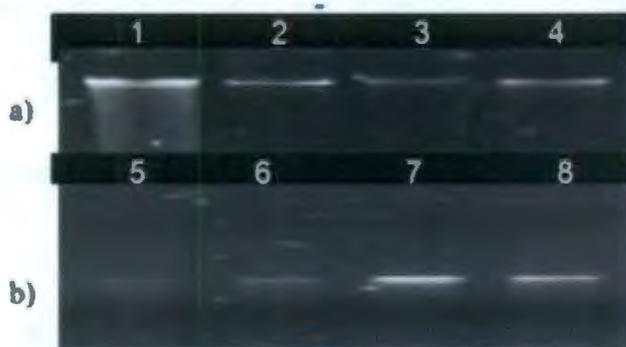


Figura 11: Extracción de ADN de tejido foliar joven de achiote. a) Carriles 1, 1.50 g; 2, 1.00 g; 3, 0.100 g; 4, 0.075 g de tejido por extracción, en gel de agarosa 1% y teñido con bromuro de etidio. **b)** Amplificación por PCR empleando cebadores dig1; Carriles 5, 1.50g; 6, 1g; 7, 0.100 g; 8, 0.075 g de tejido por extracción. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

Con el primer método, se puede ver que hay un buen rendimiento de ADN, que es lo que se buscaba inicialmente, sin embargo no fue posible obtener amplificaciones por PCR en la muestra de la planta 46 (Cuadro 5 y Figura 14), por lo que se procedió a emplear el 2º método de extracción de ADN, que consistió en el uso del kit QIAGEN DNeasy Blood & tissue para tejido animal el cual se había empleado previamente en el trabajo realizado por Valdez-Ojeda *et al.*, 2008, el cual presenta como inconveniente el bajo rendimiento de ADN obtenido en las extracciones, comparado con el primer método de extracción; sin embargo muestras de las plantas 45, 46 y 48, presentaron inhibición en la amplificación por PCR (Cuadro 5 y Figura 14). Esto nos llevó a probar el tercer método de extracción de ADN mediante el empleo del kit QIAGEN DNeasy Plant Mini especial para tejido vegetal de plantas con alto contenido de metabolitos secundarios, siendo la extracción del ADN de la planta 46, la cual presentó nuevamente algunos problemas de amplificación por PCR. Finalmente con este último método se logro obtener amplificación de todas las muestras, como se muestra en las Figuras 15, 16, 17, 18, 19 y 20.

3.2.1. Evaluación de la calidad de ADN

Para evaluar integralmente las muestras de ADN de los tres métodos de extracción, se sometieron todas las muestras a diferentes pruebas: como mediciones por espectrofotometría para verificar el rendimiento y pureza; visualización del ADN en geles de agarosa al 1%, y amplificación por PCR empleando cebadores 18S para verificar la integridad del ADN.

3.2.1.1 Calidad del ADN medida por espectrofotometría

En estudios previos realizados en diferentes tejidos de achiote, se obtuvo que los principales contaminantes en los tejidos foliares de *Bixa orellana*, son los polifenoles 17.35 mg/g de peso seco, polisacáridos 52.27 mg/g de peso seco y carotenoides 838.16 mg/g de peso seco (Rodríguez *et al.*, 2009), por lo que se dedujo que a menor cantidad de tejido inicial para realizar la extracción de ácidos nucleicos, la extracción final resultaría con menos contaminantes, y por lo tanto mejores amplificaciones por PCR (Echevarria-

Machado *et al.*, 2005). Para corroborar la pureza del ADN de las muestras estudiadas, se sometieron al análisis por espectrofotometría (Allen *et al.*, 1972; Berger, 1987) (ver anexos 13.2. Determinación de calidad del ADN genómico). El análisis de las proporciones de A260 nm/A280 nm en las distintas muestras analizadas, indicaron que las muestras de las plantas 45, 46 y 48 presentaban una posible contaminación por proteínas (promedios de las proporciones A260 nm/A280 nm por debajo de 1.7). Esta proporción A260 nm/A280 nm por debajo de 1.7, se presentó continuamente en las plantas 45,46 y 48, en los tres métodos de extracción de ADN, es decir la calidad del ADN en el caso particular de achiote depende de la cantidad de metabolitos secundarios de la variante y no del método de extracción (Figura 14 y Cuadro 5).

Cuadro 5: Extracciones de ADN genómico en plantas de achiote

planta	Método 1			Método 2			Método 3		
	260/280	260/230	ng/ μ L	260/280	260/230	ng/ μ L	260/280	260/230	ng/ μ L
Pr	1.8	1.9	95	1.7	2	25	1.7	1.7	24
13	1.7	1.8	100	1.9	1.6	32	1.8	1.9	31
19	1.8	2.2	59	1.7	2	30	1.7	2	30
29	1.9	2.1	57	1.9	1.6	32	1.7	2	25
40	1.7	1.8	95	1.7	1.6	27	2	2	25
45	1.5	1.7	82	1.6	1.1	75	1.8	1.3	35
46	1.5	1.2	100	1.5	1.2	79	1.4	1.2	27
48	1.7	1.5	107	1.5	1.1	82	1.9	1.4	32
49	1.7	1.9	95	1.6	1.2	96	1.7	2	25
52	1.7	1.8	100	1.7	1.8	37	1.7	2	30
Gu	1.7	1.8	95	1.6	1.7	82	2	2	25
Σ	18.7	19.7	985	18.4	16.9	597	19.4	19.5	309
X	1.7	1.8	89.5	1.7	1.5	54.3	1.8	1.8	28.1

Para determinar más claramente la calidad y pureza del ADN, se sumaron y promediaron los resultados de las proporciones obtenidas mediante el análisis por espectrofotometría de cada método de extracción empleado en achiote, como se observa en el Cuadro 5. Teóricamente, una proporción de 0.6 para la relación A260 nm / A280 nm corresponde a la presencia única de proteínas; y una proporción entre 1.8–2.0, corresponde a un 90% - 100% de pureza de los ácidos nucleicos (Sambrook *et al.*, 1989). En contraparte, se ha reportado que los valores mayores a 2.0 de la relación A260 nm / A280 nm, en las extracciones de ADN, podrían indicar la presencia de ARN en las muestras analizadas (Schultz *et al.*, 1994). Por otro lado, el análisis de la proporción (A260 nm/A230 nm) en ADN cuando los valores son menores a 2.0, indica la posible presencia de carbohidratos y polifenoles en las muestras (Misfeld 1999), también existen estudios en donde esta proporción se utiliza para indicar la integridad del ARN, por lo cual los valores de dicha proporción inferiores a 2.0 permiten suponer la presencia de degradación de las moléculas.

Esto demostró que el éxito de las amplificaciones por PCR aplicado a nuestro modelo de estudio, no dependían del método de extracción de ADN, sino de la muestra a partir de la cual se realizaba la extracción como se explica a continuación: las variantes de *B. orellana*, que presentan características fenotípicas de flor violeta, fruto rojo, mayor acumulación de bixina superior al 2.15% en la semilla son también las plantas que presentan mayor acumulación de metabolitos secundarios (Valdez Ojeda *et al.*, 2008 y Rodríguez *et al.*, 2009), siendo las plantas 45, 46 y 48 las que presentaron problemas en la remoción de los contaminantes del extracto, lo cual usualmente conlleva a la inhibición o errores en la amplificación por PCR (Buttler 2001; Echevarria-Machado *et al.*, 2005 y Rodríguez *et al.*, 2009).

3.2.1.2. Indicadores de la pureza y concentración del ADN

Además de los indicadores de la pureza y concentración del ADN extraído mediante el empleo de un espectrofotómetro, la concentración y calidad de ADN se corroboró, mediante la electroforesis en geles de agarosa al 1%, de cada una de las muestras de

ADN genómico de *B. orellana*. Se consideró que el ADN de cada extracción presentaba buena calidad cuando se presentaba una banda única, sin barridos y bien definida (Figura 12).

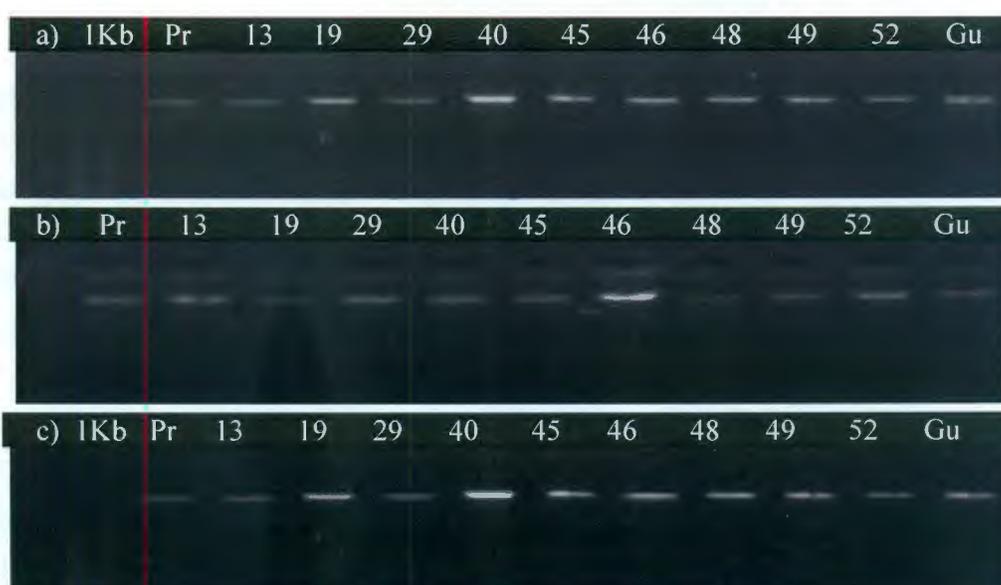


Figura 12: AND genómico empleando tres métodos de extracción. a) Dellaporta y colaboradores (1983), con modificaciones b) Kit QIAGEN DNeasy Blood & tissue, para tejido animal con ligeras modificaciones del protocolo de manufactura. c) Kit QIAGEN para tejido vegetal DNeasy Plant Mini, de acuerdo al protocolo de manufactura.

3.2.1.3 Prueba de calidad de ADN por amplificación por PCR

Además de las pruebas anteriores, la integridad del ADN obtenido por los distintos métodos de extracción, se evaluó mediante su capacidad de ser amplificado por PCR, para ello se emplearon cebadores diseñados a partir de secuencias que codifica para el gen constitutivo 18S. Los productos de PCR amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 1%, teñidos con 0.5 μ L bromuro de etidio/20mL de TAE, en los tres métodos de extracción empleados enachiote 1) Dellaporta y

colaboradores (1983), con modificaciones sugeridas por Itzá y Muhammad (en preparación), 2) kit QIAGEN DNeasy Blood & tissue para tejido animal de acuerdo al protocolo de manufactura y 3) kit QIAGEN para tejido vegetal DNeasy Plant Mini, de acuerdo al protocolo de manufactura (Figura 13).

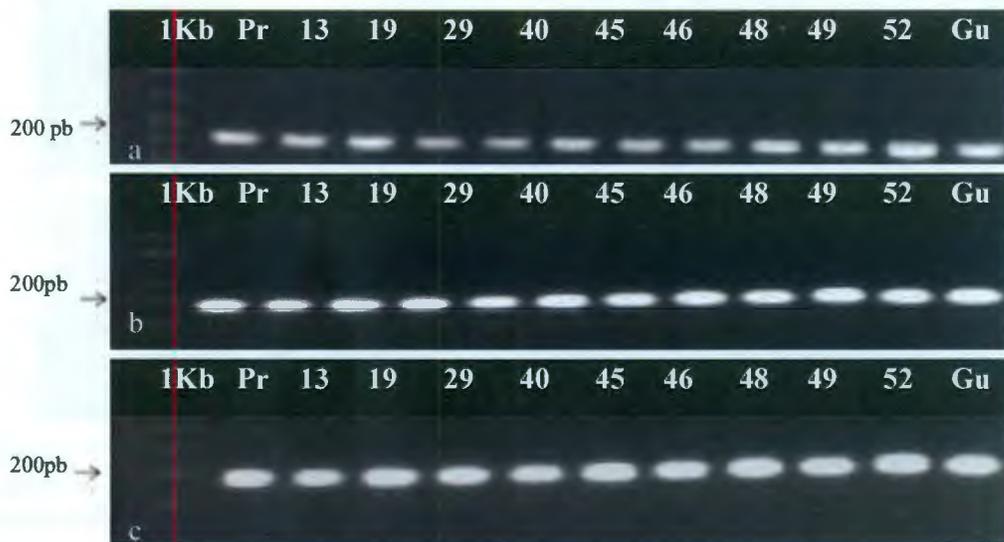


Figura 13: Análisis de Integridad del ADN genómico. Amplificaciones del ADN genómico todas las plantas seleccionadas mediante cebadores contra el gen 18S (189 pb) en los métodos de extracción; a) Dellaporta y colaboradores (1983); modificado b) kit QIAGEN DNeasy Blood & tissue, para tejido animal. c) kit QIAGEN para tejido vegetal DNeasy Plant Mini. Los carriles representan las amplificaciones por PCR de cada una de las variantes analizadas Pr, 13, 19, 29, 40, 45, 46, 48, 49, 52 y Gu, respectivamente, gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y marcador de peso molecular de 1 Kb.

El método uno, Dellaporta y colaboradores (1983) modificado, mostró los mejores resultados en rendimiento de ADN y el método 3 mostró la menor concentración de ADN, en general se obtuvieron buenas amplificaciones en la mayoría de las plantas, independientemente del método de extracción empleado, salvo en algunas extracciones realizadas en las plantas 45, 46 y 48 como se explica en el inciso 8.2.1.1, y se aprecia en la Figura 14. El análisis de la proporción de absorción entre A260nm y A230nm con promedio inferior a 2.0 indica contaminación por polifenoles, carotenoides y carbohidratos (Miesfeld, 1999), los cuales fueron los principales responsables de las inhibiciones

observadas algunas en las ampliaciones por PCR de las plantas 45, 46 y 48, que poseen gran cantidad de metabolitos secundarios (Buttler 2001; Echevarria-Machado *et al.*, 2005 y Rodríguez *et al.*, 2009).

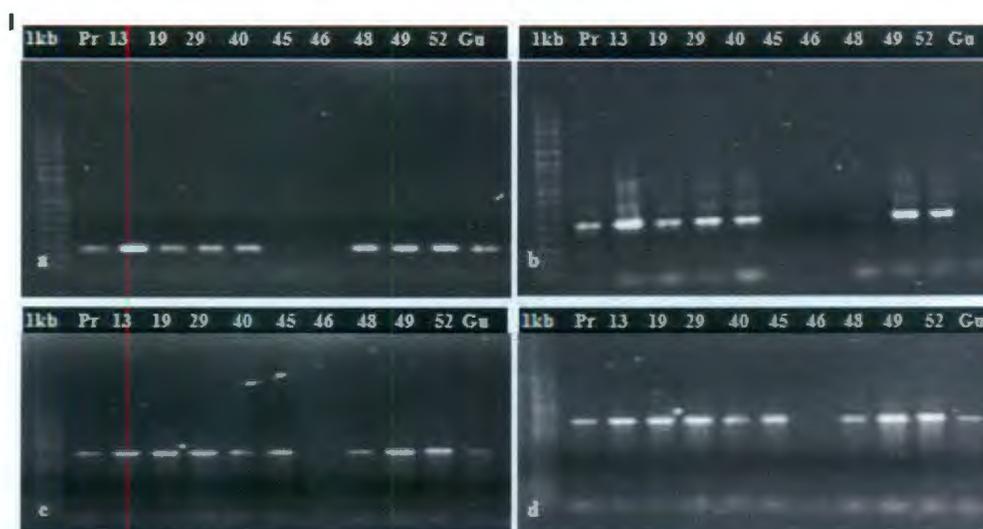


Figura 14: Producto de amplificación por PCR de las 11 variantes de achote. Visualización en gel de agarosa al 1% y tñido con bromuro de etidio. **a)** Amplificación por PCR de *ccd1* con ADN extraído empleando el método modificado de Dellaporta y colaboradores; **b)** Amplificación por PCR de *ccd2* con ADN extraído empleando el kit QIAGEN DNeasy Blood & tissue para tejido animal; **c)** Amplificación por PCR de *pds2* con ADN extraído empleando el kit QIAGEN DNeasy Blood & tissue para tejido animal y **d)** Amplificación por PCR de *pds3* en ADN extraído empleando kit QIAGEN para tejido vegetal DNeasy Plant Mini.

Como puede observarse en la Figura 14 y Cuadros 4 y 5, las variantes de achote 45, 46 y 48, son plantas de fruto flor violeta y fruto rojizo, presentan mayor acumulación de metabolitos secundarios en tejido foliar y mayor cantidad de bixina acumulado en las semillas (Valdez Ojeda *et al.*, 2008), siendo también las plantas que presentaron mayores dificultades en obtener un ADN de buena calidad. Para el caso particular de la muestra 46, se procedió a realizar nuevamente las extracciones con menor cantidad de tejido, obteniéndose resultados satisfactorios.

3.3. Establecimiento de las condiciones de PCR para cebadores involucrados en la síntesis de carotenoides

El establecimiento de las condiciones de PCR para cada juego de cebadores, se realizó con el ADN de la planta 52, mediante la aplicación de un gradiente de temperatura, empleando un termociclador Bio-Rad, tomando en cuenta que para determinar la temperatura de alineamiento (T_a), generalmente se aplica en un gradiente de más/menos 5°C que la T_m calculada para cada par de cebadores. Preferentemente, ambos cebadores deben tener una T_m similar, para garantizar la funcionalidad de los cebadores en la amplificación (Henegariu, 2000).

Posteriormente se analizaron los resultados de amplificación por PCR de cada par de cebadores tomando 5 μ L del producto de amplificación, 2 μ l de azul de bromofenol, para su visualización en geles de agarosa 1%, con 0.5 μ L de bromuro de etidio.

De los cebadores que se probaron (psy3, psy4, ccd1, ccd2, pds1, pds2, pds3, β -lyc y dg), a continuación se presentan los pares de cebadores con los cuales se obtuvo amplificación por PCR, siendo por ello elegidos para el desarrollo y aplicación de la técnica SSCP's para secuencias involucradas en la síntesis de carotenoides en achote. Cabe señalar que todos los cebadores se diseñaron considerando las secuencias conservadas de genes (pds2, pds3, β -lcy, dg, ccd1 y ccd2) homólogos registrados en el GenBank de plantas productoras de pigmentos, (Cuadro 6).

Cuadro 6: Cebadores empleados en la elaboración de SSCP's en achiote

Oligonucleótido	Secuencias de los cebadores empleados	Producto esperado ADN (pb)	Producto amplificado ADN (pb)	Ta
pdsf2-pdsr2	5'AGCCGATTTGATTTTCCAGA3' 5'TATGCCCTGTTTCCTCATCC3'	≈198	1130	63.8
pdsf3-pdsr3	5'TTGGACTACTGCCAGCAATG3' 5'AAACCGGTTCAAAGCAATCA3'	≈200	1300	64.8
β-lyc- β-lyc	5'TGCCTTGACACCACCTGGAG3' 5'TTCGATTTCTCTCCCTCAGC3'	≈491	491	58.0
dgf-dgr	5'TggTTYgAYggNgAYggNATg3' 5'gTDATNgCRAARTCRTgCATCAT3'	≈540	540	54.6
ccdf1-ccdr1	5'ATTGGCCTGTTGGATTACGA3' 5'GTGCATCATGATTGGCTCTG3'	≈195	290	64.8
ccdf2-ccdr2	5'TCATCATGGCAAACCTTCTGG3' 5'GGTGCCTCATGTGAATAGCC3'	≈192	500	63.8

Los pares de cebadores pds2, pds3, ccd1 y ccd2, se diseñaron para amplificar secuencias de aproximadamente 200pb, sin embargo los productos de PCR obtenidos para cada par de cebadores fueron psd2 (1130 pb), pds3 (1300 pb), como se aprecia en los geles de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (Figuras 15, 16 y Cuadro 6), probablemente indicando la presencia de intrones en la secuencia. La presencia de intrones en el gen *pds*, se ha reportado en monocotiledóneas y dicotiledóneas representativas, como lo son arroz (*Oryza sativa*) y *Arabidopsis thailana*, en las cuales se ha observado una conservación estructural de intrones y exones (Qin *et al.*, 2007), sin embargo no se ha reportado para el caso de achiote (*Bixa orellana* L.).



Figura 15: Producto de PCR con cebadores pds3. Amplificación por PCR de secuencias del gen pds3 (1300 pb), empleando ADN genómico de hoja joven, de las plantas de achote Pr, 13, 19, 29, 40, 45, 46, 48, 49, 52 y Gu, gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.



Figura 16: Producto de PCR con cebadores pds2. Amplificación por PCR de secuencias del gen pds2 (1130 pb), empleando ADN genómico de hoja joven, de las plantas de achote Pr, 13, 19, 29, 40, 45, 46, 48, 49, 52 y Gu, gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

Los productos de PCR obtenidos de cebadores diseñados para amplificar secuencias β -lyc correspondieron al tamaño de amplificación esperado (491 pb), dichos cebadores se han empleado con anterioridad en el laboratorio para análisis de expresión diferencial en tejidos de *Bixa orellana*, el diseño de los mismos se llevó a cabo tomando como base las

secuencias codificantes (RNAm), siendo empleado en amplificaciones de ADN genómico total, sin presentar diferencias en cuanto al tamaño de los productos esperados (491 pb); (Figura 16 y Cuadro 6).

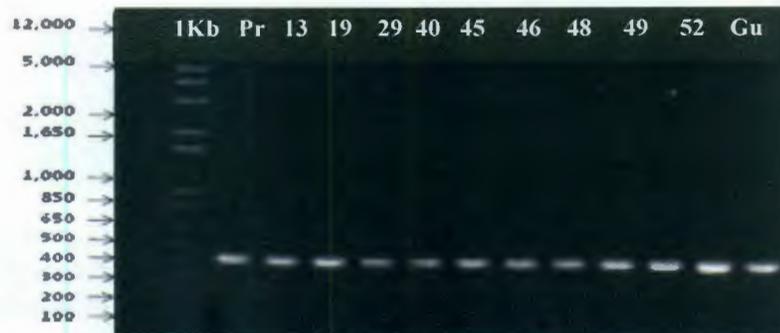


Figura 17: Producto de PCR con cebadores β -lyc. Amplificación por PCR de secuencias del gen β -lyc (491 pb), empleando ADN genómico de hoja joven, de las plantas de achiote Pr, 13, 19, 29, 40, 45, 46, 48, 49, 52 y Gu, gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

Los cebadores dig1 y dig2, también se diseñaron a partir de RNAm, para amplificar secuencias de aproximadamente 200pb, sin embargo los productos de PCR obtenidos para cada par de cebadores fueron dig1 (290 pb), dig2 (500 pb), como se aprecia en las Figuras 18, 19, 21 y Cuadro 6.

En el caso de las amplificaciones inespecíficas del par de cebadores ccd2 (Figuras 18 y 19), se tomó en cuenta que para los cebadores que poseen una temperatura de alineamiento (T_a) alta, se recomienda aumentar la temperatura de alineamiento, pues de esta forma se reducen al mínimo las uniones inespecíficas, aumenta la cantidad de producto amplificado y se reduce la formación de dímeros (Binder, 1997), pese a esta consideración, el producto de amplificación del par de cebadores ccd2, generó varias bandas, por lo que se supondría la presencia de dos posibles ccd's de 850 pb y 1,100 pb como se aprecia en la Figura 19, a pesar de que los cebadores se diseñaron a partir de la secuencias específicas del gen *ccd* de *B. orellana* L.

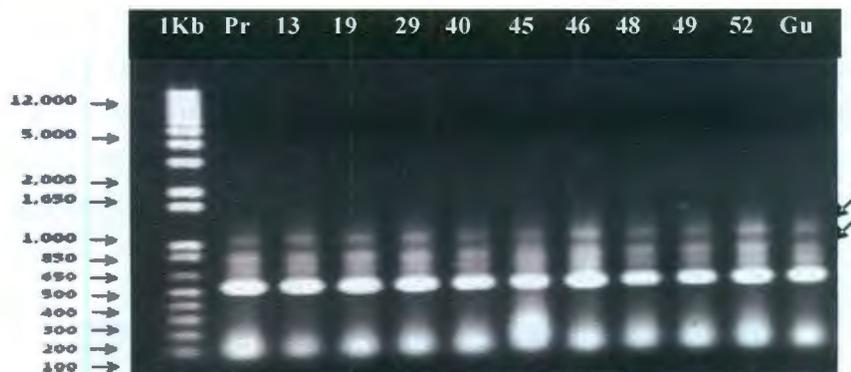


Figura 18: Producto de PCR con cebadores ccd2. Amplificación inespecífica del producto de PCR de secuencias del ccd2 (500pb) empleando ADN genómico de hoja joven, de las plantas de achiote Pr, 13, 19, 29, 40, 45, 46, 48, 49, 52 y Gu, gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Las flechas señalan la posible amplificación de dos posibles ccd's, o secuencias homólogas a estas con pesos moleculares de 850 y 1100 pb.

Debido a las bandas inespecíficas generadas de la amplificación con los cebadores de ccd2, se decidió realizar una electroforesis en gel de agarosa al 3%, el producto de PCR generado con estos cebadores de ccd2, para visualizar mejor el comportamiento de las bandas (Figura 19). De esta forma se puede ver una banda bien definida aproximadamente a los 500 pb y otras no definidas mayores y menores a 500 pb.

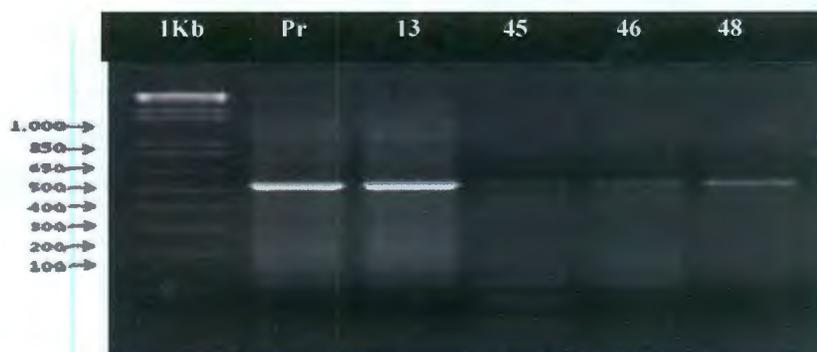


Figura 19: Producto de PCR con cebadores ccd2 en agarosa 3%. Amplificación inespecífica del producto de PCR de secuencias ccd2 (500pb) empleando ADN genómico de hoja joven, de las plantas de achiote Pr, 13, 19, 29, 40, 45, 46, 48, 49, 52 y Gu, gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio.

Este resultado se debe posiblemente a la alta similitud presente entre los genes de la familia *ccd*, para la cual se han reportado nueve miembros en *Arabidopsis* (Bao-Cai *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997), o a la presencia de regiones muy conservadas en la región de amplificación de los cebadores diseñados para *ccd2*, basándonos en las secuencias de obtenidas de *Bixa orellana* a partir de los cebadores degenerados dg (Figura 20).



Figura 20: Producto de PCR con cebadores dg. Amplificación por PCR de secuencias del gen *ccd*, empleando cebadores dg (540pb), diseñados a partir de secuencias heterólogas de plantas productoras de pigmentos, empleando ADN genómico de hoja joven, de las plantas de achiote Pr, 13, 19, 29, 40, 45, 46, 48, 49, 52 y Gu, gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

Cabe señalar que los cebadores de la *ccd1* (Figura 21) diseñados específicamente de la secuencia del gen *ccd* homólogo de *b. orellana* (al igual que *ccd2*), presento mayor especificidad que los cebadores *ccd2*, (Figura 18), visualizado en gel agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio; sin embargo al realizar la técnica de análisis SSCP para estos productos de amplificación, el patrón de bandeo se aprecia inconsistente y difuso (Figuras 27 y 28).

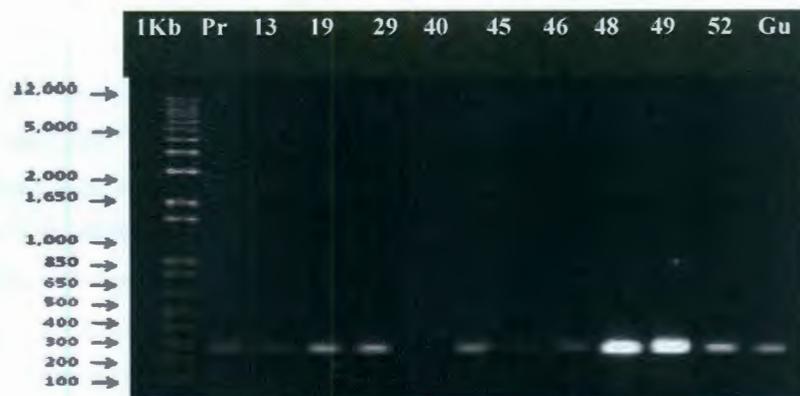


Figura 21: Producto de PCR con cebadores ccd1. Amplificación por PCR de secuencias del gen ccd (290pb), empleando ADN genómico de hoja joven, de las plantas de achiote Pr, 13, 19, 29, 40, 45, 46, 48, 49, 52 y Gu, gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

Los productos de PCR obtenidos para cada par de cebadores fueron psd2 (1130 pb), pds3 (1300 pb), ccd2 (540 pb) y ccd1 (290 pb), tales resultados se deben a la posible presencia de posibles intrones en las regiones amplificadas por cada par de cebadores y cuya presencia aun no se encuentra registrada en las bases públicas de secuencias GenBank para achiote, puesto que el diseño de los mismos se llevó a cabo tomando como base las secuencias registradas para los genes publicadas, a partir de RNAm con un producto esperado de aproximadamente 200 pb (Cuadro 6).

3.4. Establecimiento de la metodología SSCP's para *Bixa orellana*

Para el establecimiento de la técnica SSCP usando los productos de amplificación por PCR de fragmentos de genes de achiote, se emplearon dos equipos de electroforesis: 1) GIBCO BRL sequencing system modelo 52 de 33 x 35.5 cm y 33 x 39.5 cm y 2) PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad) de 16 x 20 cm y 18.3 x 20 cm.

Las condiciones de electroforesis (concentración de la acrilamida, tiempo de electroforesis, voltaje, temperatura) para las secuencias de cada par de cebadores se establecieron en el equipo de secuenciación vertical PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad), para lo cual se realizó un ensayo de comparación de la velocidad de migración de los productos de PCR de los cebadores (ccd1 290 pb ; l-ycβ; ccd2 500 pb; pds2 1,130 pb; pds3 1,300 pb) empleando acrilamida *no desnaturalizante*, especial para detección de mutaciones al 0.5X (Figura 22). Con el ensayo anterior, pudo detectarse que la cadena sencilla de ADN migra en función de (1) su estructura conformacional secundaria y (2) que la velocidad de migración se ve influenciada por el peso molecular de la cadena sencilla, de acuerdo a los resultados para los productos de amplificación de las secuencias ccd1 (290 pb) y β-lyc (491 pb), para los cuales se optó por incrementar la concentración de acrilamida de 0.5X a 0.6X, así como disminuir la temperatura de 10°C a 4°C, para incrementar la fricción de los fragmentos de cadena sencilla dentro del gel de acrilamida no desnaturalizante, ya que esto proporciona una mejor resolución a fragmentos de menos de 500 pb.



Figura 22: Velocidad de migración de los productos de PCR de ccd1; β-lyc; ccd2; pds2; pds3. 1kbD: Marcador de peso molecular 1kb Plus desnaturalizado; 1kbN: Marcador de peso molecular 1Kb Plus, Diferencias en la velocidad de migración (ccd1 290 pb; β-lyc 490 pb; ccd2 500 pb; pds2 1,130 pb; pds3 1,300pb) en acrilamida *no desnaturalizante*, especial para detección de mutaciones al 0.5X, teñido con nitrato de plata.

3.4.1 Electroforesis para secuencias del gen fitoeno desaturasa 2

En un primer ensayo, no se observaron diferencias electroforéticas para la secuencias del gen *pds2* debido a que la separación electroforética (16 hrs de electroforesis) no fue suficiente en un primer ensayo al emplear el equipo GIBCO BRL sequencing system modelo 52, así que tomando en consideración que los fragmentos de amplificación de 1,130 pb, se aumento el tiempo de electroforesis de 18 a 20 hrs, y de esta manera se obtuvieron buenos resultados reflejados en una mejor separación electroforética, para *pds2*, lo cual produjo la correcta separación electroforética de las hebras de ADN sencillo y la detección de tres patrones de bandeo SSCP's, siendo el patrón A el más común presente en las variantes Pr, 13, 19, 29, 40, 45, 48, 49 y 52. Las plantas que presentaron diferencias son el patrón B en la planta 49 con una banda extra a la banda común en el patrón A y C, y el patrón C, en la planta Gu, que presenta una mayor separación en sus hebras de ADN de cadena, simple en comparación con los patrones de las otras variantes de achote (Figura 23a).

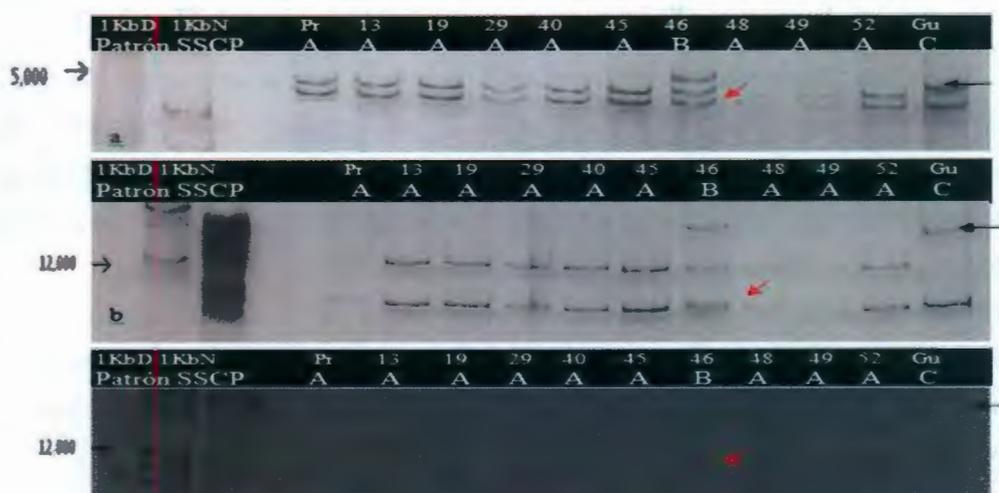


Figura 23: Patrones de bandeo SSCP's para *pds2*; a) SSCP's para secuencias del gen *pds* GIBCO BRL sequencing system modelo 52, Velocidad de migración de las bandas polimórficas de *pds2* se ve reflejado en los patrones de bandeo para las 11 plantas de achote; b) SSCP's para *pds2* PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad), con una mejor separación electroforética c) Verificación de la reproducibilidad del método SSCP para *pds2*, en el equipo PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad). Geles de acrilamida no desnaturalizante, especial para detección de mutaciones al 0.5X, teñidos con nitrato de plata.

Para corroborar el patrón de bandeo obtenido para *pds2* se ejecutó la técnica SSCP en el equipo PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad), el cual cuenta con sistema de refrigeración por circulación de agua. En él se aprecian diferencias en la velocidad de migración de los fragmentos para *pds2*, obteniendo un patrón de bandeo similar al que se presenta en el SSCP's para *pds2* GIBCO BRL sequencing system modelo 52, con las siguientes condiciones electroforéticas, amortiguador TBE 1X frío (4°C) para cargar las muestras en los pozos del gel, electroforesis a 4°C, 7 watts, 418 volts, 17 mA, durante 14 hrs. Las flechas indican las bandas con distinta velocidad de migración electroforética en la variante 46 (que consta de tres bandas), y la variante Guatemala (Figura 23a y 23b).

El polimorfismo detectado empleando *pds2*, solo se presenta en las variantes de achote 46 con una banda adicional a las presentes en las otras variantes (Flecha roja). Sin embargo es interesante destacar que una de las bandas presente en el patrón B de la planta 46, consta de dos fragmentos que migraron muy cercanos uno del otro (flecha roja), mientras que la variante Gu presenta diferencia en la velocidad de migración de una banda (flecha negra), en comparación con los fragmentos de las otras variantes (Figura 23b y 23c).

En la Figura 23b nuevamente el polimorfismo detectado en las secuencias del gen *pds*, empleando cebadores *pds2*, solo se presenta en las variantes de achote 46 y Gu, la planta 46, presenta una banda adicional a las presentes en las otras variantes, y una aparente banda extra, señalada por la flecha roja en las Figuras 23b y 23c, sin embargo considerando los fragmentos de secuencias idénticas, poseen una estructura conformacional secundaria muy parecida y velocidades de migración muy cercanas, se consideraron como una sola banda, esto se aprecia en la Figura anterior en el patrón de bandeo B para la planta 46; en tanto que en la planta Gu, nuevamente presentan el patrón de bandeo C.

3.4.2. Electroforesis para secuencias del gen fitoeno desaturasa 3

Para las secuencias del gen *pds*, mediante el empleo de los cebadores *pds3*, por tratarse de fragmentos de amplificación de 1300 pb, el tiempo de electroforesis, se incrementó de 18 a 20 hrs. Como resultado en la Figura 24a, b y c, se aprecian una buena separación electroforética del ADN desnaturalizado, debido a cambios conformacionales de la estructura 3D debido a diferencias en las secuencias de *pds3*. El patrón A se presenta en las plantas Pr y 48; el patrón más común es el B, para las plantas 13,19, 29,49 y 52, en tanto que el patrón C solo se presenta en la planta 45, el patrón D solo se presenta en la planta 46 y el patrón E solo se presenta en la planta Gu.

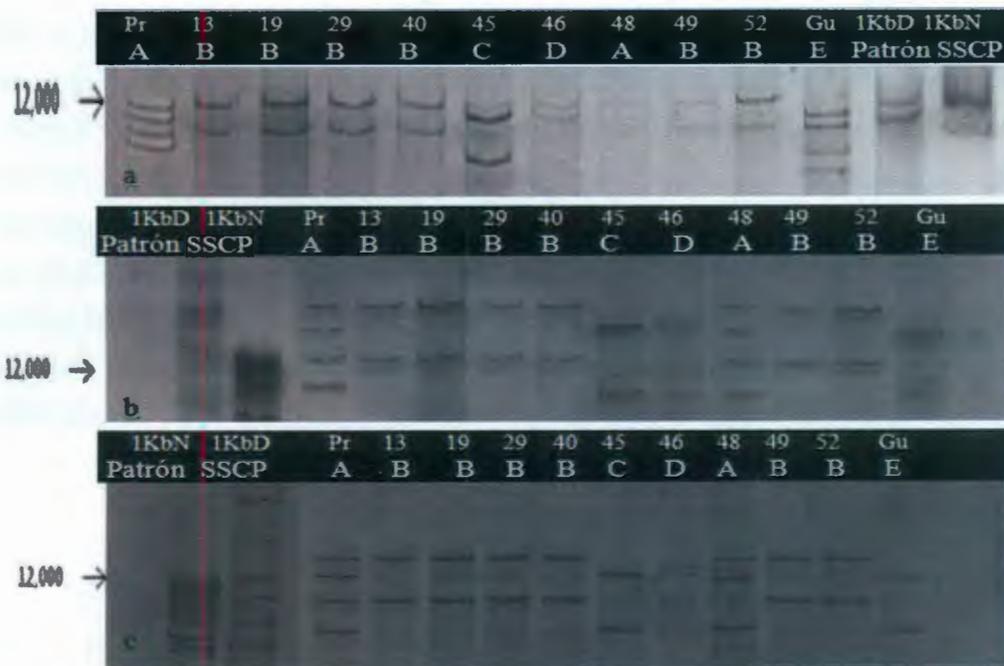


Figura 24: Patrones de bandeo SSCP's para *pds3*; a) SSCP's para secuencias del gen *pds* empleando el equipo *GIBCO BRL sequencing system modelo 52*, las flecha indica la altura de la banda común en las muestras; b) SSCP's para *pds3* *PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad)*; Se aprecian diferencias de los perfiles de bandas en las variantes 45, 46, 48, y Guatemala, lo cual indica la presencia de mutaciones o cambios en las secuencias de las muestras; c) Verificación de la reproducibilidad del método SSCP para *pds3*, en el equipo *PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad)*. Geles de acrilamida *no desnaturalizante*, especial para detección de mutaciones al 0.5X y 0.6X (Sigma), teñidos con nitrato de plata.

Como se aprecia en la Figura 24b, para corroborar el patrón de bandeo obtenido para pds3 en el equipo GIBCO BRL sequencing system modelo 52, se procedió a ejecutar la técnica SSCP con los productos de PCR de las variantes de achiote, en el equipo PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad), con las siguientes condiciones electroforéticas: 4°C al momento de cargar las muestras, electroforesis a 10°C, 7 watts, 418 volts, 17 mA, durante 14 hrs. Se aprecia una visible diferencia en la velocidad de migración de las muestras 45, 46, 48 y Guatemala, obteniéndose un patrón de bandeo idéntico al que se presenta al emplear el equipo GIBCO BRL sequencing system modelo 52; lo cual confirman nuestros resultados de la utilidad de este par de cebadores en la detección de fragmentos polimórficos de secuencias asociadas a la producción de pigmentos en achiote.

Se repitió el experimento bajo las mismas condiciones en el equipo PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad), para verificar la reproducibilidad del método SSCP para pds3, logrando nuevamente reproducir los resultados obtenidos en los geles anteriores, como se aprecia en las Figuras 23a, 23b y 23c. Nuevamente se aprecian diferencias en la velocidad de migración en las variantes de achiote 45, 46, 48, y Guatemala, no solo en el número de fragmentos polimórficos, sino también en la velocidad de migración de las bandas en el gel de acrilamida (Figuras 23a y 23b), por lo cual se logró establecer los parámetros para la electroforesis (concentración de la acrilamida, tiempo electroforesis, voltaje, temperatura), empleando las siguientes condiciones de electroforesis, 10°C, 7 watts, 390 volts, 17 mA y 14 hrs para este equipo de secuenciación.

3.4.3. Electroforesis para secuencias del gen carotenoide dioxigenasa 1

No se obtuvieron patrones definidos SSCP's al emplear los productos de PCR empleando cebadores ccd1 (290pb) en el equipo de electroforesis **GIBCO BRL sequencing system modelo 52**, y geles de acrilamida para detección de mutaciones, preparada al 0.5X, 25°C, 7 watts, 418 volts, 17 mA, durante 18 hrs, como se observa en la Figura 25a, se presentan patrones SSCP's con múltiples bandas no definidas y poca claridad del número de las mismas, esto probablemente debido a la inespecificidad del producto de amplificación por PCR (Figura 25a).



Figura 25: Patrones de bandeado SSCP's para *ccd1*. a) SSCP's para secuencias del gen *ccd1* GIBCO BRL sequencing system modelo 52. Magnificación de los fragmentos polimórficos de *ccd1*, Geles de acrilamida preparada al 0.5X, 25°C, 7 watts, 418 volts, 17 mA, durante 18 hrs. b) SSCP's para secuencias del gen *ccd1*, empleando cebadores *ccd1* en PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad). Los productos de PCR para *ccd1* (290pb) gel de acrilamida, preparada al 0.6X, 4°C, 7 watts, 418 volts, 17 mA, durante 8 hrs. Geles de acrilamida no desnaturalizante, teñidos con nitrato de plata.

En las Figuras 25a y 25b, se observa la detección de distintas bandas polimórficas con diferentes velocidades de migración, con patrones SSCP's poco definidos. A pesar de las modificaciones en las condiciones de electroforéticas, así como para la elaboración PCR, los resultados fueron los mismos, por lo que se considerará la posibilidad de no utilizar este par de cebadores para futuros experimentos SSCP's.

3.4.4. Electroforesis para secuencias del gen carotenoide dioxigenasa 2

Al emplear el equipo GIBCO BRL sequencing system modelo 52 con las condiciones electroforéticas en la detección de mutaciones al 0.5X, 25°C, 7 watts, 418 volts, 17 mA, durante 20 hrs, se obtuvieron patrones SSCP's muy difusos, posiblemente esto se debió la poca diferencia en pares de bases entre las bandas, lo cual conlleva a plegamientos parecidos entre las hebras de ADN de cadena sencilla, esta técnica posee una detección

de hasta un 98% en condiciones ideales, para descartar la posibilidad, de que los resultados se debieran a condiciones electroforesis inadecuadas para las secuencias amplificadas con los cebadores *ccd2* (Figura 26a, b y c), se empleó el equipo de secuenciación vertical PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad), con acrilamida para detección de mutaciones preparada al 0.6X, 10°C, 7 watts, 418 volts, 17 mA, durante 14 hrs (Figura 26c).



Figura 26: Patrones de bandeo SSCP's para *ccd2* a) Velocidad de migración de las bandas polimórficas de las secuencias del gen *ccd*, amplificadas mediante el empleo de cebadores *ccd2* para las variantes de achote, en el equipo de electroforesis GIBCO BRL sequencing system modelo 52.; b) Magnificación de los fragmentos polimórficos de *ccd2* señalados con la flecha, correspondientes a las 'bandas extra' (850pb y 1100pb), que aparecen en el gel de agarosa (Figuras 18 y 19); c) Fragmentos polimórficos correspondientes al tamaño esperado (500pb) del producto de amplificación de *ccd2*; d) Patrones SSCP's de los productos de PCR para *ccd2* empleando el equipo de secuenciación vertical PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad), con acrilamida para detección de mutaciones preparada al 0.5X, 10°C, 7 watts, 418 volts, 17 mA, durante 14 hrs. Geles no desnaturalizantes de acrilamida teñidos con nitrato de plata.

En la electroforesis para las secuencias del gen *ccd*, amplificadas mediante el empleo de cebadores *ccd2*, se presentaron diferencias en la velocidad de migración de los productos de PCR para *ccd2* (500pb) al emplear el equipo de secuenciación vertical PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad), con acrilamida, preparada al 0.6X, 10°C, 7 watts, 418 volts, 17 mA, durante 14 hrs; Sin embargo se aprecian múltiples bandas en cada individuo y poca claridad del número de las mismas, esto probablemente debido a la inespecificidad del producto de amplificación por PCR que se puede apreciar incluso en agarosa al 1% (Figuras 18 y 19) y en acrilamida 0.5X (Figura 26). Cabe señalar que el resultado es poco claro, por lo que se consideró no utilizar este par de cebadores para futuros estudios.

3.4.5. Electroforesis para secuencias del gen β -lycopeno ciclasa

Elaboración de SSCP's para secuencias de β -lyc como se observa en la Figura 27, cuyo producto de amplificación posee un peso molecular de 491pb, es decir un peso molecular muy cercano al de *ccd2* que consta de 500 pb.



Figura 27: Patrones de bandeo SSCP's para β -lyc. a) SSCP's para β -lyc PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad), se aprecian diferencias en la velocidad de migración de los productos de PCR de secuencias del gen β -lyc (491pb), mediante el empleo de cebadores β -lyc, con identificación de distintos patrones de bandeo para las variantes de achiote, las condiciones electroforéticas fueron: acrilamida para detección de mutaciones al 0.6X, 10°C, 7 watts, 418 volts, 17 mA, durante 14 hrs.; b) Verificación de los patrones SSCP's para β -lyc, las condiciones electroforéticas fueron: acrilamida para detección de mutaciones al 0.5X, 10°C, 7 watts, 418 volts, 17 mA, durante 14 hrs. Geles no desnaturalizantes, teñidos con nitrato de plata.

Debido a que los patrones para β -lyc presentaron bandas con velocidades de migración muy cercanas, se repitió el experimento para β -lyc, bajando la concentración acrilamida de 0.6x a 0.5x, empleando las mismas condiciones electroforéticas que las del gel anterior. Presentándose deformidad en los patrones de bandeo, a causa de la pérdida de fricción de las secuencias SSCP's para β -lyc en achiote, sin embargo con ello se pudo corroborar la presencia de patrones SSCP's de tres bandas en las plantas analizadas.

3.4.6. Electroforesis para secuencias del gen carotenoide dioxigenasa

Así mismo también se procedió a elaborar amplificaciones partir de cebadores degenerados dg 540pb, a partir de los cuales se aislaron y diseñaron los cebadores ccd1 y ccd2 para descartar la posibilidad de que la in-especificidad de los productos de pcr tanto para ccd1 como para ccd2 se debiera a un mal manejo de las condiciones electroforéticas (Figura 37), cuyo resultado fue un patrón muy difuso y poco conveniente para la técnica SSCP en *Bixa orellana* L, razón por la cual al igual que ccd1 y ccd2, se decidió descartarlos en experimentos posteriores relacionados con ésta técnica, no así el caso de futuras investigaciones en el genoma de *Bixa orellana*, ya que resulta de gran interés, la posible presencia de múltiples secuencias homólogas a ccd que caen en el rango de amplificación de los cebadores dg, ccd1 y ccd2.



Figura 28: Patrones de bandeo SSCP's para dg. Al emplear el equipo de electroforesis vertical PROTEAN® II xi Cell system (Bio-Rad), con secuencias amplificadas con los cebadores dg, se aprecian diferencias en la velocidad de migración de los productos de PCR (540 pb), lo cual conlleva a la identificación de distintos patrones de bandeo, poco definidos. Las condiciones electroforéticas fueron: acrilamida para detección de mutaciones al 0.5X, 10°C, 7 watts, 418 volts, 17 mA, durante 14 hrs. Gel no desnaturalizante, teñido con nitrato de plata.

Cabe señalar que debido a que las secuencias amplificadas con los cebadores dg, dig y ccd2 presentan gran cantidad de bandas, inespecíficas e indefinidas, por lo cual, no se incluyen el Cuadro 7, ni en posteriores análisis de SSCP's en *Bixa orellana*, para evitar posibles errores en la interpretación de los resultados.

3.4.7. Características fenotípicas de las variantes y resultados SSCP's en secuencias de la ruta de los carotenoides para achiote

Para la elaboración del Cuadro 7, se tomaron los distintos patrones electroforéticos y se ordenaron de acuerdo a el color del fruto, color de flor, y contenido de bixina, para comparar más claramente la posible relación entre las características fenotípicas de las variantes y los resultados obtenidos con la técnica SSCP's de secuencias de los genes de la ruta de los carotenoides de *Bixa orellana*: En las filas superiores aparecen las secuencias analizadas (pds2, pds3 y β -lyc) de los genes *pds* y *β -lyc*, y debajo los patrones electroforéticos para cada gen en las variantes de achiote, en las columnas se aprecian las características de las 11 variantes como son, el color de fruto inmaduro, color de la flor, contenido de bixina (%), así como el número total de patrones electroforéticos detectados para cada secuencia (en números), y la suma total de los haplotipos presentes en cada variante (Σ), lográndose observar claramente que las plantas con color de flor rosa y violeta presentan por lo general una mayor acumulación del pigmento bixina en el arilo de las semillas (superior al 2.15%), excepto en la planta 52, coincidiendo con lo reportado por Valdez-Ojeda *et al.*, 2008; de las tres secuencias de genes analizadas (*pds2*, *pds3* y *β -lyc*), β -lyc detecta un mayor número de bandas polimórficas, seguido de *pds3*, y finalmente *pds2* (Cuadro 7).

Cuadro 7: Número de polimorfismos para 11 fenotipos de achiote.

Variantes de achiote											
	13	19	29	49	40	52	Pr	48	Gu	45	46
											
											
%	1.12	1.30	1.44	2.0	2.14	2.21	2.16	2.18	2.33	2.50	3.53
D	No	No	No	No	Si	No	Si	Si	No	Si	Si
pds2= 3perfiles de bandeo											
	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A	B
											
pds3= 5 perfiles de bandeo											
	B	B	B	B	B	B	A	A	E	C	D
											
β -lyc= 7 perfiles de bandeo											
	B	C	C	C	A	A	A	F	G	D	E
											
Σ	6	6	6	6	7	7	9	9	8	8	11

%=Porcentaje de bixina

D=Apertura de la cápsula en la madurez

Σ = Suma del número de bandas pos variante

Los análisis de los patrones presentes en las 11 plantas, se realizaron individualmente para cada par de cebadores quedando de la siguiente manera:

1. Para las secuencias de pds2 se detectan solo tres patrones agrupando a las plantas Pr, 13, 29, 40, 45, 48, 49 y 52 dentro del patrón A, con dos bandas comunes, planta 46, con cuatro bandas, dos comunes, una distinta a todas las presentes entre los individuos queda con el patrón B, a la planta Gu se le asignó el patrón C, presentó dos bandas, compartiendo una banda común con todas las plantas y otra banda única con la planta 46, (Figuras 23, 26 y 27 Cuadro 7).

2. En tanto que las plantas analizadas con las secuencias pds3, presentan en todas las plantas con fruto verde (flor blanca) un patrón idéntico tanto en número (dos bandas), como en velocidad de migración, quedando las plantas 13, 19, 29, 40, 49 y 52 agrupadas en el patrón B, en tanto que todas las plantas con fruto rojizo (Flor rosa para Pr y flor violeta para las plantas 45, 46, 48 y Gu) presentan patrones con más de tres bandas, quedando las plantas Pr y 48 agrupadas en el patrón A, en tanto que las plantas 45 (E), 46 (D) y Gu (C) presentan patrones distintos a todas las plantas.

3. Los perfiles de bandeo presentes en achote para β -lyc, resultaron ser muy polimórficos, ya que en 11 variantes se presentan 8 patrones, que a diferencia de pds2 y pds3, no necesariamente separan las plantas de fruto rojizo de las plantas de fruto verde, quedando de la siguiente manera: las plantas peruana roja, 49 y 52 presentan un patrón idéntico (A), correspondiente a tres bandas SSCP's, la planta 13 presenta el patrón B con dos bandas, una banda común excepto para 45 y Gu, las plantas 19, 29 y 40 también presentan dos bandas con el patrón A, en tanto que las plantas 45 con el patrón D y 46 con el patrón E, presentan tres bandas, compartiendo solo una banda entre ellas, en tanto que la planta 48 con el patrón F, presenta una banda común a las demás plantas, y dos bandas que migran muy cercanas una de la otra, (Figura 27), tanto que podría tratarse, la misma banda, lo cual se corroborará mediante secuenciación. Por último la variante Gu con el patrón G, solo presentó dos bandas, con un patrón de migración distinto al presente en plantas con patrones que constan de dos bandas, como el caso de las plantas 13, 19, 29 y 40 con fruto verde y flor blanca.

REFERENCIAS

- Allen, F. S. (1994). Usefulness of Plant Genome Mapping to Plant Breeding. In: Gresshoff, P. (editors). *Plant Genome Analysis. Current Topics in Plant Molecular Biology*. CRC Press Inc. United States of América. pp 11-18.
- Bao-Cai T, Schwartz SH, Zeevaert JAD, McCarty DR. (1997). Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 12235-12240.
- Berger, S. (1987). P-Labeled and Unlabeled Nucleic Acids. *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc. Vol. 52, 49-50.
- Binder, A. (1997). Standard PCR Conditions.
- Buttler, J. (2001). *Forensic DNA Typing., Biology & Technology behind STR Markers*. Academic, California, USA. 322 p.
- Dellaporta SL, Wood J, and Hicks JB. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1, 19-21.
- Echevarria-Machado, I, L.A. Sánchez-Cach, C. Hernández-Zepeda, R. Rivera-Madrid, O.A. Moreno-Valenzuela. (2005). *Mol. Biotechnol.* 31, 129
- Henegariu O., Bray-Ward P., Ward D C. (2000). Custom fluorescent-nucleotide synthesis as an alternative method for nucleic acid labeling. *Nature biotechnology*, 18 (3), 345-8.
- Miesfeld, R. (1999). *Applied Molecular Genetics*. John Wiley, New York, USA. 293p.
- Rodríguez AL, 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. *Mol Biotech* 41,1-6
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. (2nd edn), Cold Spring Harbor, New York.
- Schultz, D.J., R. Craig, D.L. Cox-Foster, R.O. Mumma & J.I. Medford. (1994). RNA isolation from recalcitrant plant tissue. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12, 310-316.
- Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaert JAD, McCarty DR. (1997). Specific Oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of Maize. *Science* 276, 1872-1874.

Valdez-Ojeda R, Aguilar-Espinosa M, Ortiz R, Quiros CF, Stefanoni-Hernández, JL, and Rivera-Madrid R. (2008). Assessing genetic variation for morphological traits and molecular markers in annatto (*Bixa Orellana* L.) in Yucatan, México. HORTSCIENCE 43(7), 2013–2017.

CAPÍTULO IV DISCUSIÓN

4.1. Selección de variantes de achiote

En la comparación entre los ejemplares achiote seleccionados de la plantación "La extra" de Chicxulub Pueblo, se puede observar claramente que el achiote presenta una amplia variabilidad fenotípica en cuanto a forma y color de las cápsulas (Arce, 1999; Rivera-Madrid *et al.*, 2006; Valdez-Ojeda *et al.*, 2008), así como una gran heterogeneidad en cuanto al porcentaje de bixina que se obtiene de las semillas de achiote de acuerdo al individuo en particular (Rivera-Madrid *et al.*, 2006), esto de acuerdo a método reportado por Mckeown y Mark (1962). Por ello, se han realizado estudios para la clasificación de los cultivares basados en el contenido de bixina y las características morfológicas, para facilitar la selección de genotipos parentales para el futuro mejoramiento genético de achiote (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008). Con base en los perfiles de bandeo SSCP's encontramos que al menos la heterogeneidad presente en las variantes de achiote analizadas, en relación al porcentaje de bixina acumulado en las semillas, está posiblemente relacionada a la variación alélica de los genes *pds*, *β -lyc* y *ccd* que participan en la síntesis de carotenoides y bixina.

4.2. Discusión referente a la extracción de ADN

Las variantes de *B. orellana*, que presentan características fenotípicas de flor violeta, fruto rojo, mayor acumulación de bixina superior al 2.15% en la semilla son también las plantas que presentan mayor acumulación de metabolitos secundarios, (Valdez Ojeda *et al.*, 2008 y Rodríguez *et al.*, 2009), siendo las plantas 45, 46 y 48 las que presentaron problemas en la remoción de los contaminantes del extracto, lo que usualmente lleva a inhibición de las reacciones o errores en la amplificación (Buttler 2001). Los posibles fallos en las amplificaciones se deben a la presencia de contaminantes tales como polisacáridos, polifenoles, u otros contaminantes del extracto, que con frecuencia llevan a inhibición de

las reacciones o errores en la amplificación (Wang y Vodkin 1994). Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Valdez Ojeda *et al.*, (2008) y Rodríguez *et al.*, (2009), siendo las variantes con fenotipos en color de flor y fruto rojizos, las plantas que presentan mayor acumulación de metabolitos secundarios y por ende mayores problemas en la obtención de un ADN de buena calidad libre de contaminantes a diferencia de las plantas con flor blanca y fruto verde.

Por lo anterior, se probaron tres protocolos de extracción de ADN tomando en cuenta que los tejidos achiote poseen una alta concentración de polisacáridos, polifenoles, los cuales limitan obtener material genético libre de contaminantes (Echevarria-Machado *et al.*, 2005 y Rodríguez *et al.*, 2009). El método uno de Dellaporta y colaboradores (1983) modificado por Itzá y Muhammad (en preparación), mostró los mejores resultados en el rendimiento de ADN. Mientras que los métodos 2 y 3: kit QIAGEN DNeasy Blood & tissue para tejido animal y kit QIAGEN para tejido vegetal DNeasy Plant Mini mostraron menor rendimiento de ADN.

Con respecto a los resultados del análisis de la relación de absorbancias, A260nm/A230nm, de los tres métodos empleados el del kit QIAGEN para tejido vegetal DNeasy Plant Mini fue el que produjo el ADN de mejor calidad en cuanto a pureza.

4.3. Discusión referente al establecimiento de las condiciones de PCR para cebadores involucrados en la síntesis de carotenoides

En lo referente a la prueba de amplificaciones por PCR el método que presentó mejores resultados fue el método de extracción del kit QIAGEN para tejido vegetal DNeasy Plant Mini; por ello se optó por emplear éste método.

Los productos de PCR obtenidos para cada par de cebadores fueron psd2 (1130 pb), pds3 (1300 pb), ccd2 (540 pb), ccd1 (290 pb), a pesar de haber sido diseñados para generar productos de aproximadamente 200pb; tales resultados se deben a la posible

presencia de intrones en las regiones amplificadas por cada par de cebadores, siendo empleado en amplificaciones de ADN genómico total, presentando diferencias en cuanto al tamaño de los productos esperados (alrededor de 200pb) y los obtenidos (más de 291 a 1130 pb al emplear ADN genómico de achiote), la presencia de intrones en el gen *pds*, se ha reportado en monocotiledóneas y dicotiledóneas representativas, como lo son arroz (*Oryza sativa*) y *Arabidopsis thailana*, en las cuales se ha observado una conservación estructural de intrones y exones (Qin *et al.*, 2007). En tanto que las secuencias correspondientes a productos de amplificación de los cebadores dg y β -lyc corresponden al tamaño de amplificación esperado dg (540 pb) y β -lyc (491) pb en cADN y ADN Genómico total de *Bixa orellana*, esto comparado con trabajos previos (Rodríguez *et al.*, 2009)

El producto de amplificación de los cebadores dg, ccd1 y ccd2, resultado en un patrón muy difuso, no definido y poco conveniente para la técnica SSCP en *Bixa orellana* L, razón por la cual, se decidió descartar tales cebadores en experimentos posteriores relacionados con ésta técnica, no así el caso de futuras investigaciones en el genoma de *Bixa orellana*, ya que resulta de gran interés, la posible amplificación de múltiples secuencias homologas a la familia de genes *ccd*, como es el caso de ccd2, que presenta amplificaciones de posibles secuencias *ccd*'s con pesos moleculares de ≈ 900 y ≈ 1200 pb, superiores al producto esperado de 500pb (flechas de la Figura 22).

4.4. Establecimiento de la metodología SSCP's para *Bixa orellana*

La comparación de los perfiles de bandeo de los productos de PCR generados por los pares de cebadores ccd1; β -lyc; ccd2; pds2; pds3 en geles de acrilamida al 0.5x, puede apreciarse que pese a que la cadena sencilla de ADN migra en función de su estructura conformacional 3D, la velocidad de migración se ve influenciada por el peso molecular y el producto de amplificación los cebadores ccd1 (290 pb) y β -lyc (491 pb) se definieron mejor al incrementar la concentración de acrilamida de 0.5X a 0.6X, por lo cual el peso molecular de las secuencias amplificadas es importante en el establecimiento de la técnica SSCP.

Se logró establecer la metodología para la aplicación de la técnica SSCP con, las secuencias de genes *pds2*, *pds3* y β -*lyc*, ya que se detectó una buena definición del patrón de bandeo relacionado con características fenotípicas particulares de las variantes de *Bixa orellana*, los cuales según lo reportado por Valdez-Ojeda et al., 2008 están asociadas a la producción y rendimiento de bixina. Además de una alta reproducibilidad de la técnica SSCP's para cada secuencia, (3 de 3 repeticiones), con los cuales podemos identificar alelos favorables dentro de una diversidad genética (Flint-García et al., 2005), para el desarrollo de herramientas que proveerán la información genotípica necesaria para facilitar la selección y diseño de plantas con características deseables (Harjes et al., 2008).

4.4.1 Discusión referente a secuencias del gen fitoeno desaturasa

La desaturación de los carotenos es un paso esencial en la biosíntesis de los carotenoides la cual ha sido ampliamente estudiada (Bartley y Scolnik, 1995) como modulador clave en la producción de carotenoides. Durante el desarrollo y maduración, en los frutos de todas las especies se produce, un aumento del nivel de expresión de los genes iniciales de la ruta como lo son los genes *psy*, *pds*, *zds* (Ikoma et al., 2001; Kato et al., 2004; Rodrigo et al., 2004). El producto de la reacción catalizada por PSY es el fitoeno, que es convertido a fitoflueno y licopeno por la acción secuencial de las enzimas PDS Y ZDS (Rodrigo et al., 2004).

Para las secuencias *pds2* se detectan solo tres patrones de bandeo: Cabe señalar que tanto *pds2* como *pds3* corresponden a dos regiones del gen fitoeno desaturasa, ya que los cebadores se diseñaron a partir de las mismas secuencias. Un análisis comparativo entre maíz y arroz revelan que el gene *pds* presenta una sola copia en el genoma de estas plantas. Observándose una conservación estructural de intrones y exones en monocotiledóneas y dicotiledóneas representativas, como lo son arroz (*Oryza sativa*) y *Arabidopsis thaliana* (Qin et al., 2007).

Como se mencionó antes, la desaturación de los carotenos es un paso esencial en la biosíntesis de los carotenoides. Así se han observado fenotipos para mutantes de *Arabidopsis thaliana* en el gen *pds*, la presencia de proplástidos que no se desarrollan en cloroplastos, así como cambios de expresión genética involucrados en al menos 20 rutas metabólicas, incluyendo la inhibición de la síntesis de carotenoides, clorofilas y GA (Qin *et al.*, 2007). La existencia de mutaciones de ganancia de función que conducen a la acumulación de carotenoides en tejidos donde habitualmente no se encuentran estos pigmentos también ha sido descrita en crisantemo (Kishimoto y Ohimiya 2006), coliflor (Li *et al.*, 2006) y maíz (Palaisa *et al.*, 2003). La mutante espontánea (*or*) de coliflor presenta coloración naranja, mientras que el genotipo silvestre es blanco debido a la ausencia de carotenoides en sus tejidos (Li *et al.*, 2006). Estas diferencias de coloración no se deben a una expresión diferencial de los genes de la biosíntesis de carotenoides entre ambos genotipos (Li *et al.*, 2001), sino a la mutación de un gen (*or*) de función desconocida, que induce en la mutante la diferenciación de proplástidos en cromoplastos (Lu *et al.*, 2006). Por lo cual podemos deducir que las plantas de *Bixa orellana* que presentan características fenotípicas de fruto rojizo y porcentaje de bixina en la semilla superior al 2.15%, presentan polimorfismos a nivel de secuencia en el gen *pds*, que codifica para una enzima que participa en un paso esencial en la biosíntesis de los de los carotenoides (Bartley y Scolnik, 1995).

4.4.2. Discusión referente a secuencias del gen β -licopeno ciclasa

Los perfiles de bandeo presentes en achote para, resultaron ser muy polimórficos, ya que en 11 variantes se presentan 8 patrones SSCP's, que a diferencia de los patrones obtenidos de las secuencias *pds2* y *pds3*, β -lyc no necesariamente separan las plantas de fruto rojizo de las plantas de fruto verde.

Las plantas 13, 19, 29 y 40 con fruto verde y flor blanca y contenido de bixina menor al 2.0%, presentaron patrones de migración SSCP que constan de dos bandas, la variante Gu de fruto rojo y un contenido de bixina mayor al 2.15% que presentó dos bandas, tal y como se ha reportado en *Citrus cinensis* que presenta dos genes con actividad β -licopeno

ciclasas, siendo β -lyc1 y β -lyc2 (β -lyc2a y β -lyc2b), siendo el alelo β -lyc2a funcional y el alelo β -lyc2b con actividad nula (Alquézar *et al.*, 2009). Lo anterior también se presenta en las variedades de papaya Tauning (pulpa roja) y Kapoho (pulpa amarilla) en las cuales se presentan dos genes que codifican β -licopeno ciclasas, β -lyc1 y β -lyc2. En el caso de β -lyc2 en las variedades de papaya rojas a diferencia de las variedades amarillas, presentan una inserción TT en la posición 881 del gen β -lyc2, lo cual produce una enzima β -lyc2 con actividad catalítica nula, evita la conversión de licopeno a β -caroteno y conlleva a la acumulación de licopeno en las variedades de pulpa roja como es el caso de la variedad roja de papaya Tauning (Devitt *et al.*, 2010).

En el caso de la variedad peruana roja y las plantas 49 y 52 presentan un patrón idéntico de tres bandas y un contenido de bixina superior al 2%, pese a que de las tres plantas anteriores solo peruana roja presenta fruto rojizo y flor rosa, y la variedad Gu con un patrón dos bandas, como el presente en plantas con fruto verde, flor blanca y un contenido de bixina menor al 2.15%; tales datos parecen coincidir con la teoría propuesta por Khan y Mackinney 1953 en la que sugieren que a partir del pomelo blanco surgieron por mutación espontánea, variedades rosadas de pomelo que acumulan b-caroteno y pequeñas cantidades de licopeno y, a partir de estas se originaron también por acumulación de mutaciones espontáneas, variedades rojas de pomelo, con el mismo contenido de b-caroteno pero con mayor concentración de licopeno (Khan y Mackinney 1953); lo cual fué confirmado al obtener resultados similares mediante mutación inducida (Alquézar *et al.*, 2009). Según Alquézar *et al.*, 2009, al menos en el caso del pomelo Star ruby (rojo) la mayor acumulación de carotenoides con respecto a la variedad de pomelo Marsh (blanco), no obedece a un aumento de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides. Lo cual podría ser el caso de las plantas de achiote 45, 46 y 48, con fruto rojizo y flor violeta, un contenido de bixina mayor al 2.15%, que presentan tres bandas en su patrón SSCP's, lo cual implicaría la presencia de heterocigosis para la secuencia que codifica para el gen β -lyc.

La mayor acumulación de carotenoides en las variedades rojas de toronja respecto a las blancas, sugiere que las alteraciones existentes en toronjas blancas, que afectan la

biosíntesis y/o acumulación de carotenoides, se han podido restaurar o restablecer en las variedades rojas de toronja, a favor de esta posibilidad existen varias evidencias.

1. La teoría propuesta por Khan y Mackinney 1953 en la que sugieren que a partir de variedades blancas surgieron variedades rosadas por mutación espontánea.
2. La existencia de mutaciones de ganancia de función que conducen a la acumulación de carotenoides en tejidos donde habitualmente no se encuentran estos pigmentos descrita en crisantemo (Kishimoto y Ohimiya 2006), coliflor (Li *et al.*, 2001) y maíz (Palaisa *et al.*, 2003).
3. En crisantemo existen variedades silvestres de flor blanca carentes de carotenoides y variedades de flor amarilla que acumulan fundamentalmente luteína (Kishimoto y Ohmiya, 2006).
4. El mutante espontáneo *or* de coliflor acumula β -caroteno y presenta coloración naranja, el genotipo silvestre es blanco debido a la ausencia de carotenoides en sus tejidos (Li *et al.*, 2006). Estas diferencias de coloración no se deben a una expresión diferencial de los genes de la biosíntesis de carotenoides entre ambos genotipos (Li *et al.*, 2001), sino a la mutación de un gen (*or*) de función desconocida, que induce en el mutante la diferenciación de proplástidos en cromoplastos (Li *et al.*, 2006).
5. En el caso del maíz silvestre (blanco), inserciones en la región reguladora 5' del gen *psy-1* (específico del endospermo) dan como resultado maíz amarillo. Esta coloración parece deberse a un aumento en la expresión del gen *psy-1* que conduce a la acumulación de carotenoides (Palaisa *et al.*, 2003).
6. La concentración de carotenoides lineales en los tejidos de pomelo, es mayor en las variedades rojas como en pomelo Star ruby en el cual se presentan dos genes β -*lyc*, uno de las cuales codifica una enzima β -LYC2a con actividad nula por lo que presenta un bloqueo parcial de la biosíntesis de carotenoides, a nivel de la ciclación del licopeno (Alquézar *et al.*, 2009).
7. La concentración de licopeno es mayor en las variedades rojas de papaya como Taunning (Devitt *et al.*, 2010), lo cual se debe a una inserción una TT en la posición 881 del gen β -*lyc2*, lo cual produce una enzima β -LYC2 con actividad catalítica nula.

El modelo de síntesis de bixina propuesto por Bouvier *et al.*, 2003, para la síntesis de bixina, con el cual se demostró que el licopeno es el sustrato a partir del cual las enzimas de corte de carotenoides actúan para producir bixina, teniendo en cuenta que a mayor

concentración de licopeno (sustrato), es probable que se sintetice mayor cantidad de bixina (producto). Tomando en cuenta los puntos anteriores y los datos reportados por valdez-ojeda *et al.*, (2008), que señala que las características fenotípicas particulares de las variantes de *Bixa orellana* fruto rojizo y flor violeta, están asociadas a la producción y rendimiento de bixina, proponemos que el polimorfismo detectado en las variantes rojas de *Bixa orellana* para las secuencias del gen β -*lyc*, que codifica una enzima con una posible actividad β -LYC nula, que evita a síntesis de b-caroteno a partir del licopeno, tal como se reporta en naranja, toronja y papaya, lo cual conlleva a la acumulación de licopeno. Una acumulación de licopeno (principal precursor de la bixina) permitirá una mayor disponibilidad de sustrato para las enzimas CCD's y por ende mayor síntesis de bixina (Bouvier *et al.*, 2003).

4.4.3. Discusión referente a secuencias del gen carotenoide dioxigenasa

La inespecificidad de los productos de amplificación de los cebadores dg, ccd1 y ccd2 se debe a que las secuencias correspondientes a la familia de genes *ccd*, posee regiones muy conservadas tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Estando reportadas en el genoma de *Arabidopsis thaliana* nueve genes similares a *viviparous 14* (*vp14*) mutante reportado en maíz (Bao-Cai *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997), cinco de los cuales están involucrados en las síntesis de ácido abscísico (Luchi *et al.*, 2001 y Tan *et al.*, 2003). Los cuatro genes restantes se han denominado dioxigenasas de corte de carotenoides (CCD)₂ para distinguirlas de las enzimas correspondientes para la síntesis del ácido abscísico (Turnbull *et al.*, 2002 y Booker *et al.*, 2004).

REFERENCIAS

- Alquézar B, Zacarias L, Rodrigo MJ. (2009). Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene b-cyclase from Citrus and its relation to lycopene accumulation. *Journal of Experimental Botany* 60, 1783–1797.
- Arce, J. (1999). El achiote *Bixa orellana* L. Cultivo promisorio para el trópico. In, Earth, first ed. Turrialba, Costa Rica, p. 149.
- Bao-Cai T, Schwartz SH, Zeevart JAD, McCarty DR. (1997). Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 12235-12240.
- Bartley GE, Scolnik PA. (1995) Plant carotenoids, pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell.* 7, 1027-1038.
- Booker, J., Auldridge, M., Wills, S., McCarty, D., Klee, H., and Leyser, C. (2004) *Curr. Biol.* 14, 1232–1238.
- Bouvier F, Dogbo O, Cámara B. (2003). Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annato). *Science* 300, 2089-2091.
- Buttler, J. (2001). Forensic ADN Typing., Biology & Technology behind STR Markers. Academic, California, USA. p 322.
- Dellaporta SL, Wood J, and Hicks JB. (1983). A plant ADN miniprep, version II. *Plant Mol Biol Rep* 1, 19-21.
- Devitt, Luke C., Kent Fanning, Ralf G. Dietzgen, and Timothy A. Holton. (2010). Isolation and functional characterization of a lycopene β -cyclase gene that controls fruit colour of papaya (*Carica papaya* L.) *JXB Advance Access* published on January 1, DOI 10.1093/jxb/erp284. *J. Exp. Bot.* 61, 33-39.
- Echevarria-Machado, I, L.A. Sánchez-Cach, C. Hernández-Zepeda, R. Rivera-Madrid, O.A. Moreno-Valenzuela. (2005). *Mol. Biotechnol.* 31, 129.
- Flint-Garcia, S.A., A. C. Thuillet, J.M. Yu, G. Pressoir, S.M. Romero, S.E. Mitchell, J. Doebley, S. Kresovich, M.M. Goodman, and E.S. Buckler. (2005). Maize association population a high resolution platform for QTL dissection. *Plant Journal* 44, 1054-1064.
- Harjes C., Torbert R. Rocheford, Ling Bai, Thomas P. Brutnell, Catherine Bermudez Kandianis, Stephen G. Sowinski, Ann E. Stapleton, Ratnakar Vallabhaneni, Mark Williams, Eleanore T. Wurtzel, Jianbing Yan, Edward S. Buckler. (2008). Tapped for Maize Biofortification Natural Genetic Variation in Lycopene Epsilon. *Science.* 319, 330.

- Ikoma, Y., Komatsu, A., Kita, M., Ogawa, K., Omura, M., Yano, M., y Moriguchi, T. (2001). Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. *Physiol. Plant.*, 111(2), 232-238.
- Kato, M., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H., y Yano, M. (2004). Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol.*, 134 (2), 824-837.
- Khan, M y Mackinney, G. (1953). Carotenoids in grapefruit, citrus Paradisi. *Plant Physiol.*, 28(3), 550-552.
- Kishimoto, S y Ohimiya, A. (2006). Regulation of carotenoid biosynthesis in petals and leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). *Physiol. Plant.*, 128(3), 436-447.
- Li, L., Lu, S., Cosman, K. M., Earle, E. D., Garvin, D.F., y O'Neill, J. (2006). β -Carotene accumulation induced by the cauliflower *Or* gene is not due to an increased capacity of biosynthesis. *Phytochemistry*, 67(12), 1177-1184.
- Li, L., Paolillo, D. J., Parthasarathy, M. V., Dimuzio, E. M., y Garvin, D. F. (2001). A novel gene mutation that confers abnormal patterns of β -carotene accumulation in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). *Plant J.*, 26(1), 59-67.
- Lu, S., Van Eck, J., Zhou, X., Lopez, A. B., O'Halloran, D. M., Cosman, K. M., Conlin, B. J., Paolillo, D. J., Garvin, D. F., Vrebalov, J., Kochian, L. V., Kupper, H., Earle, E. D., Cao, J., y Li, L. (2006). The cauliflower *or* gene encodes a ADN, cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of β -carotene accumulation. *Plant cell*, 18(12), 3594-3605.
- Luchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2001) *Plant J.* 27, 325-333.
- Mckeowon, G.G. and Mark, E. (1962). The Composition Of Oil-soluble Annatto Food Colors. *J. Of The A.O.A.A.* 45, 761-766.
- Palaisa, K. A., Morgante, M., Williams, M., y Rafalski, A. (2003). Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci. *Plant cell*, 15(8), 1795-1806.
- Qin, G., Gu, H., Ligeng Ma., Peng, Yiben., Wang, X, D., Chen, Z., Qu, L. (2007). Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid and gibberellin biosynthesis. *Cell Res.* 17,471482.
- Rivera-Madrid, R., R.M. Escobedo-GM, E. Balam- Galera, M. Vera-Ku, and H. Harries. (2006). Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). *Sci. Hort.* 109,165-172.

- Rodrigo, M. J. Marcos, J.F., y Zacarías, L. (2004). Biochemical and Molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus Sinencis* L.) during fruit development and maturation. *J. Agric. Food Chem.*, 52(22), 6724-6731.
- Rodríguez AL, 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. *Mol Biotech* 41,1-6
- Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JAD, McCarty DR. (1997). Specific Oxidative cleavage of carotenoides by VP14 of Maize. *Science* 276, 1872-1874.
- Tan, B. C., Joseph, L. M., Deng, W. T., Liu, L. J., Li, Q. B., Cline, K., and McCarty, D.R. (2003) *Plant J.* 35, 44-56.
- Tumbull, C. G. N., Booker, J. P., and Leyser, H. M. O. (2002) *Plant J.* 32, 255-262.
- Valdez-Ojeda R, Aguilar-Espinosa M, Ortiz R. Quiros CF, Stefanoni-Hernández, JL, and Rivera-Madrid R. (2008). Assessing genetic variation for morphological traits and molecular markers in annatto (*Bixa Orellana* L.) in Yucatan, México. *HORTSCIENCE* 43(7), 2013-2017.
- Wang, C., J. Todd, and L. O. Vodkin, (1994). Chalcone synthase mRNA and activity are reduced in yellow soybean seed coats with dominant I alleles. *Plant Physiol.* 105, 739-748.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

La planta de achiote (*Bixa orellana* L.) presenta una amplia variabilidad fenotípica en cuanto a forma y color de frutos, así como del porcentaje de bixina almacenado en las semillas de achiote en las distintas variantes de esta planta, lo cual parece estar relacionado a nivel de secuencias en los genes involucrados en la ruta de síntesis de los carotenoides tal como se ha demostrado en cultivos de toronja y papaya.

Los parámetros establecidos para la clasificación de los cultivares basados en el contenido de bixina y características morfológicas, facilitan la selección de genotipos con características de interés comercial, para el programa de mejoramiento genético de achiote que se está llevando a cabo por nuestro grupo.

Los tres protocolos de extracción de ADN empleados en este trabajo; Dellaporta y colaboradores (1983), kit QIAGEN DNeasy Blood & tissue para tejido animal y kit QIAGEN para tejido vegetal DNeasy Plant Mini, permitieron obtener un ADN genómico de buena calidad en la mayoría de las muestras.

Se estableció la metodología para el desarrollo y aplicación de la técnica SSCP's para achiote empleando secuencias involucradas en la síntesis de carotenoides. Los resultados de la aplicación de la técnica SSCP en achiote, empleando cebadores *pds2*, *pds3* y β -*lyc* específicos para los genes *pds* y β -*lyc*, permitieron analizar la variación presente en las secuencias amplificadas de genes presentes en la ruta de biosíntesis y acumulación de carotenoides para achiote.

El peso molecular del producto de PCR influyó para definir las condiciones más adecuadas de electroforesis para el desarrollo y aplicación de la técnica SSCP de acuerdo al tamaño de la secuencia.

Las plantas de achiote con características fenotípicas de fruto rojizo y bixina en la semilla superior al 2.15%, presentaron perfiles SSCP's para las secuencias del gen *pds* distintos de los individuos de fruto verde y bixina en la semilla inferior al 2.15%. Contrariamente a lo ocurrido en las secuencias del gen *pds*, los perfiles SSCP's generados por los cebadores para secuencias del gen *β-lyc*, no presentaron asociación con alguna característica particular, sin embargo detectaron mayor número de polimorfismos entre los individuos analizados.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con estudios realizados en papaya y toronja, en los cuales la concentración de carotenoides es mayor en las variedades rojas, producto de la acumulación de licopeno; siendo en achiote el licopeno el principal precursor en la síntesis de bixina por acción de enzimas de corte de carotenoides.

La heterogeneidad presente en las variantes de achiote, en relación al color de la flor, fruto inmaduro y porcentaje de bixina acumulado en las semillas, está relacionada con la variación alélica de los genes *pds*, *β-lyc* y *ccd* que participan en la síntesis de carotenoides y bixina.

Las variaciones a nivel de secuencias que se presentan en el perfil de bandeo SSCP's, en las variantes de *Bixa orellana*, pueden conducir a desarrollar herramientas para la identificación de las plantas con características asociadas a producción de altos rendimientos de bixina u otro carotenoide.

CAPÍTULO VI PERSPECTIVAS

Dados los resultados positivos se propone analizar otras secuencias correspondientes a genes involucrados en la síntesis de pigmentos y carotenoides en el genoma de *Bixa orellana*, para detectar más variaciones genéticas y contar con más marcadores, teniendo así la oportunidad de elegir los patrones SSCP's asociados a pigmentos específicos en achiote.

Realizar la secuenciación de las bandas amplificadas para corroborar la presencia de las mutaciones y confirmar que cambios genéticos se están presentando, comparar por alineamiento productos de amplificación de los mismos cebadores empleados en ADN genómico *Bixa orellana*, y de este modo determinar la ubicación exacta de los supuestos intrones y/o regiones que provocan que el producto amplificado en ADN, sea mayor al esperado.

También se puede considerar la idea de extrapolar los hallazgos y verificar si los perfiles de bandeo se reproducen en plantas con características similares, con el fin de robustecer la posible función de contar con un marcador útil en la detección de tipo y concentración de un carotenoide dado. Es también permitiría una selección de material genético élite en achiote para su mejoramiento genético.

CAPÍTULO VII ANEXOS

7.1. Medición del porcentaje de bixina

Número de semillas por cápsula.- Es el número de semillas que presenta la cápsula en la madurez comercial. En el presente trabajo se midió el número de semillas de entre 5 y 10 frutos por variante.

Contenido de bixina.- Es el porcentaje de bixina que presentan las semillas. Para su determinación se obtendrá un extracto de las semillas de cada variante (Rivera-Madrid, *et al.*, 2006) y se midió espectrofotométricamente el contenido de bixina, de acuerdo al método reportado por Mckeown y Mark (1962), el cual versa como sigue:

En un tubo cónico de 50 mL se adicionan 0.1 g de semilla (por muestra) y se agregaron 15 mL de cloroformo (q. p), posteriormente la mezcla se agitó durante 5 minutos con ayuda de un vortex dispuesto a velocidad máxima. El proceso descrito anteriormente, se repitió en dos ocasiones, con el objetivo de extraer a totalidad la bixina de las semillas. Los extractos obtenidos en cada ocasión se mezclaron en un solo tubo cónico de 50 mL. Seguidamente se toma una alícuota de 400 μ L del extracto obtenido y 1600 μ L de cloroformo (q. p), se depositan en una celda de cuarzo de 2 mL y se mide la absorbancia del extracto en un espectrofotómetro de luz visible, calibrado a una longitud de onda de 500 nm. Las longitudes de onda se aplicaron en la siguiente fórmula para obtener un estimado del porcentaje de bixina en cada variante.

$$B = (\lambda_{500} / 282.6) (F s) (100 / \text{Peso seco})$$

Donde:

B= Porcentaje de bixina.

λ_{500} = Absorbancia leída a 500 nm.

Fs= Factor de dilución

Peso seco= Peso de la muestra (semillas), ajustado a peso seco.

282.6= Factor de corrección.

7.2. Determinación de calidad del ADN genómico

a) Determinación de compuestos contaminantes (Sambrook *et al.*, 1989). Se constató la presencia o ausencia de compuestos contaminantes en los extractos obtenidos de ADN genómico, en función a la relación entre las absorbancias leídas a 260 y 280 nm. El cálculo se describe a continuación:

$$\text{Absorbancia leída a 260 nm} / \text{Absorbancia leída a 280 nm} = X$$

Donde:

Si X es menor a 1.8, entonces el extracto revela la presencia de contaminantes.

Si X es mayor a 1.8, entonces el extracto revela la ausencia de contaminantes.

b) Rendimiento (Allen *et al.*, 1972; Berger, 1987). Se calculó considerando la absorbancia del ADN genómico a 260 nm. Lo anterior, en función a la constante del ADN, la cual señala que la absorbancia leída al ADN doble hebra a 260 nm, en una celda de 1 cm de largo es de 50 µg/mL. El cálculo se describe a continuación:

$$\text{Rendimiento } (\mu\text{g/mL}) = (A) (\text{Constante del ADN}) (\text{factor de dilución})$$

Donde:

Constante del ADN = 50 µg/mL

Factor de dilución (1:200) = 200

A= Absorbancia leída a 260 nm

REFERENCIAS

- Allen, F. S. (1994). Usefulness of Plant Genome Mapping to Plant Breeding. In: Gresshoff, P. (editors). Plant Genome Analysis: Current Topics in Plant Molecular Biology. CRC Press Inc. United States of América. pp 11-18.
- Berger, S. (1987). P-Labeled and Unlabeled Nucleic Acids. Methods in Enzymology. Academic Press, Inc. Vol. 52, 49-50.
- Mckeown, G.G. and Mark, E. (1962). The Composition Of Oil-soluble Annatto Food Colors. J. Of The A.O.A.A. 45, 761-766.
- Rivera-Madrid, R., R.M. Escobedo-GM, E. Balam-Galera, M. Vera-Ku, and H. Harries. (2006). Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). Sci. Hort. 109, 165-172.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. (2ndedn), Cold Spring Harbor, New York.