



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN DE LA VARIACIÓN ALÉLICA
EN GENES INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS
DE CAROTENOIDES EN *BIXA ORELLANA* L.**

Tesis que presenta

JOSÉ ABRAHAM TRUJILLO HERNÁNDEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología
Molecular)

Mérida, Yucatán, México

MAYO, 2013



FORJADO EN
CIENCIAS
BIOLÓGICAS



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

DE CAROTENOIDES EN BIXA ORELLANA L.
EN GÉNES INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS
DE LA VARIACIÓN ALÉLICA
CARACTERIZACIÓN DE LA VARIACIÓN ALÉLICA

Tesis que presenta

JOSÉ ABRAHAM TRUJILLO HERNÁNDEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología y Biología

Molecular)

Mérida, Yucatán, México

MAYO, 2013



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado caracterización de la variación alélica en genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides en *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 de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 16 de Mayo del 2013

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____



Nombre: Q.F.B. José Abraham Trujillo Hernández

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado Análisis de la variación alélica en genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides en *Bixa orellana* L., bajo la dirección de la Dra. Renata Rivera Madrid.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Luz María por ser la persona en enseñarme lo que es el amor incondicional, una fuerza espiritual y esencial que todo ser vivo debe sentir desde su nacimiento y que debe acrecentarse a través de los efímeros años.

A mi padre José quien ha sido para mí un ejemplo de fortaleza y sabiduría, ambas virtudes imprescindibles para ser un excelente científico y ser humano.

A Dulce María Flores por ser la persona que ha estado conmigo en todo momento y en toda circunstancia. Es ella sin duda la prueba infalible de que en este mundo en verdad existen ángeles.

A la Dra. Renata Rivera por sus consejos y asesoramiento en los experimentos realizados durante la realización del proyecto de investigación en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, además de su soporte, apoyo y amistad incondicional en mi formación.

A la M.C Margarita Aguilar por su apoyo imprescindible durante mi estancia en el laboratorio de la Dra. Renta Rivera en el CICY y por su valioso afecto y a amistad.

A la Dra. Luisa López por su asesoramiento y amistad en mi trabajo de tesis y por su importante apoyo durante mi formación.

Al Dr. Luca Comai del Genome Center en la Universidad de Davis California por sus consejos e instrucción durante mi estancia de Investigación.

Al comité de revisión por sus observaciones y correcciones en el trabajo de investigación.

A la beca brindada por el Consejo de Ciencia y Tecnología (Ref. 254639) para realizar estudios de posgrado en el programa de Maestría en Ciencias Biológicas en el Centro de Investigación Científica de Yucatán.

A la beca mixta otorgada por el Consejo de Ciencia y Tecnología (Ref. 290674) para participar en una estancia de investigación en la Universidad de Davis California, USA.

Al proyecto de investigación de la Dra. Renata Rivera Madrid (SEP-CONACYT Ref. 98508), análisis de genes clave asociados a la variación en la producción de pigmentos en cultivos de importancia comercial a nivel nacional e internacional.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por permitirme hacer uso de sus instalaciones y por su participación en mi formación académica.

DEDICATORIAS

A mis padres que son las personas más importantes en mi vida y a Dulce María por ser la musa que me inspira a ser cosas excepcionales.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1. GENERALIDADES.....	3
1.1.1. <i>BIXA ORELLANA</i> L.....	3
1.1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	4
1.1.3. USOS DE ACHIOTE.....	6
1.1.4. CAROTENOIDES.....	7
1.1.5. BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN PLANTAS SUPERIORES.....	9
1.1.6. APOCAROTENOIDES.....	11
1.2. BIXINA.....	12
1.2.1. BIOSÍNTESIS DE BIXINA.....	12
1.2.2. USOS DE LA BIXINA.....	14
1.3. MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL.....	14
1.3.1. BASES GENÉTICAS-MOLECULARES DEL MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL.....	15
1.3.2. VARIACIÓN GENÉTICA.....	16
1.3.3. CAUSAS DE LA VARIACIÓN GENÉTICA.....	16
1.3.3.1. MUTACIÓN.....	16

1.3.3.2.	MIGRACIÓN	17
1.3.3.3.	DERIVA GENÉTICA.....	17
1.3.3.4.	SELECCIÓN NATURAL	18
1.3.3.5.	DIVERSIDAD ALÉLICA.....	18
1.4.	MÉTODOS GENÉTICO-MOLECULARES UTILIZADOS EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO	20
1.4.1.	MARCADORES	20
1.4.1.1.	MARCADORES MORFOLÓGICOS.....	20
1.4.1.2.	MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	20
1.4.1.3.	MARCADORES MOLECULARES.....	20
1.5.	SNP (POLIMORFISMO EN UN SOLO NUCLEÓTIDO).....	21
1.6.	SSCP (ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA)	22
1.7.	HIPÓTESIS	24
1.8.	OBJETIVO GENERAL.....	25
1.8.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
1.9.	JUSTIFICACIÓN	26
	BIBLIOGRAFÍA.....	28
	CAPÍTULO II	39
	AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DE LOS GENES; LICOPENO BETA CICLASA (β-<i>lcy</i>) Y FITOENO DESATURASA (<i>pds</i>) EN <i>BIXA ORELLANA</i> L.....	39
2.1.	INTRODUCCIÓN	39

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.2.1. IDENTIFICACIÓN <i>IN SILICO</i> DE LOS GENES <i>PDS</i> Y <i>B-LCY</i> EN CONTIGS DE UN TRANSCRIPTOMA DE <i>BIXA ORELLANA L.</i>	41
2.2.2. AMPLIFICACIÓN POR PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA) Y CLONACIÓN DE LOS GENES <i>B-LCY</i> Y <i>PDS</i> EN <i>BIXA ORELLANA L.</i>	41
2.2.3. ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y BIOINFORMÁTICO DE LOS GENES <i>B-LCY</i> Y <i>PDS</i>	42
2.3. RESULTADOS.	43
2.3.1. AISLAMIENTO DEL GENE LICOPENO BETA CICLASA (<i>B-LCY</i>) EN <i>BIXA ORELLANA L.</i>	43
2.3.2. AISLAMIENTO DEL GEN LICOPENO BETA CICLASA	44
2.3.3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL GEN <i>B-LCY</i>	48
2.4. AISLAMIENTO DEL GEN <i>PDS</i> EN ACHIOTE	51
2.5. DISCUSIÓN	58
BIBLIOGRAFÍA	60
CAPÍTULO III	65
DETECCIÓN DE SNP (CAMBIOS PUNTUALES EN EL ADN), MEDIANTE LA TÉCNICA SSCP (POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA DE ADN) EN GENES INVOLUCRADOS EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN <i>BIXA ORELLANA L.</i>	65
3.1. INTRODUCCIÓN.	65
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.	66
3.2.1. COLECTA DE LAS MUESTRAS A ANALIZAR.....	66
3.2.2. EXTRACCIÓN DE DNA DE 12 PLANTAS DE ACHIOTE.....	72

3.2.3. PCR-SSCP	72
3.2.4. ANÁLISIS DE BANDAS POLIMÓRFICAS.....	73
3.3. RESULTADOS.....	74
3.3.1. EXTRACCIÓN DE DNA DE DOCE FENOTIPOS DE ACHIOTE.....	74
3.3.2. ANÁLISIS DEL GEN <i>PDS</i> CON LA TÉCNICA SSCP EN DOCE FENOTIPOS DE ACHIOTE.....	76
3.3.3. ANÁLISIS DEL GEN <i>B-LCY</i> CON LA TÉCNICA SSCP EN DOCE FENOTIPOS DE ACHIOTE	79
3.3.3.1. DISEÑO DE PARES DE CEBADORES	80
3.3.3.2. ANÁLISIS POR PCR-SSCP DEL GEN <i>B-LCY</i> EN DOCE FENOTIPOS DE ACHIOTE CON LOS CEBADORES "B".....	83
3.3.4. ANÁLISIS DE LA SECUENCIACIÓN DE BANDAS POLIMÓRFICAS.....	89
3.4. DISCUSIÓN.....	98
BIBLIOGRAFÍA.....	101
CAPÍTULO IV.....	105
DISCUSIÓN GENERAL	105
BIBLIOGRAFÍA.....	109
CAPÍTULO V.....	111
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	111
4.1. CONCLUSIONES.....	111
4.2. PERSPECTIVAS.....	112

ABREVIATURAS

ABA	Acid abscisic acid
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ASO	Allele-specific oligonucleotide
BoBADH	<i>Bixa orellana</i> bixin aldehyde dehydrogenase
BoBMT	<i>Bixa orellana</i> norbixin methyltransferase
BoLCD	<i>Bixa orellana</i> lycopene cleavage dioxygenase
CCD	Carotenoid cleavage dioxygenase
CRTISO	Carotene isomerase
DMAPP	Dimethylallyl diphosphate
EC	European Community
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FAD	Flavin adenine dinucleotide
GPS	Geranyl diphosphate synthase
GGPPS	Geranyl-geranyl pyrophosphate synthase
IPP	Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase
LCR	Ligase chain reaction
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MAS	Marker assisted selection
MEP	Methyl-erythritol phosphate

NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NSY	Neoxhantin synthase
PDS	Phytoene desaturase
Pg	Pico gram
PSY	Phytoene synthase
QTL	Quantitative trait loci
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonucleic Acid
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSCP	Single Strand Conformation Polimorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
TEMED	Tetramethylethylenediamine
ZDS	Zeta-carotene desaturase
ZEP	Zeaxanthin epoxidase
β -LCY	Lycopene beta-cyclase
ϵ -LCY	Lycopene ϵ psilon-cyclase
ζ -ISO	ζ -carotene isomerase

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Planta de achiote ubicada en la plantación “La Extra” Chicxulub Pueblo en el estado de Yucatán México.	4
Figura 1.2 Diversos matices de órganos florales y de frutos presentes en las variantes de achiote.	5
Figura 1.3 Diversos carotenoides derivados de C ₄₀ , C ₃₀ y C ₅₀ , sintetizados por diferentes organismos.	8
Figura 1.4 Vía de biosíntesis de carotenoides en plantas superiores..	10
Figura 1.5 Ruta de biosíntesis de bixina..	13
Figura 1.6 Estrategia experimental.	27
Figura 2.1 Comparación del ORF (marco de lectura abierto) de las secuencia del contig 40528 (β - <i>Icy</i>) con genes ortólogos.....	43
Figura 2.2 Amplificación del gen β - <i>Icy</i> a partir de cDNA.	44
Figura 2.3 Alineamiento del contig40528 con la secuencia clonada en el vector pGEM®-T (Promega).....	47
Figura 2.4 Alineamiento del gen β - <i>Icy</i> de <i>Bixa orellana</i> con genes ortólogos..	48
Figura 2.5 Análisis estructural de la enzima licopeno beta ciclasa de <i>Bixa orellana</i>	49
Figura 2.6 Análisis filogenético de la secuencia del gen β - <i>Icy</i> con genes ortólogos... ..	50
Figura 2.7 Comparación del marco de lectura abierto de la secuencia del contig 1009 con genes ortólogos.....	52

Figura 2.8 Reacción en cadena de la polimerasa utilizando los pares de cebadores PDSa y PDSb para aislar el contig 1009 a diferentes temperaturas de fusión..	53
Figura 2.9 Análisis estructural de la enzima fitoeno desaturasa de <i>Bixa orellana</i> L.	55
Figura 2.10 Análisis filogenético de la secuencia de aminoácidos traducido del contig 1009 con secuencias ortólogas de especies cercanas a <i>Bixa orellana</i> L.	56
Figura 3.1. Análisis electroforético de las extracciones de DNA genómico de doce plantas de <i>Bixa orellana</i> L.	74
Figura 3.2. Resultados de las reacciones de PCR con los pares de cebadores PDS2 y PDS3 con doce plantas de achiote.	77
Figura 3.3. Análisis SSCP con el gen <i>pds</i> en doce fenotipos de <i>Bixa orellana</i> L.	78
Figura 3.4. Resultados del análisis SSCP con el par de cebadores BLYC.	80
Figura 3.5. Representación esquemática de la posición de los pares de cebadores B, a lo largo de la secuencia del gen <i>β-lyc</i>.	83
Figura 3.6. Amplificaciones de PCR con los pares de cebadores B2, B3 y B5 con DNA genómico de doce plantas de achiote.	84
Figura 3.7. Resultados del perfil de bandeo SSCP con los pares de cebadores B2, B3 y B5.	85
Figura 3.8. Reacciones de PCR con doce accesiones de achiote con los pares de cebadores B6, B7, B8 y B9.	86
Figura 3.9. Análisis del perfil de bandeo SSCP con los pares de cebadores B6, B7, B8 y B9 contra el gen licopeno beta ciclasa en achiote.	88
Figura 3.10. Bandas secuenciadas para corroborar la existencia de cambios en la secuencia del gen <i>β-lyc</i> en doce genotipos de achiote.	90

Figura 3.11. Alineamiento de alelos dilucidados con la técnica SSCP y la secuencia de la clonada del gen β -lcy de *Bixa orellana* L. 94

Figura 3.12. Esquematización de la estructura del gen licopeno beta ciclasa y la posición de los SNP en la secuencia. 95

Figura 3.13. Sustituciones de aminoácidos originados por los SNP en el ORF del gen que codifica a la enzima licopeno beta ciclasa en fenotipos contrastantes de achiote..... 97

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1. Características fenotípicas de las accesiones de <i>Bixa orellana</i> L., analizadas con la técnica Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP).	67
Cuadro 3.2. Fenotipos contrastantes en color de flor y fruto de las 12 variantes de achiote usados en el estudio.	68
Cuadro 3.3. Estimación de la concentración de DNA extraído A_{260}, A_{280} y A_{230nm} de doce plantas de achiote.	75
Cuadro 3.4. Características de los cebadores “B” para amplificar regiones de 200 pares de bases en el gen β-<i>lcy</i>.	81
Cuadro 3.5. Resultados de la secuenciación de bandas del análisis SSCP en plantas de achiote.	91

RESUMEN

La bixina (6'-metil-hidrogeno-9'-trans-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato.), es un apocarotenoide que se obtiene del arilo de la semilla de la planta *Bixa orellana* L., Esta planta tropical es originaria del Amazonas y es conocida como achiote. La bixina ocupa el segundo lugar a nivel mundial como colorante natural en la industria alimentaria y farmacéutica. Estudios recientes revelaron la existencia de caracteres morfológicos en las plantas de achiote relacionados con la biosíntesis y acumulación de bixina en sus semillas maduras. Con la ayuda de la técnica SSCP, se logró identificar dos alelos del gen β -*lcy* diferenciados por ocho SNP en su secuencia, los cuales correlacionaron con el color de la flor así como del fruto de las variantes de achiote analizadas. Los resultados obtenidos en este trabajo ayudarán a la generación de marcadores moleculares, para la selección de plantas por su color de flor y fruto, asociado a su vez con una mayor acumulación de bixina.

ABSTRACT

Bixina (methyl hydrogen 9'-cis-6, 6'-diapocarotene-6, 6'-dioate), is a apocarotenoide obtained from the seeds of the plant *Bixa orellana* L best known as annatto, native to the Tropical Amazon. This compound has the second place worldwide as a natural colorant in food and pharmaceutical industry. Recent studies revealed the existence of characters in annatto plants related to the biosynthesis and accumulation of bixina in its mature seeds. With the aid of the SSCP technique, we identified two alleles of the gene β -*lcy* differentiated by eight SNPs in its sequence, which were correlated with the flower color as well as the fruit of the variants analyzed. The results obtained in this study will help to the generation of molecular markers for selection of plants for the flower color and fruit, in turn associated with increased accumulation of bixina.

INTRODUCCIÓN

Bixa orellana L., es un arbusto tropical perenne perteneciente a la familia *Bixaceae*, es cultivado en países y regiones como Perú, Brasil, la India, el Caribe, África oriental entre otros, para la extracción de un pigmento rojo liposoluble (6'-metil-hidrogeno-9'-cis-6,6'diaporoteno 6, 6'dioato), de nombre común bixina, presente en mayor abundancia en sus semillas, las cuales contienen además aceites, sustancias cerosas, minerales y compuestos alcaloides (Leal y Clavijo, 2010a).

La bixina es usada como colorante de varios productos alimenticios, además de tener aplicaciones en la industria farmacéutica. Esto debido a que se encuentra aprobada por diferentes organismos como la FAO (Food and Agriculture Organization), la FDA (Food and Drug Administration), la EC (European Community) así como por la secretaría de salud en México en la NOM-119-SSA1-1994, en la cual se establece como colorante orgánico natural de grado alimentario. Asimismo, este compuesto ocupa el segundo lugar en producción e importancia en el comercio de los colorantes naturales a nivel mundial, con una estimación de consumo de 14,500 toneladas de semillas de achiote al año, con un costo promedio de US\$1100/Mt de semillas (Parimalan *et al.*, 2008). A causa de la importancia global en la producción de bixina y a la gran heterogeneidad en las cantidades de pigmento que presentan los diferentes morfotipos de achiote (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008), el grupo de trabajo de la Dra. Renata Rivera del Centro de Investigación Científica de Yucatán, se ha enfocado en diseñar y llevar a cabo un programa de Fito-mejoramiento con la planta *Bixa orellana* L. Donde se han realizado los primeros estudios bioquímicos y genético-moleculares en diferentes morfotipos de achiote (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008, 2010, Rivera-Madrid *et al.*, 2006, Narváez *et al.*, 2001), así como el establecimiento de aspectos importantes para el mejoramiento genético de la planta, como el contenido de bixina, dehiscencia del fruto y tasa de entrecruzamiento de diferentes cultivares, con el fin de crear las bases para el mejoramiento genético del achiote. Recientemente en el grupo de la Dra. Rivera Madrid se analizó el nivel de transcritos que codifican para las enzimas fitoeno desaturasa (PDS), licopeno ciclasas (beta y épsilon ciclasa: β -LCY, ϵ -LCY respectivamente). Se sabe que estas enzimas juegan un papel fundamental, en la biosíntesis y acumulación de pigmentos durante el

desarrollo en plantas. Así se observó que dichos transcritos codifican para las enzimas mencionadas, fueron los que mostraron los mayores cambios en su expresión con respecto a la variación en la producción de pigmento (Rodríguez-Ávila *et al.*, 2011). Estos conocimientos se utilizaron, para comenzar con estudios encaminados a la obtención de marcadores moleculares, basados en genes involucrados en la síntesis de carotenoides, que permitieran la identificación de cultivares con alto contenido de bixina mediante la técnica SSCP (Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla), técnica usada por vez primera en achiote por Martín-Rodríguez (2010). Los resultados obtenidos con los perfiles SSCP, sugieren que existe variación a nivel de nucleótidos en los genes fitoeno desaturasa y licopeno beta-ciclasa, analizándolos en once variantes de achiote. Sin embargo para confirmar lo anterior es necesario analizar la secuencia de los alelos encontrados, así como estudiar otras regiones de los genes por medio de la técnica SSCP. Este estudio por consiguiente se enfocó en caracterizar la variación alélica presente en los genes *pds* y *β-lyc*, en doce morfotipos de achiote ubicadas en la plantación “La extra”, en la región de Chicxulub Pueblo, Yucatán. Con este proyecto se pretende brindar un conocimiento útil que contribuya al mejoramiento genético de *Bixa orellana* L.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. GENERALIDADES

1.1.1. *Bixa orellana* L.

Bixa orellana L. es una planta tropical diploide ($2n=14$), cuyo genoma posee un tamaño aproximado de 0.39 pg (764 Mpb) (Hanson *et al.*, 2001). Su nombre se le dio en honor a Francisco de Orellana, por ser el descubridor del Amazonas y participe de la conquista del Perú. Es conocida por los nativos de las Antillas como “bixa” mientras que en México se le conoce como “achiote” (Fonnegra *et al.*, 2007). Proviene de América del Sur, donde posiblemente surgió al Oeste del Perú, entre el río Huallaga-Ucayali y el río Madre de Dios-Madeira (Leal y Clavijo, 2010a), de donde posteriormente a través de los conquistadores como de exploradores, es que comienza a dispersarse alrededor del mundo, siendo cultivada en Latino América desde épocas precolombinas, así como en otras regiones del mundo, incluyendo la parte sur de la India (Parimalan *et al.*, 2007). Además de lo mencionado anteriormente, su amplia distribución geográfica se le puede atribuir a la alta capacidad de la planta para sobrevivir a diferentes condiciones ambientales (Alarcón *et al.*, 2006). Las semillas de *Bixa orellana* L., están cubiertas por un compuesto de color rojizo, de nombre “bixina”, que se obtiene por medio de extracciones orgánicas así como también por trituración mecánica. El producto de estas extracciones, ha sido utilizado desde tiempos ancestrales por los nativos del Amazonas, como fuente de pigmento para teñirse la piel y para adornar diversos objetos. Actualmente a causa de la rigidez de las normas actuales en contra del uso de colorantes de origen sintético, este colorante natural es utilizado ampliamente tanto en la industria alimenticia, farmacéutica como así como cosmética, debido a sus aportaciones beneficiosas para la salud (Shuhama *et al.*, 2003).

1.1.2. Descripción botánica

Bixa orellana pertenece a la clase *Magnoliopsida*, sub-clase *Dilleniidae*, del orden de las *Violales*, de la familia *Bixaceae*, que posee un solo género *Bixa*. De acuerdo a Leal y Clavijo (2010a, 2010b) *Bixa* presenta 5 especies: *Bixa orellana*, *Bixa urucurana*, *Bixa platicarpa*, *Bixa arborea* y *Bixa excelsa*. *Bixa orellana* L., se caracteriza por ser un arbusto bajo, de copa compacta (Figura 1.1.), que en algunas variantes es hemisférica, puede alcanzar hasta los diez metros de altura (León, 2000). Las hojas poseen de 10 a 20 cm de largo, son ovado-triangulares, agudas o acuminadas, glabras o densamente lepidotas en el envés (Blair y Madrigal, 2005), tienen de tres a cinco nervaduras principales que salen de la inserción del peciolo; el lado superior de la lámina foliar es verde oscuro y brillante, no obstante en algunas variantes es de tono cobrizo (León, 2000).



Figura 1.1 Planta de achiote ubicada en la plantación “La Extra” Chicxulub Pueblo en el estado de Yucatán México.

Las hojas de *Bixa orellana* L., contienen flavonoides así como un aceite esencial que está compuesto principalmente de sesquiterpenos (Shilpi *et al.*, 2006). Las flores presentan diversos matices desde blanco hasta rosa y tonos de lilas (Figura 1.2.). Se encuentran en panículas terminales, formadas de 5 sépalos cortos y duros; la corola está compuesta de 5 pétalos obovados o cóncavos de 1 a 2 cm de largo (Blair y Madrigal, 2005). El pistilo tiene el ovario unicelular con numerosos óvulos en dos placentas parietales, los estambres crecen adoptando una dirección circular (León, 2000).



Figura 1.2 Diversos matices de órganos florales y de frutos presentes en las variantes de achiote (Rivera-Madrid *et al* 2006).

Como se puede apreciar en la figura 1.2., dependiendo de la variante de achiote, el fruto posee diferentes rasgos fenotípicos, presentando formas hemisféricas, ovoides, elipsoides o cónicas. La mayoría de los frutos exhiben una cubierta de espinas largas y suaves, pero en algunos casos es lisa (Blair y Madrigal, 2005). Los frutos inmaduros muestran distintos matices que van desde verdes, marrones hasta rojos, sin embargo cuando llegan a la madurez todos se tornan color de café, teniendo de 10 a 50 semillas en su cápsula (Mercadante *et al.*, 1996). Las semillas al igual que el fruto tienen diversas formas y tamaños oscilando entre 3-4 milímetros de largo. La testa es rígida, su capa externa es un tegumento membranoso, debajo del cual existe una zona de parénquima acuoso, en el centro de la semilla se localiza el embrión (León, 2000). El pericarpio contiene una alta concentración de carotenoides compuesta principalmente por *cis*-bixina (Gómez-Ortiz *et al.*, 2010).

1.1.3. Usos de achiote

Bixa orellana es un arbusto perenne que produce frutos espinosos de color rojos y verdes de forma ovalada y flores con distintos matices que nacen en panículas terminales, por lo que posee un potencial valor ornamental. Las semillas contienen compuestos fenólicos y moléculas derivadas de los carotenoides como bixina y norbixina, usados en la industria alimentaria y farmacéutica como colorantes naturales (Chiste *et al.*, 2011, Venugopalan *et al.*, 2011). La bixina además es utilizada por los indígenas americanos para teñirse la piel con motivos religiosos así como para repeler insectos y para acelerar el proceso de cicatrización de heridas (Venugopalan *et al.*, 2011, Leal y Clavijo, 2010b). En la industria avícola se utiliza la harina de achiote en la dieta de gallinas ponedoras para dar un tono uniforme e intenso al color amarillo de la yema de huevo, que es una característica importante para su aceptabilidad en el comercio. Se ha visto además, que la adición de 2.0% de bixina al alimento de las aves incrementa la viscosidad de la clara de huevo por corto plazo durante los periodos de almacenamiento, lo cual favorece la integridad de la yema de huevo (Spada *et al.*, 2012, Leal y Clavijo, 2010a). Las hojas de las plantas son usadas en infusiones y decocciones en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el riñón, la próstata, el tracto urinario, páncreas, dolores de cabeza así como infecciones microbianas y mordeduras de serpientes (Giuliano *et al.*, 2003, Monigatti *et al.*, 2012). Además se sabe que de la corteza de las ramas de la planta, se extrae una sustancia que comparte

propiedades similares a la de la goma arábica (Venugopalan *et al.*, 2011, Leal y Clavijo, 2010b). Las raíces se utilizan para mitigar la tos y problemas digestivos. Infusiones de las flores de achiote son consumidas para aliviar trastornos regulatorios y como purgante (Leal y Clavijo, 2010b).

1.1.4. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos que pertenecen a la familia de los isoprenoides donde la mayoría derivan del C₄₀ fitoeno aunque pueden encontrarse carotenoides derivados de C₃₀ como la staphyloxantina identificada en *Staphylococcus aureus* (Pels *et al.*, 2005), y C₅₀ como la decaprenoxantina encontrada en *Corynebacterium glutanicum* (Krubasik *et al.*, 2001) (Figura 1.3.). Dependiendo de su estructura química, pueden ser divididos en dos grupos: carotenos hidrocarbonados, que están compuestos de carbono e hidrógeno y xantofilas que son derivados hidrocarbonados oxigenados, los cuales poseen por lo menos un oxígeno que forma parte de un grupo funcional: hidroxilo, ceto, epoxi, metoxi o de grupos de ácidos carboxílicos (Rodríguez-Bernaldo y Costa, 2006). En las plantas se sintetizan en los plastos, impartiendo diversos colores a los tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos (Zhu *et al.*, 2010), dichos matices provocan la atracción de animales e insectos que contribuyen al proceso de polinización así como también a la dispersión de la semilla (Simkin *et al.*, 2010). En la célula vegetal se encuentran unidos en un complejo proteico, llamado LCHII que transfiere la energía capturada de la luz a la clorofila, actuando de esta manera como colectores de luz y como fotoprotectores al eliminar el exceso de energía, evitando de esta manera daño a la membrana y a las proteínas (Cazzonelli, 2011). En plantas los carotenoides actúan también como precursores para la síntesis de reguladores de crecimiento, como el ácido abscísico, la estrigolactona y moléculas señalizadoras. En los mamíferos los carotenoides desempeñan importantes funciones, ya que sirven de substratos para la síntesis de la vitamina A (β -caroteno) que es fundamental para el correcto funcionamiento de los aparatos oculares en mamíferos. En los humanos una deficiencia en la ingesta de carotenos con anillos beta terminales, resulta en el aumento de casos de xerofthalmia sobre todo en infantes (Harjes *et al.*, 2008). Además se ha reportado para algunos carotenoides, efectos benéficos en el tratamiento contra las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Cazzonelli, 2011, Fassett y Coombes 2011). Por otro lado

también participan en el comportamiento y reproducción animal, como en el caso de los pinzones que acumulan β -criptoxantina en su plumaje, confiriéndole mayor posibilidad de encontrar pareja para el apareamiento, lo cual va a depender de la intensidad y tipo de color producido por el carotenoide (McGraw *et al.*, 2006). Así mismo se encuentran involucrados de manera imprescindible en la supervivencia, como el caso de los áfidos, que es el primer animal en el que se reporta la existencia de una maquinaria para la biosíntesis de carotenoides (Moran y Jarvik, 2010). Los áfidos acumulan diferentes tipos de pigmentos como γ -caroteno y toruleno, que les brindan matices entre rojo y verde, la biosíntesis como acumulación del tipo de compuesto dependerá de las preferencias de sus depredadores (Moran y Jarvik, 2010).

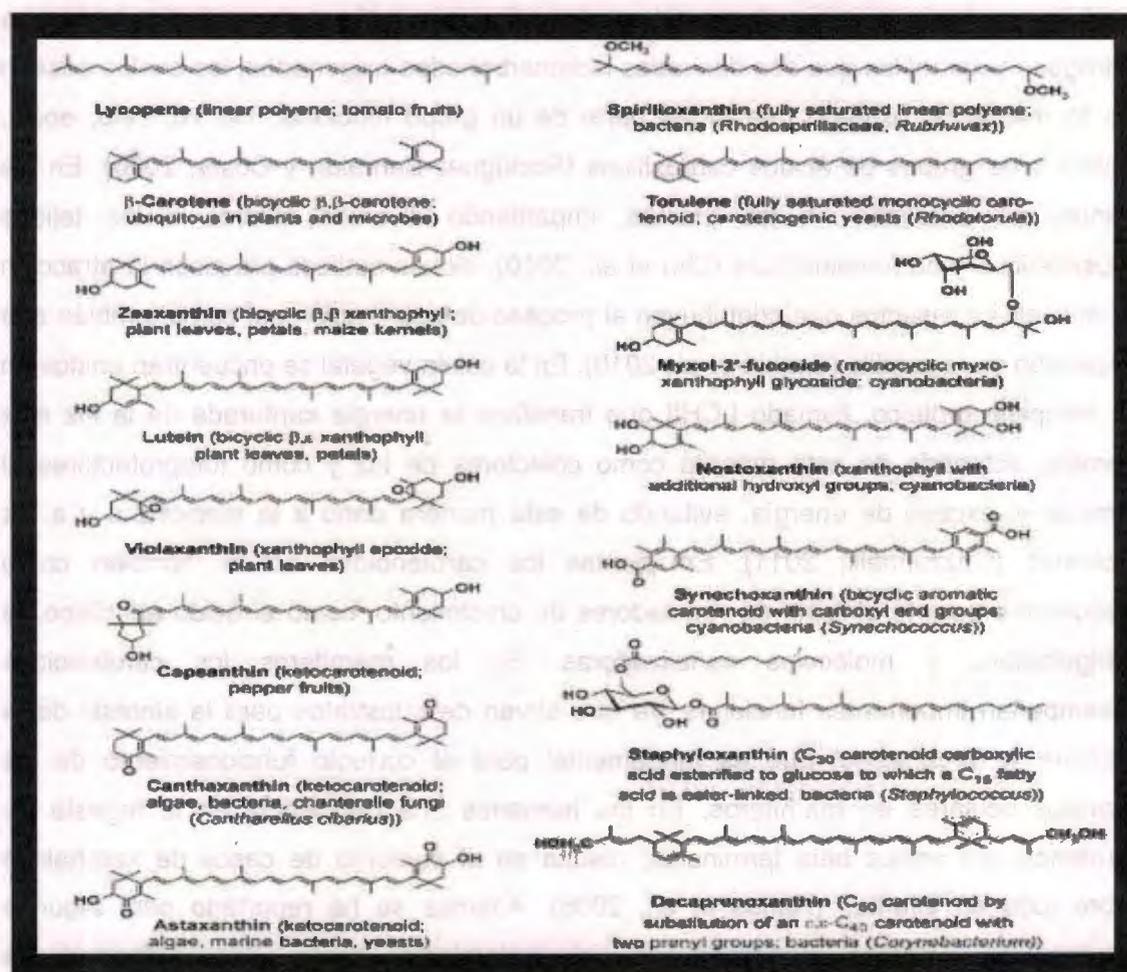


Figura 1.3 Diversos carotenoides derivados de C_{40} , C_{30} y C_{50} , sintetizados por diferentes organismos (Walter y Strack 2011).

Los carotenoides son pigmentos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, se tienen descubiertos alrededor de 700 carotenoides sintetizados tanto por organismos fotosintéticos como no fotosintéticos. No obstante aún falta caracterizar varios carotenoides y dilucidar sus rutas biosintéticas, lo cual ha sido posible en algunos casos con la ayuda de herramientas bioquímicas y moleculares usadas en especies modelo como *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum*, *Zea mays* entre otros (Walter y Strack, 2011).

1.1.5. Biosíntesis de carotenoides en plantas superiores

En plantas los carotenoides son sintetizados de *novo*, a partir de la isomerización del precursor isopentenil difosfato (IPP) a dimetilalil difosfato (DMAPP). La reacción ocurre por la vía MEP (metil eritrol 4-fosfato plastídica), como se muestra en la figura 1.4.

La condensación de tres unidades de IPP y una molécula de DMAPP produce geranylgeranyl difosfato (GGPP) una reacción catalizada por la enzima GGPP sintasa (GGPPS). La condensación de dos moléculas de GGPP por la fitoeno sintasa (PSY) producen el precursor 15-*cis*-fitoeno (C_{40}), que es convertido en un compuesto rojo brillante, el *trans*-licopeno, el primer pigmento de tipo carotenoide (Cunningham y Grant, 1998), en una serie de cuatro desaturaciones catalizadas por la fitoeno desaturasa (PDS), ζ -caroteno isomerasa (z-ISO), ζ -caroteno desaturasa (ZDS) y la carotenoide isomerasa (CRTISO). El producto de la primera desaturación es el 9,15, 9'-*tris-cis*- ζ -caroteno, el cual sufre una isomerización por la z-ISO y 9,9'-*di-cis*- ζ -caroteno, el substrato para ZDS. El producto final de las reacciones de desaturación es el 7, 9, 7', 9'-*tetra-cis*-licopeno, el cual es convertido al *trans*-licopeno por la enzima CRTISO como se muestra en la figura 1.4.

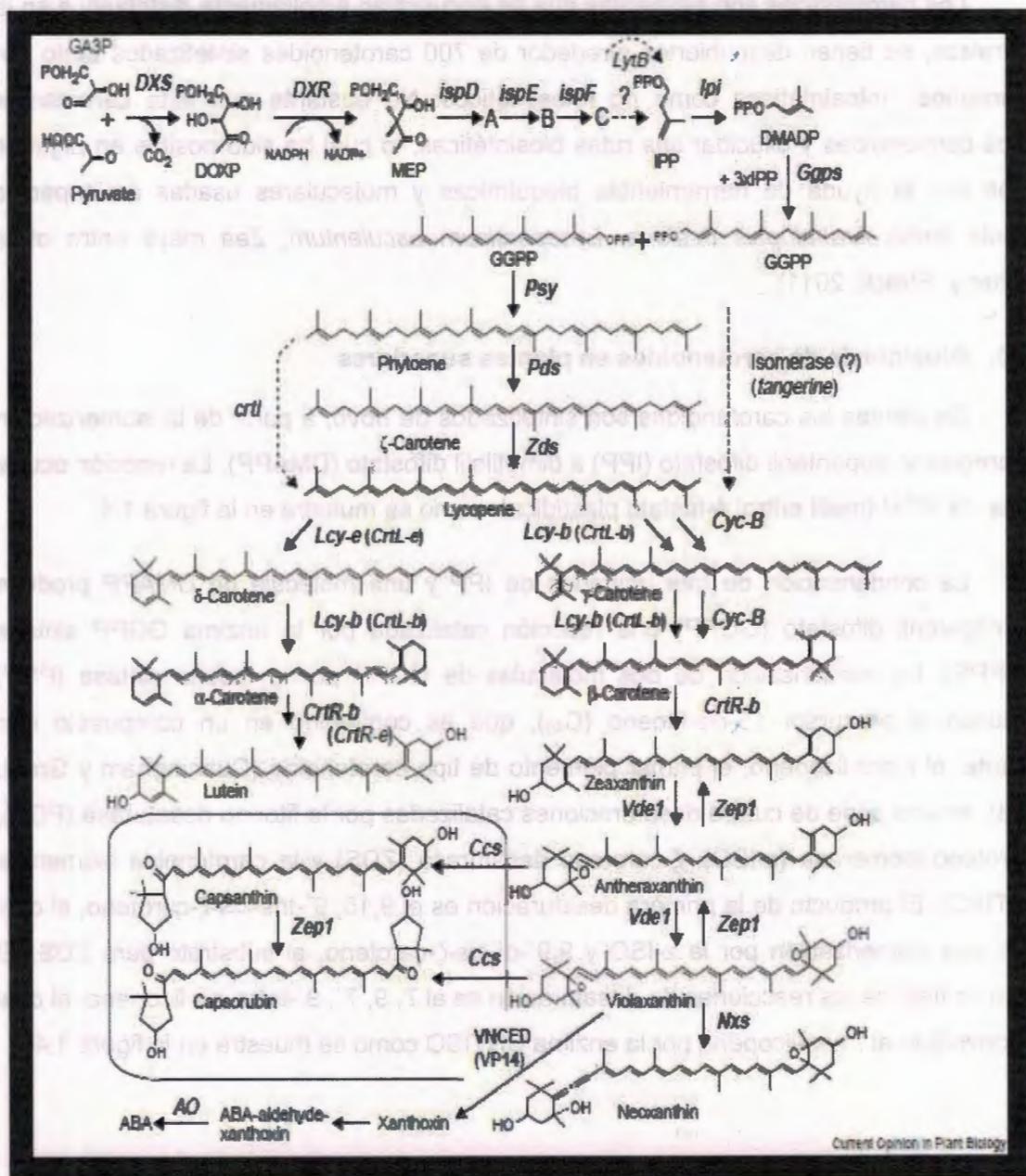


Figura 1.4 Vía de biosíntesis de carotenoides en plantas superiores. Usando como sustrato al Gliceraldehído-3-fosfato y Piruvato, se generan los precursores a través de la ruta MEP (Metil-Eritrol-4-Fosfato-Plastídica) para la biosíntesis de carotenoides, sintetizando fitoeno como el primer compuesto de tipo carotenoide y precursor de una gama muy diversa de carotenoides que finaliza con la síntesis de luteína y neoxantina (Lichtenthaler *et al.*, 2006, Lichtenthaler *et al.*, 1997, Hirschberg, 2001).

El licopeno representa el punto de ramificación de la vía de los carotenoides, debido a que sirve de sustrato para dos enzimas finamente reguladas, la licopeno β -ciclase (β -LCY) y la licopeno ϵ -ciclase (ϵ -LCY), ambas enzimas ciclan la estructura lineal del licopeno para producir anillos ionona terminales (Lichtenthaler *et al.*, 1997, Hirschberg, 2001, Lichtenthaler *et al.*, 2006). La adición de un anillo beta a licopeno por la β -LCY genera γ -caroteno, y la adición de un segundo anillo beta por la misma enzima produce el pigmento de color anaranjado β -caroteno, el cual es convertido a zeaxantina, para posteriormente ser epoxidada a través de la zeaxantina epoxidasa (ZEP) produciendo violoxantina, la cual es convertida a neoxantina por la neoxantina sintasa (NSY) (Lu y Li, 2008). Alternativamente la adición de un anillo ϵ al licopeno por la ϵ -LYC genera δ -caroteno el cual es sustrato para la enzima β -LCY que adiciona un anillo beta para formar α -caroteno. El alfa caroteno es convertido posteriormente a zeinoxantina por la BCH o CYP97A y CYP97B, y a luteína por la P450- ϵ -hidroxilasa CYP97C. La luteína representa el punto final de la ramificación del alfa caroteno (Zhu *et al.*, 2010).

1.1.6. Apocarotenoides

Los apocarotenoides son el producto del corte oxidativo de los carotenoides. El corte en la estructura de los carotenos puede ser inespecífico por medio de degradación química (como la luz), o específico a través de enzimas que se nombran en conjunto CCDs (Carotenoid Cleavage Dioxygenases). El compuesto resultante puede exhibir la característica pigmentante de su precursor, dependiendo del arreglo de los enlaces dobles conjugados de su estructura química, existiendo la posibilidad además de alterar la tonalidad del color si se le adiciona un grupo carboxilo o ceto (Walter y Strack, 2011).

Los apocarotenoides participan en diversas actividades biológicas, dependiendo del tipo de apocarotenoide producido, como la fitohormona ácido abscísico (ABA) derivada de la escisión de los enlaces dobles en las posiciones 11, 12, de la violoxantina y neoxantina, cuyos niveles en plantas aumenta durante la deshidratación de la semilla así como también en situaciones de estrés, por sequía y salinidad (Taylor y Ramsay, 2005). Otro ejemplo es la vitamina A o ácido retinoico, un compuesto de 20 carbonos producto de la oxidación del beta-caroteno, esencial para el mantenimiento de los aparatos visuales en animales. También existen apocarotenoides usados en la industria, como la beta-

ionona utilizada en la fabricación de perfumes, asimismo el azafrán y la bixina usados como colorantes de productos básicos (DellaPenna y Pogson, 2006).

1.2. BIXINA

La bixina es un apocarotenoide, derivado de la planta *Bixa orellana* L., su estructura ($C_{25}H_{30}O_4$) consiste de una cadena conjugada, con una doble unión alternada con un grupo carboxilo en un extremo de la cadena y un grupo metil-éster en el otro. La norbixina ($C_{24}H_{28}O_4$) es un carotenoide soluble en agua que difiere solo en la presencia de un ácido carboxilo, en la posición del metil éster de bixina (Gómez-Ortiz *et al.*, 2010). La bixina presenta actividad antioxidante, así como la capacidad de proteger al DNA de sustancias que le provocan daños, además a este compuesto no se le han atribuido efectos de tipo genotóxicos o carcinogénicos aun a altas concentraciones (Agner *et al.*, 2004). Este pigmento se encuentra en la forma inestable *cis* en la semilla de la planta, luego pasa a la forma *trans* por extracción con solventes orgánicos o por exposición al calor, por lo tanto la bixina y la norbixina son susceptibles a la degradación por la exposición prolongada a la luz y/o a temperaturas elevadas, es por eso que en los procesos de extracción para uso comercial es importante mantener las semillas resguardadas de fuentes lumínicas (Sajilata y Singhal, 2006). Sin embargo, se ha visto también que los extractos de achiote expuestos a temperaturas altas, o almacenamiento por largo tiempo resultan en altas cantidades de producto degradado, incluyendo varios compuestos del proceso de isomerización como los *trans*-bixina, C_{17} *trans*-monometil éster del ácido 4,8-dimetil-tetradecahexano-dioico, derivado de 9'-*cis*-bixina así como también de componentes volátiles como xileno, tolueno, ácido toloico y el ácido toloico metil éster (Silva *et al.*, 2005).

1.2.1. Biosíntesis de bixina

El mecanismo de biosíntesis de bixina *in planta* permanece incierto. Sin embargo se ha sugerido al licopeno como precursor para la síntesis de bixina. Existen varios modelos de la posible ruta de biosíntesis de bixina. Jako y colaboradores (2002) fueron los primeros en plantear la hipótesis respecto a que debía de existir sólo un número pequeño de genes estructurales involucrados en la biosíntesis de bixina, iniciando a partir de la ruta principal de los carotenoides, y que estos genes debían de tener cierta similitud a aquellos que codifican para dioxigenasas, aldehído oxidasas, aldehído deshidrogenasas

y metil-transferasas, ya que estas enzimas suelen presentarse en rutas biosintéticas similares, como la del ácido abscísico. De esta forma, se logró encontrar candidatos de genes que posiblemente pudieran estar involucrados en la biosíntesis de bixina generando una biblioteca de EST's construida a partir de los arilos de semillas de *Bixa orellana* y seleccionando aquellas enzimas involucradas únicamente con el metabolismo de los isoprenoides, por ejemplo las correspondientes a la ruta DOX/MEP, dentro de las cuales se encontrarían incluidas las implicadas en la biosíntesis de bixina. Tomando en cuenta la similitud estructural entre los pigmentos bixina y azafrán Bouvier y colaboradores (2003) lograron aislar tres genes directamente involucrados en la biosíntesis de bixina, basándose en las secuencias reportadas para enzimas homólogas en *Arabidopsis thaliana* y *Crocus sativus*. De esta forma, Bouvier y colaboradores (2003) demuestran, mediante la co-transformación de una especie recombinante de *Escherichia coli* que acumula licopeno, usando las tres enzimas antes mencionadas, que el paso inicial de la biosíntesis de bixina (Figura 1.5) involucra la conversión de licopeno a bixina aldehído, por acción de la enzima bixina dioxigenasa (BoLCD); asimismo, este compuesto finalmente dará origen al pigmento bixina por acción de dos enzimas, la aldehído deshidrogenasa (BoBADH) y la norbixina metiltransferasa (BoBMT) (Bouvier *et al.*, 2003).

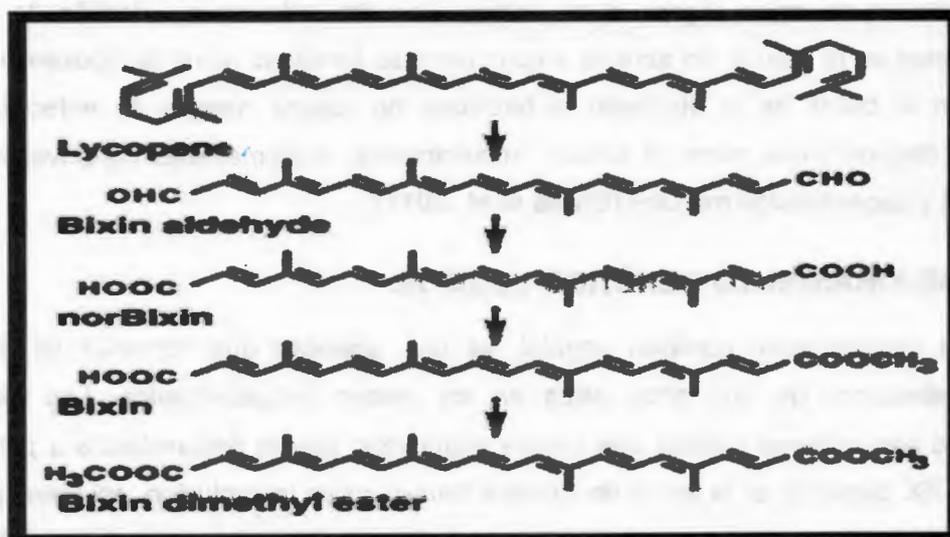


Figura 1.5 Ruta de biosíntesis de bixina. Propuesto por Bouvier y colaboradores (2003).

Hasta hace poco tiempo se había considerado a *Bixa orellana* como el único organismo productor de bixina, sin embargo recientemente se ha encontrado bixina en bajas concentraciones en *Crocus sativus* y *Vitis vinífera* (Walter y Strack, 2011).

1.2.2. Usos de la bixina

La bixina es usada ampliamente en la industria alimentaria como colorante de muchos productos básicos, especialmente en mantequilla, quesos, helados, aceites comestibles, así como también en la industria cosmética y farmacéutica (Parimalan *et al.*, 2007). Se ha visto también que los extractos con etanol de las hojas así como de las semillas de achiote, muestran actividad anti-fúngica y anti-microbiana contra bacterias como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, la levadura *Candida albicans* (Fleischer *et al.*, 2003) *Cryptococcus neoformans* y *Microsporum gypseum* (Navarro-García *et al.*, 2003). Se sugiere además que la bixina puede actuar como un ligando PPAR (receptor de proliferación peroxisomal activado) para regular el metabolismo lipídico y mejorar algunas patologías relacionadas con síndromes metabólicos (Takahashi *et al.*, 2009). La bixina exhibe además efectos quimiopreventivos, modulando la proliferación celular en procesos carcinogénicos de colon (Agnier *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha identificado en las extracciones de la semilla de achiote a componentes fenólicos como la hipoxantina, que junto con la bixina se le atribuyen la habilidad de reducir riesgos de enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer, inflamaciones, enfermedades cardiovasculares, cataratas y degeneración macular (Chisté *et al.*, 2011).

1.3. MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL

El mejoramiento genético vegetal, es una actividad que comenzó de manera dirigida alrededor de 200 años atrás en los países industrializados. Los métodos modernos para obtener plantas con rasgos mejorados, fueron desarrollados a principios del siglo XX, basados en la teoría de Charles Darwin sobre la evolución, así como por los estudios llevados a cabo por Gregor Mendel, Thomas Hunt Morgan, Wilhelm Ludwig Johannsen, Nilsson-Ehle y Edward M. East entre otros (Cleveland *et al.*, 2000).

El proceso de mejora genética en plantas, consiste en la selección de variantes entre una población de especies, que presentan rasgos de interés agronómico importantes o características que se desean mejorar; más tarde las plantas seleccionadas se cruzan, para posteriormente seleccionar entre la progenie segregante, las que manifiestan las características deseadas de los progenitores. De lo anterior se deduce que la base fundamental del fitomejoramiento, es la selección de las plantas élite, así como el análisis de la descendencia, lo cual se torna un problema cuando se habla de una población amplia, por lo que es fácil de apreciar la utilidad de nuevas herramientas y metodologías que puedan ayudar en los programas de mejora genética vegetal, en la selección de plantas élite, como los marcadores moleculares (Collard y Mackill, 2009).

1.3.1. Bases genéticas-moleculares del mejoramiento genético vegetal

En los procedimientos convencionales de mejora genética vegetal, la variabilidad presente en las variedades de un cultivar se identifica y explota considerando el tipo de reproducción del cultivo, pues la metodología empleada en el proceso de mejora se basa en los principios mendelianos. Por lo tanto, es importante conocer el tipo de reproducción de la planta a mejorar. Existen dos tipos de reproducción: sexual y asexual. La primera se lleva a cabo con la unión de dos células especializadas o gametos (fecundación), provenientes de dos organismos distintos, que darán lugar a un organismo, con la mitad de la información genética de cada uno de los progenitores (Bedolla *et al.*, 2002). En las plantas este tipo de reproducción se lleva a cabo por medio de un proceso biológico conocido como polinización, del que se conocen dos tipos: alógamia y autógamia. En la alógamia el polen liberado de la antera de una flor, es transportado al estigma de otra flor, y en la autógamia todo el proceso transcurre en una misma flor. Ambos tipos de polinización pueden incluso existir en una misma planta, tal es el caso de *Bixa orellana* L., en la cual se encontró, por medio de un estudio utilizando un sistema de polinización artificial en variantes de distinta morfología floral, que el 57% posee polinización cruzada mientras que el 31.4% produce autopolinización (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). No obstante Joseph y colaboradores (2012), concluyen en un estudio sobre el tipo de polinización en achiote, basándose en los valores de la tasa de polen/ovulo de la planta, que achiote es alógama. Sin embargo en sus resultados presentan casos en los que existe plantas autógamas para distintos morfotipos. Finalmente estudios para estimar la tasa de auto-

cruzamiento en plantas de *Bixa orellana* L., con la técnica SRAP (Sequence-Related Amplified polymorphism) apoyan la hipótesis de que achote presenta casos de polinización cruzada como autopolinización (Valdez-Ojeda *et al.*, 2010).

En la reproducción asexual se requiere de un único progenitor, para dar lugar a un individuo nuevo. Este suceso en plantas, se da por medio de tejidos vegetativos como las raíces, tallos y ramas (De Abate, 1999). Existiendo por lo tanto poca variabilidad genética, debido a que se pasa toda la información genética de un progenitor al hijo, en contraste con la reproducción sexual en la que existe una combinación de los genomas de dos progenitores. No obstante puede aparecer algún fenotipo diferente en la reproducción asexual a causa de algunos mecanismos que originan variación, como las mutaciones azarosas (Neil y Reece, 2007).

1.3.2. Variación Genética

El DNA es una molécula que se encuentra localizada en el núcleo celular de los organismos eucariontes, es responsable de contener la información que define a cada organismo en la tierra. La molécula de DNA puede sufrir diferentes cambios o variaciones tanto a nivel de su secuencia como a nivel de sus cromosomas. Cuando existe un aumento o ausencia en el número de un cromosoma en específico es denominado aneuploidía, mientras que el incremento del juego total de cromosomas de un individuo es conocido como poliploidía (Luque, 2006). La poliploidía le otorga a las plantas características diferentes a la de los progenitores, lo cual puede ser heredado a las siguientes generaciones, por lo que es aprovechado en programas de mejoramiento vegetal para potenciar un rasgo deseable en una planta de interés comercial (Ramsey y Schemske, 1998).

1.3.3. Causas de la variación genética

1.3.3.1. Mutación

Se denomina mutación a todo cambio permanente ocurrido en la secuencia de bases del DNA de un organismo (Solari, 2007). Este tipo de eventos pueden ser de dos tipos: espontáneas e inducidas. Las primeras provienen de eventos azarosos y son ocasionados por un error en el transcurso de algún proceso celular como la replicación o la recombinación. Por otro lado se conoce como mutación inducida al cambio ocasionado

en la secuencia del DNA por la exposición a algún agente físico o químico, que tiene la capacidad de ocasionar mutaciones en el DNA (Brown, 2008). Por medio de la mutación se pueden producir las formas alternativas o variantes (alelos), de los genes. Sin ella no habría la diversidad de formas de vida que existen en el planeta hoy en día. Es por eso que a menudo los genetistas se refieren a la mutación como “fuente primaria de la variabilidad genética” (Fernández *et al.*, 2002).

1.3.3.2. Migración

La migración o flujo de alelos es el movimiento de alelos entre poblaciones de la misma especie, puede deberse a causa de la inmigración o emigración de individuos con capacidad reproductiva. En las plantas y algunos organismos acuáticos se lleva a cabo por el movimiento de gametos (Edelaar y Bolnick, 2012, Curtis *et al.*, 2006). El movimiento de alelos de una población a otra incrementa por ende la variabilidad genética y con ello las posibilidades de adaptación a cambios climáticos. La migración de alelos puede incluso causar la divergencia de dos especies de un ancestro común, aunque esto aún se encuentra en debate (Kremer *et al.*, 2012, Pinho y Hey, 2010).

1.3.3.3. Deriva genética

La deriva génica se refiere a los cambios producidos en el genoma de un organismo de forma azarosa, que puede cambiar el contenido genético de un individuo al fijar o eliminar una mutación (Kuo *et al.*, 2009, Curtis *et al.*, 2006). Esto es debido a que los cambios producidos en la información genética de un individuo que resultan beneficiosas para su interacción con el ambiente y por tanto de su supervivencia tienden a ser retenidas y heredadas a las siguientes generaciones, sin embargo el éxito de este proceso es también regido por la deriva génica (McCutcheon *et al.*, 2011, Kuo *et al.*, 2009). Es por tanto una fuerza no adaptativa que participa en la evolución, cambiando el tamaño y complejidad de los genomas de individuos en una población (Whitney *et al.*, 2010, Kuo *et al.*, 2009).

1.3.3.4. Selección natural

Como se mencionó anteriormente todos los organismos acumulan mutaciones, las cuales pueden ser benéficas, en el sentido de que permiten que una especie se adapte mejor a su ambiente, (o todo lo contrario, ocasionando la desaparición de la misma), pues un individuo mejor adaptado a su entorno podrá producir descendencia que llevará dicha mutación, permitiendo su supervivencia. La selección natural tiende a preservar los cambios que favorecen a la población eliminando los desfavorables (Bedolla *et al.*, 2002). Existen principalmente tres tipos de selección natural: la normalizada, la disruptiva y la direccional. Para explicar cada una supongamos un conjunto de individuos de algún tipo de mamífero hipotético, en el que un tercio de la población son herbívoros, otro tercio son carnívoros y otro más son omnívoros. De acuerdo a la selección natural normalizada con el tiempo solo la forma intermedia, es decir los omnívoros serán lo que prevalezcan, desapareciendo los individuos con las características extremas, mientras que en la selección disruptiva sucederá lo contrario, pues de acuerdo a esta teoría los individuos con los rasgos extremos serán los que con el tiempo se mantendrán en la población, formando al paso del tiempo dos especies distintas, y la forma intermedia (los omnívoros) desaparecerá de forma gradual. En la selección direccional solo una característica en particular será la que se mantendrá en la población, desapareciendo gradualmente los otros fenotipos. El tipo de selección que se presente dependerá de los factores ambientales en que se encuentre la población (Curtis *et al.*, 2006).

1.3.3.5. Diversidad alélica

Las formas alternas que presenta un gen en particular se denomina alelo. La causa de estas variaciones son las mutaciones, que pueden originar la aparición de un alelo nuevo en una población, así como ocasionar variación en alelos ya existentes, por medio de cambios en la secuencia en un nucleótido (SNP), o a través de inserciones o eliminaciones de una región del DNA (InDel) (Kumar *et al.*, 2010). Estas alteraciones pueden tener un efecto tremendo en el fenotipo del organismo que sufre la mutación o no tener ninguno y ser silenciosa. Lo anterior dependerá de donde se lleve a cabo la mutación. Como el código genético es degenerado puede ser que el cambio resultante codifique para el mismo aminoácido, o que se sustituya por otro que posea propiedades similares al anterior, de tal forma que no se compromete la función de la proteína de

manera drástica. Sin embargo en casos extremos, en donde la mutación genera la aparición de un codón de paro en el marco de lectura, puede resultar en la síntesis de una proteína truncada, que dependiendo de su función e importancia puede ser deletéreo para un individuo. Por otro lado la mutación puede tener un efecto distinto si el cambio que ocasiona en la secuencia nucleotídica cambia la información de la proteína a codificar, resultando en una proteína diferente, que le permite adquirir características nuevas o mejoradas que ayudan a su supervivencia, como puede ser la resistencia a alguna enfermedad, o mayor acumulación de un compuesto (Brown, 2008).

Debido a la asociación que existe entre la variación en la secuencia de un alelo con un rasgo en particular, su caracterización, tiene gran importancia en el mejoramiento genético vegetal, en la Selección Asistida por Marcador Molecular (MAS). Un ejemplo de esta asociación se puede ver en la secuencia de los genes *waxy*, que codifican para la para la GBSS (Granule-Bound Starch Synthase), una de las enzimas de síntesis del almidón. En una comparación de la secuencia de estos genes en 20 accesiones de *Oryza sativa*, se revela la presencia de cinco alelos, que se diferencian entre sí por sustituciones en su secuencia nucleotídica en las regiones donadoras para el proceso de empalme, estos cambios se encuentran relacionados con la diferencia en la acumulación de almidón así como en la actividad enzimática de la proteína en las variantes de arroz analizadas (Mikami *et al.*, 2008).

La variación alélica puede encontrarse también en regiones no codificantes como lo reportan Guo y colaboradores (2004), en estudios sobre la variación alélica en un maíz híbrido, en donde la diferencia en la expresión alélica, es atribuida a cambios en la secuencia no codificante del DNA, misma que no se encuentra involucrada en una regulación epigenética. Los autores sugieren que la variación en la expresión juega un papel importante en la diversidad fenotípica.

1.4. MÉTODOS GENÉTICO-MOLECULARES UTILIZADOS EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO

Se conoce como marcador a una característica detectable en el fenotipo o en el genotipo, que se utiliza para conocer la presencia o ausencia de un carácter en particular y que puede ser mapeado en el genoma. Los marcadores pueden ser clasificados como morfológicos, bioquímicos y moleculares (Cubero, 2002).

1.4.1. Marcadores

1.4.1.1. Marcadores morfológicos

Se llama marcador morfológico a toda característica fenotípica que es notoria a la vista, aunque en el caso de las plantas y de otros organismos es necesario monitorear diferentes estados de desarrollo para su identificación (Cubero, 2002). Esto representa un problema en especies de plantas en donde su desarrollo es lento, por lo que este tipo de marcadores no son usados con frecuencia. Además, el establecimiento de técnicas con marcadores genéticos ha facilitado enormemente el avance en el campo del mejoramiento vegetal (Cruzan, 1998).

1.4.1.2. Marcadores bioquímicos

En este tipo de marcador se utilizan a las isoenzimas. Una isoenzima es definida como las distintas formas en que se presenta una enzima. Su punto isoeléctrico cambia si existe una modificación en un aminoácido en su secuencia, lo cual permite su identificación por técnicas electroforéticas y su uso como marcador. Su ventaja sobre los marcadores morfológicos se debe a su co-dominancia y a su tasa de interacciones epistáticas. Sin embargo están sujetos a cambios en el ambiente y al desarrollo de la planta, además de estar limitados solo a regiones codificantes (Cloutier y Landry, 1994).

1.4.1.3. Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares de DNA proporcionan valiosas herramientas, que son utilizadas en diversos estudios que van desde el análisis filogenético a la clonación de genes. El acoplamiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a las técnicas empleadas en los marcadores moleculares, ha hecho posible la cartografía y etiquetado de cualquier carácter. La selección asistida por marcadores moleculares (MAS) nos ha

dado la posibilidad de implementar combinaciones favorables de genes para el estudio de enfermedades, así como ensayos comparativos entre especies; dando lugar a mapas que son útiles no solo en la predicción de la organización del genoma y estudios de evolución, sino también en la aplicación práctica en el fitomejoramiento (Farooq y Azam, 2002). Una ventaja que poseen los marcadores moleculares, es que requieren sólo unos pocos nanogramos de DNA para su análisis, característica que los hace ideales para su uso en estudios de ligamiento así como en programas de mejoramiento vegetal (Farooq y Azam, 2002). Los marcadores moleculares de DNA tienen numerosas aplicaciones en la investigación de la genética vegetal. Entre ellos tres de los más comunes han sido, la identificación de la diversidad genética para el establecimiento de bancos de germoplasma, la construcción de mapas genéticos y la identificación de QTLs (Quantitative Trait Loci) para la manipulación de rasgos de importancia agronómica (Collard y MacKill, 2009). El uso de marcadores moleculares de DNA aumenta con el uso de estrategias nuevas que se basan en la información presente en bases de datos, que permiten el diseño de cebadores a partir de secuencias homólogas de otros organismos (Schluter *et al.*, 2005).

Existen muchos tipos de marcadores que se han desarrollado en los últimos años, los cuales se pueden dividir en tres grupos: los de primera generación que corresponden a los RFLP y RAPD, los de segunda generación que incluye a los SSR como los AFLP, y la tercera generación en donde se encuentra los SNP (Polimorfismos en un solo nucleótido) (Gupta *et al.*, 2001).

1.5. SNP (POLIMORFISMO EN UN SOLO NUCLEÓTIDO)

El polimorfismo en un solo nucleótido que se encuentra asociado a alguna característica fenotípica en particular de interés agronómico, es utilizado en el mejoramiento genético para la selección asistida por marcadores moleculares (MAS). Es un sistema altamente reproducible y eficiente que lo hace comparable con otros sistemas de marcadores como los SSR y los AFLP. Los SNP son bi-alélicos, lo que representa una desventaja cuando se habla de una población de naturaleza multi-alélica, sin embargo esta desventaja es superada por la extensa cantidad de polimorfismo de un nucleótido encontrados en un genoma, estimándose que cada 100 a 300bp se encuentra un SNP en

el DNA eucarionte, lo que lo hace ser el marcador molecular más abundante hasta ahora (Gupta *et al.*, 2001). Se han identificado SNP que poseen una asociación con una característica fenotípica de importancia comercial en plantas. Entre ellos por ejemplo los genes *waxy*, que se diferencian por una sustitución de una guanina por timina en un sitio donador de empalme, lo cual tiene un efecto en la acumulación de almidón en cultivares de arroz, (Yamanaka *et al.*, 2004); en cebada se encontró SNPs en los genes P450, que se encuentran involucrados en diversas rutas metabólicas de interés agronómico, como terpenos, fenil-propanoides, alcaloides, lípidos y glúcidos (Bundock *et al.*, 2003). Entre los métodos usados para la detección de los SNP se encuentra la Amplificación de Alelo Específico (ASO), ensayos en cadena de ligación (LCR), Análisis del Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla (SSCP), Espectrometría de Masas MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization), Ensayos TaqMan, pirosecuenciación, y Tecnología de microarreglos (Liu y Cordes, 2004).

1.6. SSCP (Análisis del Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla)

El SSCP el cual es una técnica molecular muy sensible para la detección de polimorfismos entre secuencias de 100-300 pb, fue desarrollado por Orita y colaboradores (1989) para el estudio de mutaciones puntuales en humanos. La técnica se basa en la migración diferencial en un gel de acrilamida no desnaturizante, a causa de las distintas conformaciones que puede adoptar una cadena monocatenaria de DNA de acuerdo a su secuencia. Para llevar a cabo el análisis se requiere de la amplificación de la región del DNA de los individuos que se desea estudiar por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Posteriormente el producto de PCR es desnaturizado permitiendo que las cadenas simples adopten estructuras secundarias que serán distintas si existe una diferencia en su secuencia nucleotídica, lo cual se manifiesta en la migración diferencial que presentan los fragmentos de DNA en un análisis electroforético (Aranceta *et al.*, 2011).

La capacidad de la técnica SSCP para la identificación de la variación presente en una población determinada, se ha demostrado en estudios con *Theobroma cacao*, en donde se comparan los polimorfismos detectados con la técnica SSCP, con los alelos identificados con marcadores SSR, para una población de 82 individuos. Ambos muestran una correlación significativa en la distancia génica encontrada (Kuhn *et al.*, 2008). Se ha

utilizado también en la obtención de marcadores SNP para el mapeo de QTLs en dos especies de pinos, en este estudio además se menciona que el nivel de polimorfismo encontrado fue independiente del tamaño del producto de PCR y a la temperatura de electroforesis empleada (Plomion *et al.*, 1999).

Por consiguiente, y debido a las características ya mencionadas con respecto a la técnica SSCP, en el laboratorio de la Dra. Renata Rivera se han llevado a cabo estudios con regiones de genes que codifican a las enzimas fitoeno desaturasa (PDS) y licopeno beta-ciclasa (β -LCY) (Martín-Rodríguez, 2010), que son clave en la síntesis de carotenoides, pudiendo ser usados como marcadores moleculares. Los resultados de la aplicación de este método en once morfotipos de achiote, permitieron analizar el polimorfismo de estos tres genes. En el caso del gen *pds*, los perfiles mostraron una asociación, con el color del fruto y el contenido de bixina en la semilla. En comparación con fitoeno desaturasa, los perfiles generados por *β -lcy* si bien mostraron polimorfismo, no presentaron una asociación clara con alguna característica fenotípica. Además se encontró que las plantas de achiote con características de fruto rojizo y cantidad de bixina en la semilla superior al 2.15%, presentaron perfiles SSCP para el gen *pds* distintos de los individuos de fruto verde y bixina en la semilla inferior al 2.15%. Por su parte los genes que codifican a las enzimas fitoeno desaturasa así como licopeno ciclasa, son fundamentales en la biosíntesis de carotenoides en organismos fotosintéticos, como por ejemplo el maíz, tomate, cítricos como *Citrus unshiu* y *C. sinensis* (Lu *et al.*, 2008). De lo anterior se concluye que la técnica SSCP, es una herramienta útil para la detección de polimorfismo en el achiote, por lo tanto el estudio que a continuación se presenta, se enfoca en estudiar la variación alélica en doce morfotipos de *Bixa orellana*, como una continuación de los estudios llevados a cabo en el laboratorio con los genes fitoeno desaturasa y licopeno beta-ciclasa. Para posteriormente poder seleccionar marcadores moleculares de pigmentos, que contribuyan en la selección de plantas con características deseables para el fitomejoramiento de *Bixa orellana* L.

1.7. HIPÓTESIS

Si existen cambios asociados a fenotipos en los genes involucrados en la ruta de biosíntesis de carotenoides en *Bixa orellana* L, entonces estos podrán ser utilizados como marcadores moleculares en achiote para la selección de plantas con mayor capacidad de acumulación del pigmento en sus semillas maduras.

1.8. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la variación alélica, presente en los genes *pds* y *β -lcy*, en doce morfotipos de *Bixa orellana* L.

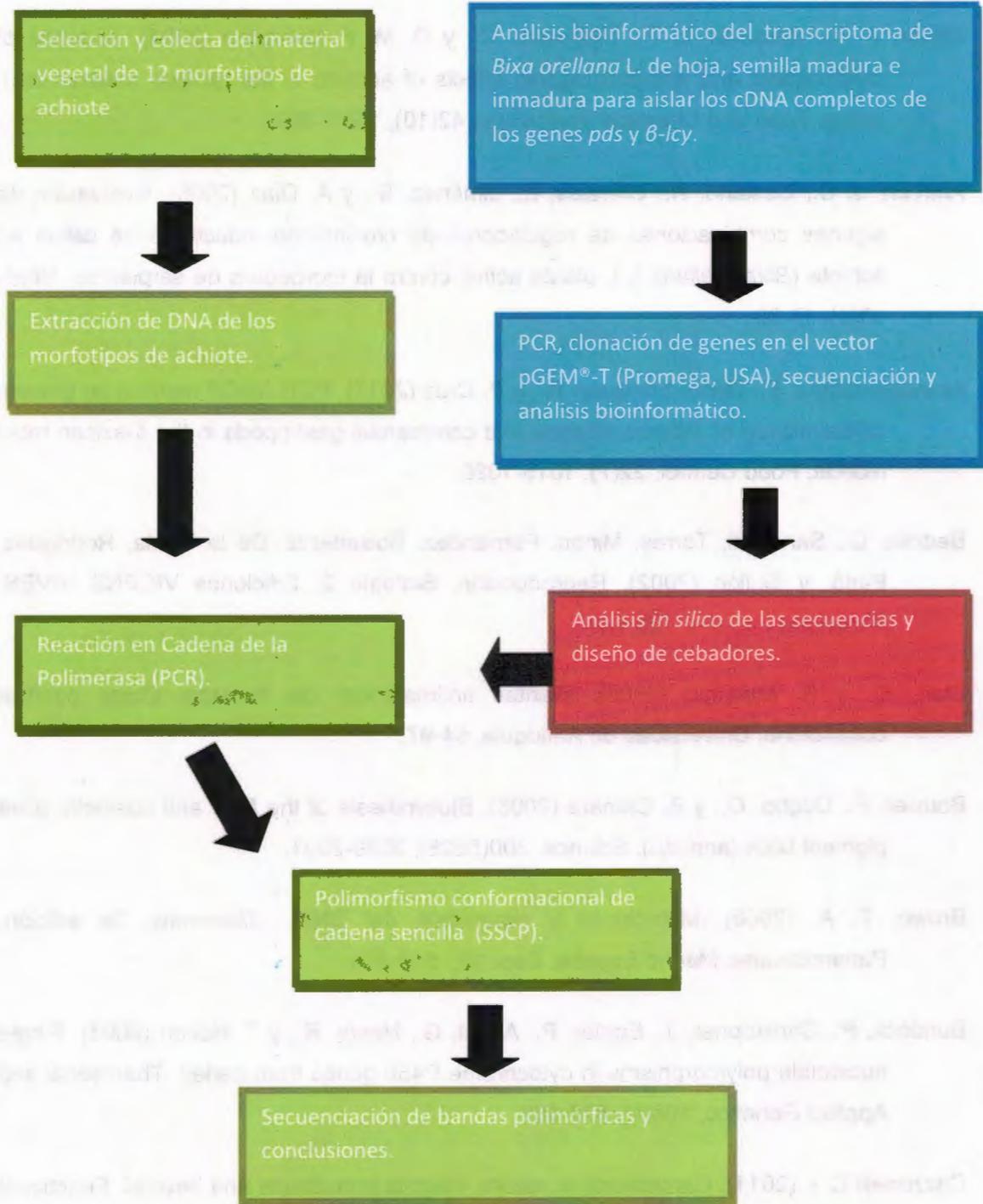
1.8.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la variación alélica en los genes *pds* y *β -lcy* de la ruta de biosíntesis de carotenoides en doce morfotipos de *Bixa orellana* L, a través de la técnica Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP).
- Análisis de las secuencias polimórficas de los patrones de bandeo producido por la técnica SSCP.
- Análisis bioinformático de la estructura de la secuencia nucleotídica de los genes *pds* y *β -lcy*.

1.9. JUSTIFICACIÓN

Bixa orellana L., es una planta con un potencial uso comercial para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, debido al colorante de color rojizo que se obtiene de sus semillas. Sin embargo el rendimiento de bixina, como de otros carotenos presentes en la semilla, varía considerablemente entre las distintas plantas de *Bixa orellana* L., afectando la producción de pigmento para su explotación en el país. La variación en la síntesis de diversos tipos de carotenos y derivados se ha observado en diferentes especies, como maíz y papaya, donde la causa principal ha sido la variación presente en los alelos de los genes que codifican a enzimas de la síntesis de carotenoides. Por esta razón en el grupo de investigación de la Dra. Renata Rivera Madrid, en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, se intenta dilucidar si en el caso de *Bixa orellana* L., existe variación alélica que este asociada con la regulación de la biosíntesis de carotenoides y sus derivados. Los fragmentos de la secuencia de los genes que codifican a las enzimas fitoeno desaturasa y beta ciclasa fueron usados para establecer la técnica SSCP en plantas de achiote (Martín-Rodríguez 2010). Los resultados muestran que la técnica SSCP es una herramienta útil para ser utilizada en el análisis de la variación alélica, pues permite identificar los alelos presentes para un gen por medio de la migración diferencial, que adopta cada alelo a causa de su secuencia, en un gel de acrilamida no desnaturizante. Por lo cual es importante continuar con el estudio de la secuencia de los genes que codifican a las enzimas de la biosíntesis de carotenoides, para conocer si existe variación alélica, que se encuentre involucrada en la regulación y síntesis de carotenoides, para su potencial uso como marcadores moleculares en un programa de mejoramiento genético de achiote.

Figura 1.6 Estrategia experimental.



BIBLIOGRAFÍA

- Agner, A. R., Barbisan, L. F., Scolastici, C., y D. M. F. Salvadori (2004). Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. *Food and Chemical Toxicology*, 42(10), 1687-1693.
- Alarcón, J. C., Castaño, H., Corrales, L., Jiménez, S., y A. Díaz (2006). Evaluación de algunas combinaciones de reguladores de crecimiento inductoras de callos en achiote (*Bixa orellana* L.), planta activa contra la mordedura de serpientes. *Vitae*, 13(1), 17-23.
- Aranceta-Garza, F., Perez-Enriquez, R., y P. Cruz (2011). PCR-SSCP method for genetic differentiation of canned abalone and commercial gastropods in the Mexican retail market. *Food Control*, 22(7), 1015-1020.
- Bedolla, C., Sanmartí, Torres, Mingo, Fernández, Boixaderas, De la Rubia, Rodríguez, Pintó, y Gullón (2002). Reproducción, Biología 2. Ediciones VICENS VIVES, Barcelona España, 125-129.
- Blair, S., y B. Madrigal (2005). Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa pacífica colombiana. Universidad de Antioquia, 94-97.
- Bouvier, F., Dogbo, O., y B. Camara (2003). Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science*, 300(5628), 2089-2091.
- Brown, T. A. (2008). Mutaciones y reparación del DNA, Genomas. 3a edición, Panamericana, Madrid España, Cap. 19, 519-556.
- Bundock, P., Christopher, J., Egger, P., Ablett, G., Henry, R., y T. Holton (2003). Single nucleotide polymorphisms in cytochrome P450 genes from barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(4), 676-682.
- Cazzonelli C. I. (2011). Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Functional Plant Biology*, 38, 833-847.

-
- Chisté, R. C., Mercadante, A. Z., Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L. F. D. C., y N. Bragagnolo (2011). *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, 127(2), 419-426.
- Chiste, R. C., Yamashita, F., Gozzo, F. C., y A. Z. Mercadante (2011). Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. *Journal of Chromatography A*, 1218(1), 57-63.
- Cleveland, D. A., Daniela, S., y S. E. Smith (2000). A biological framework for understanding farmers' plant breeding. *Economic Botany*, 54(3), 377-394.
- Cloutier, S., y B. S. Landry (1994). Molecular markers applied to plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 30(1), 32-39.
- Collard, B. C., y D. J. Mackill (2009). Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27(1), 86-93.
- Cruzan, M. B. (1998). Genetic markers in plant evolutionary ecology. *Ecology*, 79(2), 400-412.
- Cubero, I. J. (2002). Marcadores y Mapas Genéticos, Introducción a la Mejora Genética Vegetal. 2a Edición, Mundi-Prensa, Madrid, 3, 67-100.
- Cunningham Jr, F. X., y E. Gantt (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 557-583.
- Curtis, H., Barnes, Schnek, y Flores (2006). Los procesos del Cambio Evolutivo, Invitación a la Biología, 6a Edición, Panamericana, Montevideo, Cap 17, 257-271.
- De Abate, J. (1999). La reproducción, Biología Aplicada, Editorial Universidad Estatal a Distancia. Costa Rica, 143-170.
- DellaPenna, D., y B. J. Pogson (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and

carotenoids. *Annual Review of Plant Biology.*, 57, 711-738.

Edelaar, P., y D. I. Bolnick (2012). Non-random gene flow: an underappreciated force in evolution and ecology. *Trends in Ecology & Evolution.*

Farooq S. y F. Azam (2002). Molecular Markers in Plant Breeding-I: Concepts and Characterization. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5(10), 1135-1140.

Fassett, R. G., y J. S. Coombes (2011). Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Marine Drugs*, 9(3), 447-465.

Fernández, J. P., Fernández, A. M. P., Santos, J. H. A, y J. J. A. González (2002). Variación Genética, Genética. 1a Edición, Ariel Ciencia, 295-320.

Fleischer, T. C., Ameade, E. P. K., Mensah, M. L. K., y I. K. Sawyer (2003). Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia*, 74(1), 136-138.

Fonnegra, F. G., Fonnegra, R., y J. R. Jiménez (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquia, 13-12.

Giuliano, G., Rosati, C., y P. M. Bramley (2003). To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. *Trends in Biotechnology*, 21(12), 513-516.

Gómez-Ortiz, N. M., Vázquez-Maldonado, I. A., Pérez-Espadas, A. R., Mena-Rejón, G. J., Azamar-Barrios, J. A., y G. Oskam (2010). Dye-sensitized solar cells with natural dyes extracted from achiote seeds. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 94(1), 40-44.

Guo, M., Rupe, M. A., Zinselmeier, C., Habben, J., Bowen, B. A., y O. S. Smith (2004). Allelic variation of gene expression in maize hybrids. *The Plant Cell Online*, 16(7), 1707-1716.

Gupta, P. K., Roy, J. K., y M. Prasad (2001). Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science-Bangalore*, 80(4), 524-535.

-
- Hanson, L., McMahon, K. A., Johnson, M. A., y M. D. Bennett (2001). First nuclear DNA C-values for another 25 angiosperm families. *Annals of Botany*, 88(5), 851-858.
- Harjes CE, Rocheford TR, Bai L, *et al.*, (2008). Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science*, 319, 330-333.
- Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(3), 210-218.
- Jako, C., Coutu, C., Roewer, I., Reed, D. W., Pelcher, L. E., y P. S. Covello (2002). Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (*Bixaceae*) through expressed sequence tag analysis. *Plant Science*, 163(1), 141-145.
- Joseph, N., Siril, E. A., y G. M. Nair (2012). Reproductive characterization and preliminary studies on controlled breeding of Annatto (*Bixa orellana* L.). *Plant Systematics and Evolution*, 298(1), 239-250.
- Kremer, A., Ronce, O., Robledo-Arnuncio, J. J., Guillaume, F., Bohrer, G., Nathan, R., ... y S. Schueler (2012). Long-distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change. *Ecology Letters*, 15(4), 378-392.
- Krubasik, P., Kobayashi, M., y G. Sandmann (2001). Expression and functional analysis of a gene cluster involved in the synthesis of decaprenoxanthin reveals the mechanisms for C₅₀ carotenoid formation. *European Journal of Biochemistry*, 268(13), 3702-3708.
- Kuhn, D. N., Motamayor, J. C., Meerow, A. W., Borrone, J. W., y R. J. Schnell (2008). SSCP markers provide a useful alternative to microsatellites in genotyping and estimating genetic diversity in populations and germplasm collections of plant specialty crops. *Electrophoresis*, 29(19), 4096-4108.
- Kumar, G. R., Sakthivel, K., Sundaram, R. M., Neeraja, C. N., Balachandran, S. M., Rani, N. S., ... y M. S. Madhav (2010). Allele mining in crops: prospects and potentials.

Biotechnology Advances, 28(4), 451.

Kuo, C. H., Moran, N. A., y H. Ochman (2009). The consequences of genetic drift for bacterial genome complexity. *Genome Research*, 19(8), 1450-1454.

Leal, F., y de C. M. Clavijo (2010a). Annatto: A Natural Dye from the Tropics. *Chronica*, 50(3), 34.

Leal, F., y de C. M. Clavijo (2010b). Acerca de la historia, taxonomía, botánica y usos de *Bixa orellana* L. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*, 28, 78-86.

León J. (2000). Lecitadales, *Botánica de los Cultivos Tropicales*, IICA, 3a edición, 127-171.

Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M., y J. Schwender (2006). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 101(3), 643-652.

Lichtenthaler, H. K., Schwender, J., Disch, A., y M. Rohmer (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *Febs Letters*, 400(3), 271-274.

Liu, Z. J., y J. F. Cordes (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238(1), 1-37.

Lu, S., y L. Li (2008). Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(7), 778-785.

Luque, J. (2006). Diversidad del genoma: polimorfismo, *En*, Luque, *Biología Molecular e Ingeniería Genética Conceptos Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*. ELSEVIER, Madrid, 26, 365-377.

Martín-Rodríguez M. E. (2010). Uso de Genes Involucrados en la Síntesis de Carotenoides como Marcadores moleculares de Pigmentos en Achiote, Tesis de Maestría en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Centro de Investigación

Científica de Yucatán (CICY), 32-73.

McCutcheon, J. P., y N. A. Moran (2011). Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 13-26.

McGraw, K. J., Nolan, P. M., y O. L. Crino (2006). Carotenoid accumulation strategies for becoming a colourful House Finch: analyses of plasma and liver pigments in wild moulting birds. *Functional Ecology*, 20(4), 678-688.

Mercadante, A. Z., Steck, A., Rodriguez-Amaya, D., Pfander, H., y G. Britton (1996). Isolation of methyl 9' Z- α -apo-6'-lycopenoate from *Bixa orellana*. *Phytochemistry*, 41(4), 1201-1203.

Mikami, I., Uwatoko, N., Ikeda, Y., Yamaguchi, J., Hirano, H. Y., Suzuki, Y., y Y. Sano (2008). Allelic diversification at the *wx* locus in landraces of Asian rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 116(7), 979-989.

Monigatti, M., Bussmann, R. W., y C. S. Weckerle (2012). Medicinal plant use in two Andean communities located at different altitudes in the Bolívar Province Peru. *Journal of Ethnopharmacology*. 145, 450-464.

Moran, N. A., y T. Jarvik (2010). Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science*, 328(5978), 624-627.

Narváez, J. A., Flores-Pérez, P., Herrera-Valencia, V., Castillo, F., Ku-Cauich, R., Canto-Canché, B. B., ... y R. Rivera-Madrid (2001). Development of molecular techniques for studying the metabolism of carotenoids in *Bixa orellana* L. *HortScience*, 36(5), 982-986.

Navarro García, V. M., Gonzalez, A., Fuentes, M., Aviles, M., Rios, M. Y., Zepeda, G., y M. G. Rojas (2003). Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(1), 85-88.

Neil, A. C., y J. B. Reece (2007). Meiosis y Ciclo de Vida sexual, *Biología*. 7a edición,

Madrid, Médica Panamericana, 241-251.

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., y T. Sekiya (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8), 2766-2770.

Parimalan, R., Giridhar, P., y G. A. Ravishankar (2008). Mass multiplication of *Bixa orellana* L. through tissue culture for commercial propagation. *Industrial Crops and Products*, 28(2), 122-127.

Parimalan, R., Giridhar, P., Gururaj, H. B., y G. A. Ravishankar (2007). Organogenesis from cotyledon and hypocotyl-derived explants of japhara (*Bixa orellana* L.). *Acta Botanica Croatica*, 66(2), 153-160.

Pelz, A., Wieland, K. P., Putzbach, K., Hentschel, P., Albert, K., y F. Götz (2005). Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(37), 32493-32498.

Pinho, C., y J. Hey (2010). Divergence with gene flow: models and data. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 41, 215-230.

Plomion, C., Hurme, P., Frigerio, J. M., Ridolfi, M., Pot, D., Pionneau, C., ... y A. Kremer (1999). Developing SSCP markers in two *Pinus* species. *Molecular Breeding*, 5(1), 21-31.

Ramsey, J., y D. W. Schemske (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 467-501.

Rivera-Madrid, R., Escobedo-Gm, R. M., Balam-Galera, E., Vera-Ku, M., y H. Harries (2006). Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). *Scientia Horticulturae*, 109(2), 165-172.

Rodríguez-Ávila, N. L., Narváez-Zapata, J. A., Aguilar-Espinosa, M., y R. Rivera-Madrid (2011). Regulation of pigment-related genes during flower and fruit development of

Bixa orellana. Plant Molecular Biology Reporter, 29(1), 43-50.

Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., y H. S. Costa (2006). Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. Journal of Food Composition and Analysis, 19(2), 97-111.

Sajilata, M. G., y R. S. Singhal (2006). Isolation and stabilisation of natural pigments for food applications. Stewart Postharvest Review, 2(5), 1-29.

Schluter, P. M., Stuessy, T. F., y H. F. Paulus (2005). Making the first step: practical considerations for the isolation of low-copy nuclear sequence markers. Taxon, 54(3), 766-770.

Shilpi, J. A., Taufiq-Ur-Rahman, M., Uddin, S. J., Alam, M. S., Sadhu, S. K., y V. Seidel (2006). Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. Journal of Ethnopharmacology, 108(2), 264-271.

Shuhama, I. K., Aguiar, M. L., Oliveira, W. P., y L. A. P. Freitas (2003). Experimental production of annatto powders in spouted bed dryer. Journal of Food Engineering, 59(1), 93-97.

Silva, M. C., Botelho, J. R., Conceição, M. M., Lira, B. F., Coutinho, M. A., Dias, A. F., ... y P. F. A. Filho (2005). Thermogravimetric investigations on the thermal degradation of bixin, derived from the seeds of annatto (*Bixa orellana* L.). Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 79(2), 277-281.

Simkin, A. J., Kuntz, M., Moreau, H., y J. McCarthy (2010). Carotenoid profiling and the expression of carotenoid biosynthetic genes in developing coffee grain. Plant Physiology and Biochemistry, 48(6), 434-442.

Solari A. J. (2007). Mutación, Genética Humana Fundamentos y Aplicaciones en Medicina. 3a edición, Panamericana, Buenos Aires, 143-173.

Spada, F. P., Gutierrez, É. M. R., Souza, M. C. D., Brazaca, S. G. C., Lemes, D. E. A.,

-
- Fischer, F. S., ... y V. J. M. Savino (2012). Viscosity of egg white from hens of different strains fed with commercial and natural additives. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32(1), 47-51.
- Takahashi, N., Goto, T., Taimatsu, A., Egawa, K., Katoh, S., Kusudo, T., ... y T. Kawada (2009). Bixin regulates mRNA expression involved in adipogenesis and enhances insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes through PPAR γ activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(4), 1372-1376.
- Taylor, M., y G. Ramsay (2005). Carotenoid biosynthesis in plant storage organs: recent advances and prospects for improving plant food quality. *Physiologia Plantarum*, 124(2), 143-151.
- Valdez-Ojeda, R., Hernández-Stefanoni, J. L., Aguilar-Espinosa, M., Rivera-Madrid, R., Ortiz, R., y C. F. Quiros (2008). Assessing morphological and genetic variation in annatto (*Bixa orellana* L.) by sequence-related amplified polymorphism and cluster analysis. *HortScience*, 43(7), 2013-2017.
- Valdez-Ojeda, R., Quiros, C. F., de Lourdes Aguilar-Espinosa, M., y R. Rivera-Madrid (2010). Outcrossing Rates in Annatto Determined by Sequence-Related Amplified Polymorphism. *Agronomy Journal*, 102(5), 1340-1345.
- Venugopalan, A., Giridhar, P., y G. A. Ravishankar (2011). Food, ethnobotanical and diversified applications of *Bixa orellana* L.: a scope for its improvement through biotechnological mediation. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 1(4), 9-31.
- Walter, M. H., y D. Strack (2011). Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Natural Product Reports*, 28(4), 663-692.
- Whitney, K. D., y T. Jr. Garland (2010). Did genetic drift drive increases in genome complexity?. *PLoS Genetics*, 6(8), 1-6.
- Yamanaka, S., Nakamura, I., Watanabe, K., y Y. I. Sato (2004). Identification of SNPs in the *waxy* gene among glutinous rice cultivars and their evolutionary significance

during the domestication process of rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(7), 1200-1204.

Zhu, C., Bai, C., Sanahuja, G., Yuan, D., Farré, G., Naqvi, S., ... y P. Christou (2010). The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 504(1), 132-141.



CAPÍTULO II

AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DE LOS GENES LICOPENO BETA CICLASA (B-LCY) Y FITOENO DESATURASA (PDS) EN BIXA ORELLANA L.

2.1. INTRODUCCIÓN

Previo a este estudio se contaba con dos fragmentos de los genes β -lcy (491 bases) y *pds* (755 bases) aislados en el laboratorio por la Dra. Renata Rivera Madrid, y con los cuales se realizó un análisis preliminar de los polimorfismos por SSCP (Martín-Rodríguez, 2010). El presente trabajo tuvo como objetivo principal continuar con el análisis de estos alelos, para así obtener polimorfismos relacionados con la producción de pigmentos en esta planta. Para lograr lo anterior se requiere contar con la secuencia completa de los cDNAs de los genes β -lcy y *pds*.

Estos genes son importantes debido a su participación en la ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas superiores. El gen *pds* codifica para la enzima fitoeno desaturasa, una proteína que se encuentra anclada en la membrana de los cloroplastos, que cataliza la conversión del fitoeno a ζ -caroteno a través de dos reacciones de deshidrogenación teniendo al compuesto fitoflueno como intermediario. Durante cada paso de desaturación se generan dos átomos de hidrógeno, los cuales se sugiere que se acoplan a una cadena de transporte de electrones, a través de la molécula plastoquinona, la cual participa en las reacciones redox en los procesos de fotosíntesis (Fraser *et al.*, 2004). Esta enzima es codificada por el gen *pds* el cual ha sido aislado de cDNA en especies como *Arabidopsis thaliana* (Scolnik y Bartley, 1993), *Brassica oleracea* var. *Botrytis* (Lopez *et al.*, 2008), *Citrus unshiu* (Kita *et al.*, 2001), *Lycopersicon esculentum* (Mann y Hirscheberg, 1994), entre otras, mostrando todas ellas un dominio conservado de unión al dinucleótido FAD/NADP de la familia NADB_Rossmann. Esta enzima posee un tamaño de alrededor de 500 aminoácidos, con un peso de 50 kD aproximadamente. En *Arabidopsis* el cDNA tiene una longitud de 1924 pb, en donde las primeras 127 corresponden a la región 5'UTR y las últimas 100 pb al 3'UTR (Scolnik y Bartley, 1993). En muchas especies se ha visto que la enzima fitoeno desaturasa, se encuentra involucrada en la regulación de la síntesis de carotenoides, siendo una enzima limitante de la ruta de biosíntesis en muchas

especies (López *et al.*, 2008). Coesel y colaboradores (2008) proponen que su expresión se encuentra bajo un control transcripcional en respuesta al ambiente. Al respecto en *Lycopersicon esculentum* se ha encontrado en el promotor del gen *pds*, la secuencia en tándem ATCTA río arriba de la caja TATA., la cual se identificó como un elemento de acción *cis* en los promotores del gen *psy* en *Arabidopsis*, al cual se une la proteína AtRRAP2.2, miembro de una familia de factores de transcripción denominados APETALA2 (AP2)/proteínas de unión en respuesta a etileno, lo cual sugiere un mecanismo de regulación común con la *psy* (Welsch *et al.*, 2007).

Por su parte el gen β -*lcy* codifica a la enzima licopeno beta ciclasa que representa junto con la enzima ϵ -*lcy* el punto de ramificación en la síntesis de carotenoides. En la reacción catalizada por β -LCY, se introduce un anillo beta al extremo terminal de licopeno para formar beta caroteno (Yu *et al.*, 2008). Estudios en *Narcissus pseudonarcissus in vitro* sugieren que se requiere como sustrato para la ciclación el cofactor NADPH (Beyer *et al.*, 1991). El gen β -*lcy* ha sido aislado de cDNA en especies como *Arabidopsis thaliana* (Scolnik y Bartley, 1995), *Cucumis melo* (Hao *et al.*, 2012), *Lycopersicon esculentum* (Wan *et al.*, 2007) entre otros. La secuencia de cDNA que codifica a la beta ciclasa en *Arabidopsis* es de 1750 pb de longitud, contiene una región 5'UTR de 173 pb mientras que la secuencia 3'UTR es de 245 pb, el polipéptido codificado posee un tamaño de 501 aminoácidos y un peso de 56,174 kD (Cunningham *et al.*, 1996).

En este capítulo se presentan la metodología que se utilizó para aislar estos genes así como los resultados del análisis bioinformático de las secuencias.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Identificación *in silico* de los genes *pds* y *β -lcy* en contigs de un transcriptoma de *Bixa orellana* L.

En el laboratorio del Dr. Luca Comai (Departamento de Biología de Plantas, del Centro genómico de la universidad de California, Campus Davis USA), se llevó a cabo la secuenciación del transcriptoma de *B. orellana* de tejido foliar, semilla madura e inmadura de achiote con el método de illumina®. La longitud de las secuencias de los contigs producidos por la secuenciación, varía de 399 pb hasta 4549 pb, con un tamaño promedio de 1928.45161 pb. Por lo que para el aislamiento de las secuencias completas, se alinearon los fragmentos de los genes *pds* y *β -lcy* con 62 contigs provenientes de la secuenciación del transcriptoma. Posteriormente los contigs que se ensamblaron con las secuencias de referencias *β -lcy* así como *pds* se compararon con la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI), con la herramienta Blastx con un E value <10, usando la base de datos de proteínas no-redundantes (NR) y la matriz BLOSUM 62.

2.2.2. Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y clonación de los genes *β -lcy* y *pds* en *Bixa orellana* L.

Para corroborar y contar con las secuencias de los cDNAs completos de los genes *pds* y *β -lcy*, se extrajo RNA total de 50 mg de hojas jóvenes de la planta P13, con el kit PureLink™ Micro-to-Midi™ (Invitrogen, USA), siguiendo las modificaciones propuestas por Rodríguez-Ávila y colaboradores (2009). La pureza y concentración del RNA extraído fue estimado por espectrofotometría midiendo las absorbancias A_{260} y A_{280} nm con el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA), seguido de un análisis electroforético con gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio (10mg/L). La síntesis de la primera hebra de cDNA (DNA complementario), fue llevada a cabo con 200 ng de RNA total usando la transcriptasa inversa Superscript™ III (Invitrogen, USA) (Rodríguez-Ávila *et al.*, 2009), el resultado fue analizado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio (10mg/L). Para la amplificación de los genes *pds* y *β -lcy* con cDNA, se diseñaron dos pares de cebadores usando la información obtenida del análisis del transcriptoma (descrito anteriormente en el apartado 2.2.1.), utilizando el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>), usando como parámetros

generales una longitud de 18-24 bases, con un contenido G+C de al menos 50%, evitando secuencias complementarias en la región 3' de al menos 5-6 nucleótidos en la secuencia del cebador y entre los pares de cebadores (Dieffenbach *et al.*, 1993), para predecir si los cebadores forman estructuras secundarias o dímeros a temperaturas específicas se usó el servidor en línea mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>).

La reacción de PCR (Mullis *et al.*, 1986), se llevó a cabo a un volumen de 15 μ l, con 0.6 unidades de enzima FastStart Taq DNA, 0.6 mM de buffer 10x con $MgCl_2$, 0.3x de GC-RICH solution (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Suiza), 1 μ l de dNTP's a 200 μ M (Invitrogen, USA), 1 μ M de oligos en sentido/antisentido (Sigma-Aldrich, USA), y 10 ng de cDNA, con el siguiente programa: 1 ciclo a 94 °C por 4 min, 40 ciclos a 90 °C por 30 s, T_m por 30 s y 72 °C por 1.5 min y finalmente una extensión final a 72 °C por 7 minutos. El producto de la reacción se analizó mediante la electroforesis de un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (10mg/L). El producto de PCR purificado fue clonado en el vector pGEM-T siguiendo el protocolo de proveedor (Promega, USA), transformando por choque térmico cepas DH5 α de *E. coli*, para posteriormente purificar los plásmidos y enviarlos a secuenciar a la empresa Macrogen Inc (Korea). Las clonas a secuenciar fueron seleccionadas por digestión con la enzima EcoRI (Promega, USA) y por PCR con los cebadores específicos.

2.2.3. Análisis estructural y bioinformático de los genes β -lcy y pds

Las secuencias obtenidas fueron editadas y comparadas con la base de datos del NCBI, utilizando la herramienta Blastx con un E value <10, usando la base de datos de proteínas no-redundantes (nr) y la matriz BLOSUM 62. Para el análisis de la secuencia nucleotídica se usó el programa Serial Cloner 2.5, y el portal bioinformático ExpASY Molecular Biology disponible en <http://us.expasy.org/>. Finalmente el análisis filogenético fue realizado con el programa Mega 5.10 (Tamura *et al.*, 2011), usando el algoritmo Neighbor-Joining, con un Bootstrap de 1000 réplicas y editado con el programa Dendroscope. El mejor modelo para estimar la distancia evolutiva fue calculado con el programa Mega 5.10. El alineamiento de la secuencias se llevó a cabo con el algoritmo de ClustalW y editado con BioEdit versión 7.1.3.0.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Aislamiento del gene licopeno beta ciclasa (β -lcy) en *Bixa orellana* L.

Con el objetivo de aislar el gen β -lcy involucrado en la reacción de ciclación de los extremos terminales del compuesto licopeno en el achiote, se comparó una base de datos de 62 contigs con una longitud promedio de 1928.45 pb, provenientes de un transcriptoma de *Bixa orellana* L. de los órganos de hoja, semilla madura e inmadura, contra un fragmento del gen de 495 pb (AY836587), aislado previamente de plantas de achiote en el laboratorio de la Dra. Renata Rivera. Los contigs 40528(2062 pb), 11637(1681 pb), 48052(1350 pb), y 40664(1506 pb) alinearon significativamente con la secuencia del gen β -lcy de 495 pb. Para corroborar la secuencia del resultado del análisis bioinformático y almacenarlo en plásmidos se diseñaron dos pares de cebadores para amplificar el contig 40528 (figura 2.1.), debido a que este no presenta en su secuencia regiones ambiguas y además *in silico* mostró un ORF de 1512 pb, que se asemeja con lo reportado para este gen en las Angiospermas (Figura 2.1) (Young *et al.*, 2012, Scolnik y Bartley, 1995).

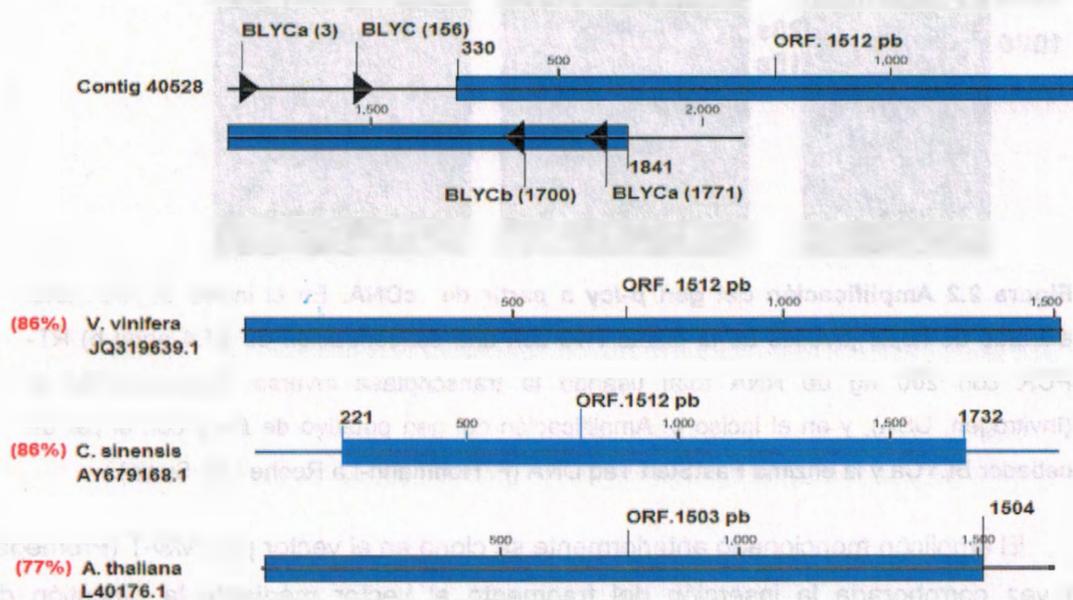


Figura 2.1 Comparación del ORF (marco de lectura abierto) de las secuencia del contig 40528 (β -lcy) con genes ortólogos. Se indica con un rectángulo azul la cobertura del ORF del contig 40528 así como de especies cercanas a *Bixa orellana*: *V. vinifera* (JQ319639.1), *C.*

sinensis (AY679168.1), *A. thaliana* (L40176.1). Se anexa en números rojos el porcentaje de identidad con respecto al contig. Además, se indica con triángulos negros la posición de los cebadores diseñados para aislar los de cDNA de achiote.

2.3.2. Aislamiento del gen licopeno beta ciclasa

En la figura 2.2, se muestran los resultados que conciernen a la amplificación del gen β -*lcy*, usando como templado cDNA sintetizado a partir del mRNA de la planta P13 por RT-PCR (Figura 2.2.a. y 2.2b.). Como se indica en la figura 2.2 (inciso c) obtuvimos por medio de una reacción de PCR una banda que exhibe una longitud de alrededor de 2000 pb aparentemente mayor a la que se esperaba de 1770 pb (Figura 2.2).

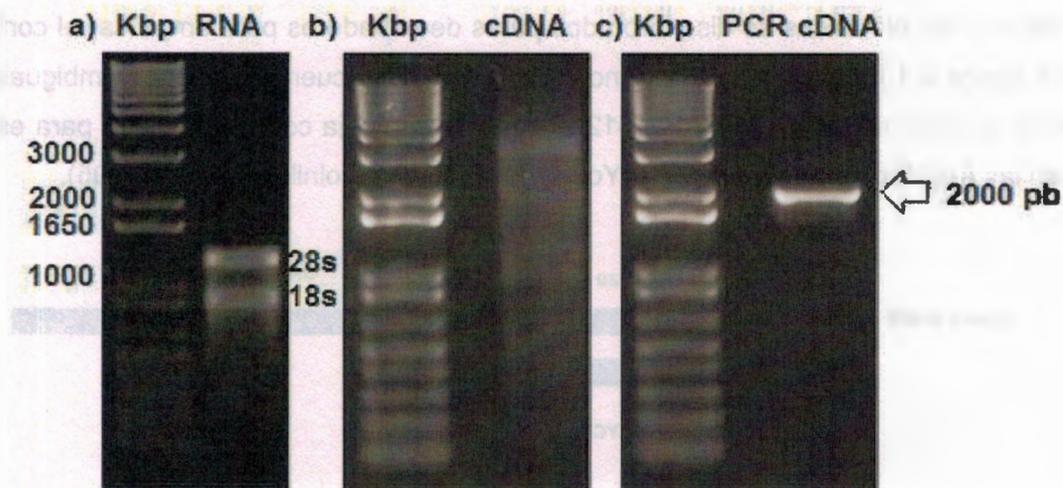


Figura 2.2 Amplificación del gen β -*lcy* a partir de cDNA. En el inciso a) RNA total extraído de hojas jóvenes de la planta P13 con una concentración de 97.4 ng/ μ l b) RT-PCR con 200 ng de RNA total usando la transcriptasa inversa SuperscriptTM III (Invitrogen, USA), y en el inciso c) Amplificación del gen putativo de β -*lcy* con el par de cebador BLYCa y la enzima FastStart Taq DNA (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Suiza).

El amplicón mencionado anteriormente se clonó en el vector pGEM[®]-T (Promega). Una vez corroborada la inserción del fragmento al vector mediante la digestión del plásmido con la enzima EcoRI, seis clonas se enviaron a secuenciar, utilizando los servicios de la empresa Macrogen (Korea), para corroborar que la información sea correcta y corresponda a la secuencia del gen licopeno beta ciclasa. Posterior a la edición de la secuencia (remover restos del vector y regiones ambiguas), se obtuvo una secuencia de 1639 pb, menor a la esperada de 1770 pb (Figura 2.2.), pero que se alinea

con el Contig 40528 en la posición 154 a la 1792, por lo que la pérdida de la secuencia faltante para alcanzar el tamaño esperado para la amplificación, se le puede atribuir a la edición de la secuencia (eliminación de regiones ambiguas) (Figura 2.3.).

Clona	1	-----	0
Contig40528	1	CGTCTCFCCGTTTGTGCTTGAGGAACCCACCATACGAGCTTTACCTTTCCGCATTCCCTTC	60
Clona	1	-----	0
Contig40528	61	ATATCTTGAGGCTGCGGGAGCTCCTCAGATTCAACTTTTGGCATCCCCAAAAATCCCTTCA	120
Clona	1	-----CTGCTTGCTCTTGGAGTCTCATGTTCA	27
Contig40528	121	AAATCCGATTTTCTCTCTGTTTTGCTCTCGCCCTCTTGGCTCTGGAGTCTCATGTTCA	180
Clona	28	TGGCTGTTCTATTTCGCCAAGCTTCCCGGAGTTGATTTATCTGTTGAGAGTTCATAGAGA	87
Contig40528	181	TGGCTGTTCTATTTCGCCAAGCTTCCCGGAGTTGATTTATCTGTTGAGAGTTCATAGAGA	240
Clona	88	ATTCTTCAGGAATAGACTGAGATCTAGCTGAAAGAAATTTCCGTGAACCCCAAATTCGATT	147
Contig40528	241	ATTCTTCAGGAATAGACTGAGATCTAGCTGAAAGAAATTTCCGTGAACCCCAAATTCGATT	300
Clona	148	TTCGGGGAGACTTTGGAAAGCCTATCGCCTATGGACACGCTACTTAAAGACGCCAACAAAC	207
Contig40528	301	TTCGGGGAGACTTTGGAAAGCCTATCGCCTATGGACACGCTACTTAAAGACGCCAACAAAC	360
Clona	208	TTGAGTTCCTTCCCAAACTTCATGGGTTTTCCGGAGAAAGTGAGTATTTTGAATCCTCCCA	267
Contig40528	361	TTGAGTTCCTTCCCAAACTTCATGGGTTTTCCGGAGAAAGTGAGTATTTTGAATCCTCCCA	420
Clona	268	AGCTTCAAAGCAAAGGAGCTTAAAGCTTGGTCTTAGCAGGCCTTGTCTGAGAAAAGCTAGGA	327
Contig40528	421	AGCTTCAAAGCAAAGGAGCTTAAAGCTTGGTCTTAGCAGGCCTTGTCTGAGAAAAGCTAGGA	480
Clona	328	ATAGTTGCCCTTAAGGCCAATTCATAGCACTCTCACGGAACTTGTTCGGGAAATCAAGAAAGG	387
Contig40528	481	ATAGTTGCCCTTAAGGCCAATTCATAGCACTCTCACGGAACTTGTTCGGGAAATCAAGAAAGG	540
Clona	388	AGAATCTTGAATTTGAGGCTTCCCTCTCTATGACCCATCAAAAAGCCCTTGTGTTGGATCTAG	447
Contig40528	541	AGAATCTTGAATTTGAGGCTTCCCTCTCTATGACCCATCAAAAAGCCCTTGTGTTGGATCTAG	600
Clona	448	CTGTTCTAGGAGCTGGCCCTCCAGGCTCTGGCTGTTTGGCCAGCAGGTTTCCAGAGCCAGGGC	507
Contig40528	601	CTGTTCTAGGAGCTGGCCCTCCAGGCTCTGGCTGTTTGGCCAGCAGGTTTCCAGAGCCAGGGC	660
Clona	508	TTTCGGTCTGCACGATTGACCTTCCGCCAAAATGATTTGGCCTAATAATTAAGTCTTT	567
Contig40528	661	TTTCGGTCTGCACGATTGACCTTCCGCCAAAATGATTTGGCCTAATAATTAAGTCTTT	720
Clona	568	GGGTGATGAATTTGAGGCTATGGATTTACTTGAATTCCTTGACACCACTGGAGTGGTG	627
Contig40528	721	GGGTGATGAATTTGAGGCTATGGATTTACTTGAATTCCTTGACACCACTGGAGTGGTG	780
Clona	628	CTGTTGTTTATATTAATGACCAAACAAAGAAGGATCTTGATAGACCTTATGGAGAGTTA	687
Contig40528	781	CTGTTGTTTATATTAATGACCAAACAAAGAAGGATCTTGATAGACCTTATGGAGAGTTA	840
Clona	688	ATAGAAGGCAGCTGAAAGTCCAAAATGCTGCAGAAATGCATATCAAATGGTGTCAAATTTTC	747
Contig40528	841	ATAGAAGGCAGCTGAAAGTCCAAAATGCTGCAGAAATGCATATCAAATGGTGTCAAATTTTC	900

Clona	748	ATCAGGCTAAGGTAATTAAGGTTATCCATGAGCAGTCCAAATCTCTGTGATTTGCGATG	807
Contig40528	901	ATCAGGCTAAGGTAATTAAGGTTATCCATGAGCAGTCCAAATCTCTATTGATTTGCAATG	960
Clona	808	ATGGTGTACGGTTACGGCTACCTTGGTTCTTGATGCCAACAGGGTTTTCTAGGTGCCTTG	867
Contig40528	961	ATGGTGTACGGTTACGGCTACCTTGGTTCTTGATGCCAACAGGGTTTTCTAGGTGCCTTG	1020
Clona	868	TGCAGTATGATAGGCCCTATAATCCTGGTTACCAAGTGGCTTATGGAAATTTAGCCGAGG	927
Contig40528	1021	TGCAGTATGATAAGGCCCTATAATCCTGGTTACCAAGTGGCTTATGGAAATTTAGCCGAGG	1080
Clona	928	TAGAAGAACATCCATTGATGTGGATAAGATGGTTTTTATGGATTGAAGAGATTACACCC	987
Contig40528	1081	TAGAAGAACATCCATTGATGTGGATAAGATGGTTTTTATGGATTGGAGAGATTACACCC	1140
Clona	988	TCACCAACAATAAGGAGCTGAGGGAGAGAAATAGTAAGATACCAACATTTCTCTATGCCAA	1047
Contig40528	1141	TCACCAACAATAAGGAGCTGAGGGAGAGAAATAGTAAGATACCAACATTTCTCTATGCCAA	1200
Clona	1048	TGCCCTTTTCATCTGAGAGAAATTTCTTGAAGAGACTTCCCTTGTGCTCGACCTGGAG	1107
Contig40528	1201	TGCCCTTTTCATCTGAGAGAAATTTCTTGAAGAGACTTCCCTTGTGCTCGACCTGGAG	1260
Clona	1108	TACAAATGAAGGACATCCAGGAAAGAATGGTGGCTAGGTTAAGGCACCTTAGGCATAAAG	1167
Contig40528	1261	TACAAATGAAGGACATCCAGGAAAGAATGGTGGCTAGGTTAAGGCACCTTAGGCATAAAG	1320
Clona	1168	TGAAAAGTATTGAAGAGGATGAGCATTGTGTGATTCCGATGGGCGACCCCTTCCTGTGC	1227
Contig40528	1321	TGAAAAGTATTGAAGAGGATGAGCATTGTGTGATTCCGATGGGCGACCCCTTCCTGTGC	1380
Clona	1228	TTCCCCAAGAGATTGTGGGAATCGGTGGAACAGCTGGGATGGTGCACCCCTCAACTGGGT	1287
Contig40528	1381	TTCCCCAAGAGATTGTGGGAATCGGTGGAACAGCTGGGATGGTGCACCCCTCAACTGGGT	1440
Clona	1288	ACATGGTAGCGAGGACCCTAGCAGCAGCTCCACTTGTGGCCAACTCCATTGTCCAGTGCC	1347
Contig40528	1441	ACATGGTAGCGAGGACCCTAGCAGCAGCTCCAAATGTTGGCCAACTCCATTGTCCAGTGCC	1500
Clona	1348	TTGGTTCTGAAAGGAGCCTATCAGCAGATGTGTGTCTGAAAGTAGTTTGGAAAGATTTAT	1407
Contig40528	1501	TTGGTTCTGAAAGGAGCCTATCAGCAGATGTGTGTCTGAAAGTAGTTTGGAAAGATTTAT	1560
Clona	1408	GGCCCATAGAAAGGAGGAGACAGAGGGAATTCCTCTGTTTGGCATGGATATTCTGCTGA	1467
Contig40528	1561	GGCCCATAGAAAGGAGGAGACAGAGGGAATTCCTCTGTTTGGCATGGATATTCTGCTGA	1620
Clona	1468	AGCTAGATTACAAGCTACAAGAAGATTTTTGATGCATTTTTAATCTGGAACCTCGAT	1527
Contig40528	1621	AGCTAGATTACAAGCTACAAGAAGATTTTTGATGCATTTTTAATCTGGAACCTCGAT	1680
Clona	1528	ATTGGCATGGATTCTTGTCTATCTGGGTTGTTCCCTCCAGACCTTTTATTTTTGGGCTTT	1587
Contig40528	1681	ATTGGCATGGATTCTTGTCTATCTGGGTTGTTCCCTCCAGACCTTTTATTTTTGGGCTTT	1740
Clona	1588	CTCTATTCTCTAATGCTTCTAATACTTCTAGGATAGAGATTATGGCCAAAGGC-----	1639
Contig40528	1741	CTCTATTCTCTAATGCTTCTAATACTTCTAGGATAGAGATTATGGCCAAAGGC-----	1800
Clona	1640	-----	1639
Contig40528	1801	CTTTGGTTAAGATGATCAACAACCTTAATACAGGATAGCGATTAATATGGTCAGGAAGGAC	1860

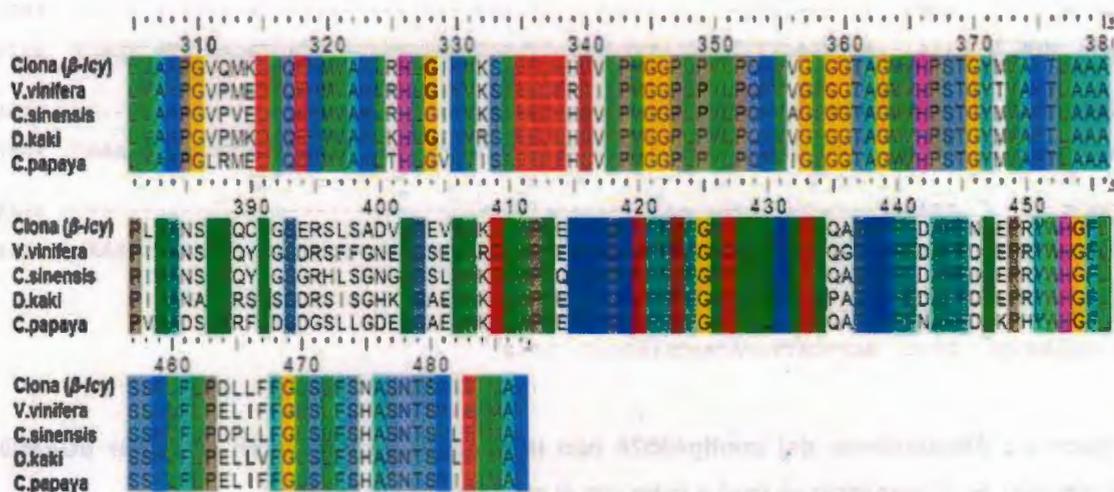


Figura 2.4 Alineamiento del gen β -lyc de *Bixa orellana* con genes ortólogos. El color indica las regiones que comparten identidad entre las secuencias de las proteínas, mientras que la ausencia de color indica las regiones que no comparten identidad. El alineamiento se realizó con el algoritmo CLUSTALW2 con las secuencias de las especies: *Citrus sinensis* (AY679168.1), *Vitis vinifera* (JQ319639.1), *Carica papaya* (ACM24791.1) y *Diospyros kaki* (ACR25158.1).

2.3.3. Análisis bioinformático del gen β -lyc

Existen escasos estudios concernientes a la estructura de la secuencia de la proteína licopeno beta ciclasa en plantas. No obstante se tienen identificados *in situ* algunos dominios conservados entre las ciclasas (Cunningham *et al.*, 1996, Hugueney *et al.*, 1995). A través de la comparación de la secuencia aislada con genes ortólogos, donde se tienen determinados estos dominios, se identificaron los motivos IPTFLYAMpf- ---FLEET (MI), PStGYMvart- (MII), SsALLeLVPETKKNLDFELPmYDp, una región con carga IERRRQREFF, un motivo de unión a dinucleótido vVGGGPAGLAVAQQVSEAGLSVcSIDP y dos sitios transmembranales VARTLAAAPvVANAIi-YLgSe y HGFLSSRLfLPELIVFGLSLFshAS (Figura 2.5) (Cunningham *et al.*, 1996, Hugueney *et al.*, 1995).

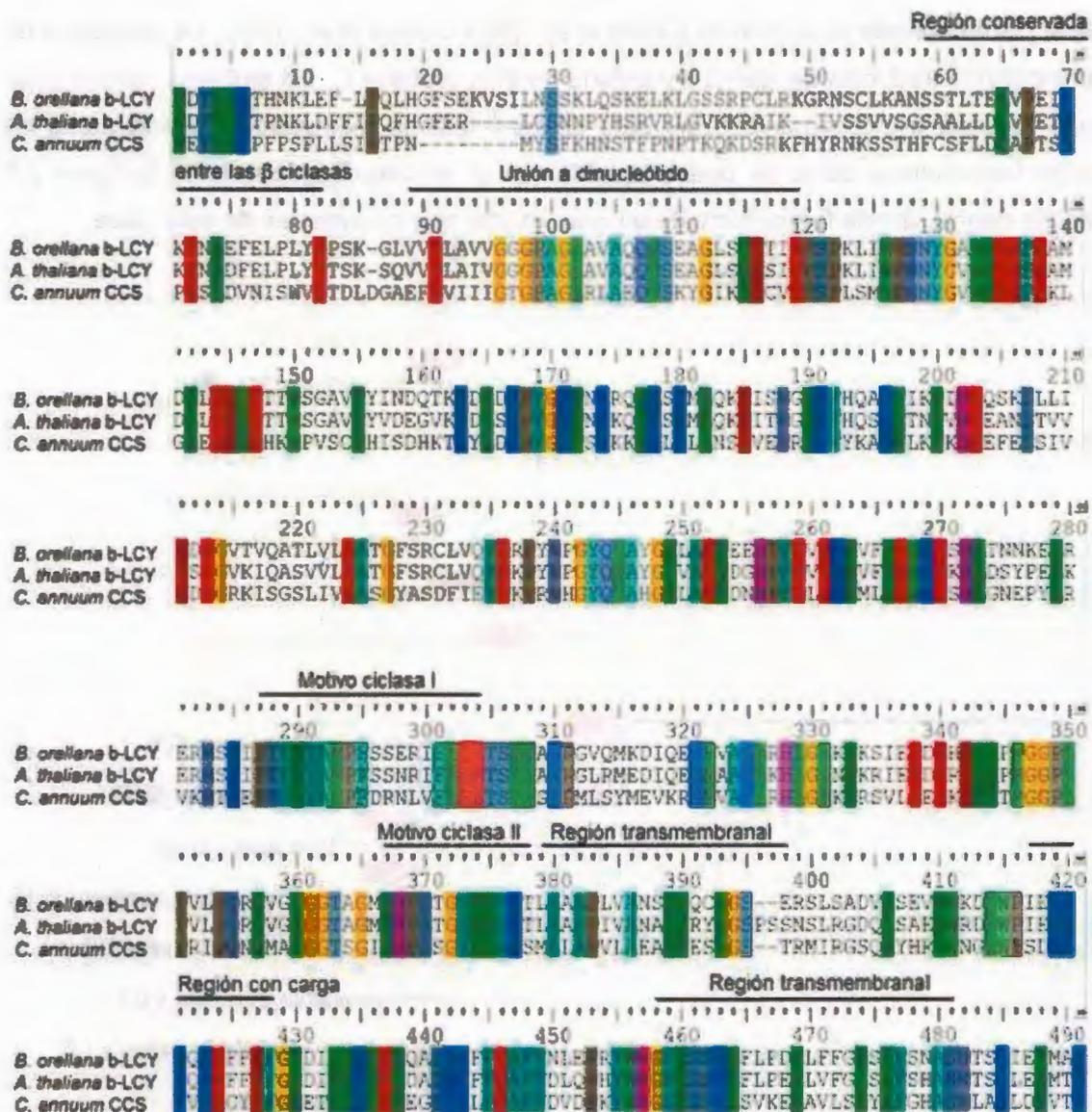


Figura 2.5 Análisis estructural de la enzima licopeno beta ciclasa de *Bixa orellana*. En la parte superior del alineamiento se indican con una línea horizontal, la región de las secuencias que corresponden dominios conservados, reportados para la proteína licopeno beta ciclasa en plantas (Cunningham *et al.*, 1996, Huguenev *et al.*, 1995). Para el alineamiento se utilizó las secuencias pertenecientes a las especies *Arabidopsis thaliana* (AAB53337.1) y *Capsicum annuum* (Q42435.1).

Se ha reportado en algunas especies de plantas la existencia de dos copias del gen licopeno beta ciclasa, que se expresan de manera diferencial y en diferentes órganos

de la planta durante su desarrollo (Devitt *et al.*, 2009, Ronen *et al.*, 2000). La secuencia de aminoácidos traducida del gen β -*lcy* aislada de *Bixa orellana* L., sin embargo parece estar más cercana evolutivamente a las beta ciclasas que se expresan preferentemente en tejido fotosintético, como se puede apreciar en el análisis filogenético de la figura 2.6 (flecha negra), donde forma parte de un solo clúster con las enzimas de esta clase.

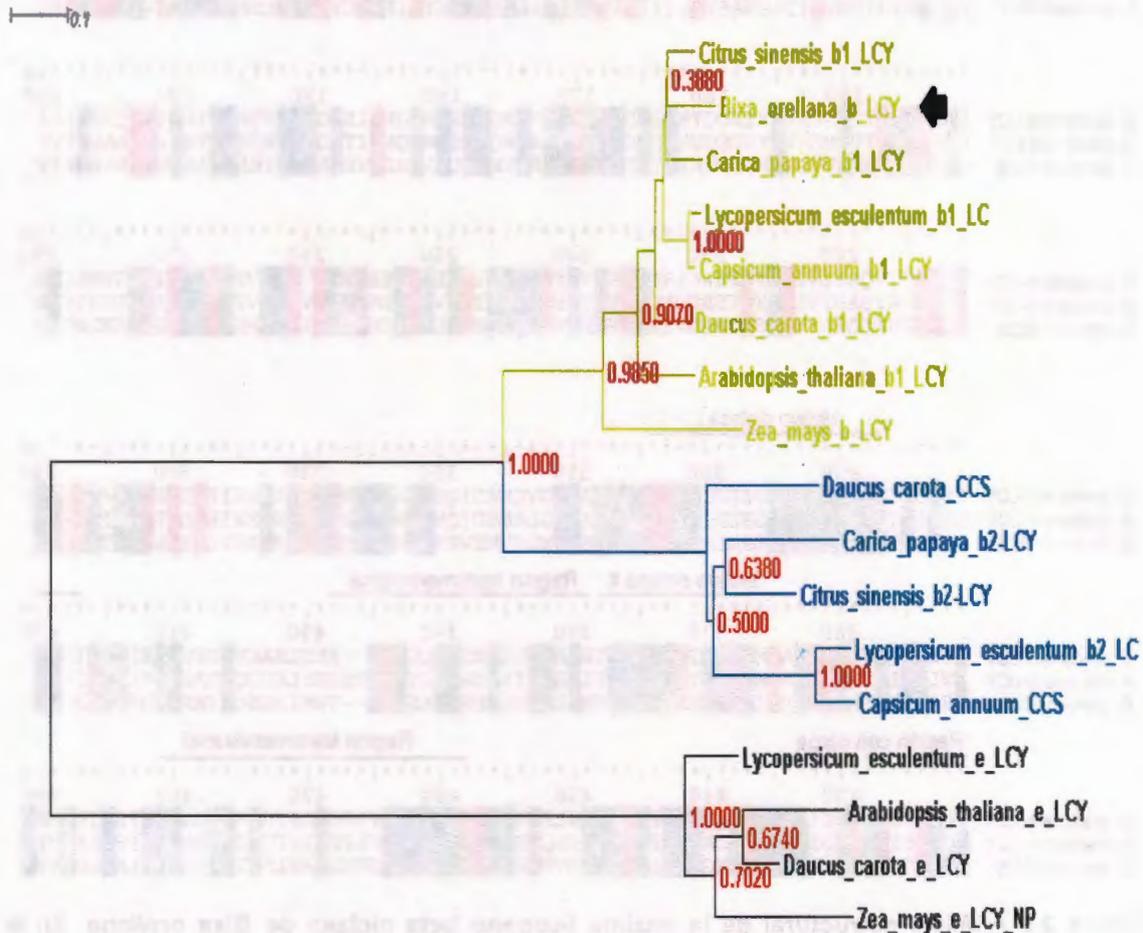


Figura 2.6 Análisis filogenético de la secuencia del gen β -*lcy* con genes ortólogos. El estudio fue realizado con el programa MEGA5, para el análisis se usó el método estadístico Neighbor-Joining, con un Bootstrap de 1000 réplicas. La distancia evolutiva fue calculada con el modelo Jones-Taylor-Thornton con una distribución gamma de 0.8. Las secuencias fueron alineadas con el algoritmo ClustalW, y editadas con MEGA5, donde se eliminaron los extremos de las secuencias y los gaps fueron eliminados del alineamiento. La secuencia aislada de *Bixa orellana* se indica con una flecha negra, el color verde indica

el clúster con secuencias expresadas preferentemente en tejido fotosintético: *Citrus sinensis* (AAM21152.1), *Carica papaya* (ABD91578.1), *Lycopersicon esculentum* (CAA60170.1), *Capsicum annuum* (CAA60119.1), *Daucus carota* (ABB52071.1), *Arabidopsis thaliana* (AAB53337.1). El color azul indica el clúster que agrupa secuencias que se expresan en tejido no fotosintético: *Daucus carota* (ABB52072), *Carica papaya* (ACR61334.1), *Citrus sinensis* (AAF18389.1), *Lycopersicon esculentum* (AAG21133.1) y *Capsicum annuum* (Q42435.1). El clúster de color negro indica las secuencias traducidas del gen licopeno épsilon ciclasa: *Lycopersicon esculentum* (NP_001234337.1), *Arabidopsis thaliana* (AAF82389.1) y *Daucus carota* (ABB52073.1). *Zea mays* se utilizó como control externo (BLCY1= AAO18661.1 ELCY= NP_001146840.1).

2.4. AISLAMIENTO DEL GEN *PDS* EN ACHIOTE

Para la secuencia del gen *pds* se identificó entre las secuencias del transcriptoma de achiote de hoja, semilla madura e inmadura a los contigs 1009 con un tamaño de 2204 pb así como el contig 22441 con una longitud de secuencia de 2312 pb que se alinearon significativamente con el fragmento del gen *pds* de 755 pb (DQ924534) aislado por el grupo de investigación de la Dra. Renata Rivera en el Centro de investigación científica de Yucatán. Para el aislamiento de la secuencia del gen completo de la *pds* en *Bixa orellana* L., se diseñaron dos pares de cebadores nombrados como PDSa y PDSb (Figura 2.7), usando la información del contig 1009, puesto que fue el que mostro menor presencia de regiones ambiguas y al compararlo con genes ortólogos que codifican para la enzima fitoeno desaturasa reportadas en el NCBI, presento un porcentaje de identidad de alrededor del 80% con especies cercanas al achiote como *Arabidopsis thaliana* (NM_117498), *Citrus sinensis* (AEQ29524.1) y *Vitis vinifera* (AFP28796.1), además de un ORF de 1700 pb (Figura 2.7).

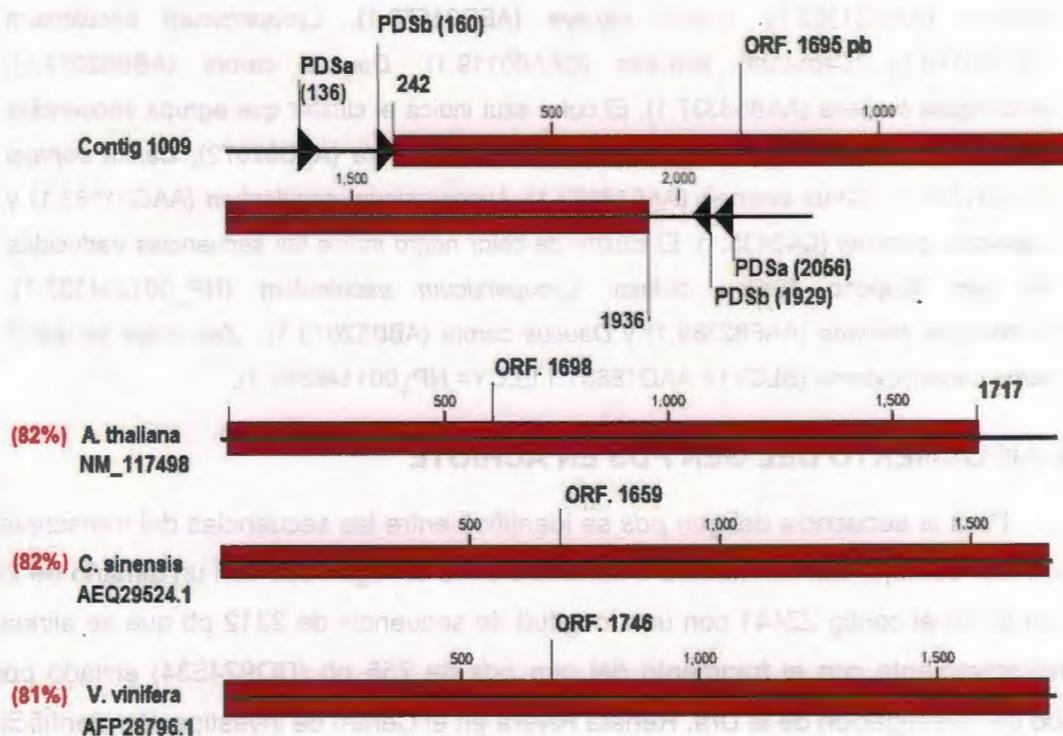


Figura 2.7 Comparación del marco de lectura abierto de la secuencia del contig 1009 con genes ortólogos. El rectángulo rojo muestra la posición del ORF del contig así como de los genes de la *pds* de especies cercanas a *Bixa orellana*: *A. thaliana* (NM_117498), *C. sinensis* (AEQ29524.1), y *V. vinifera* (AFP28796.1). Se indica con números rojos el porcentaje de identidad con respecto al contig. Además se señala con triángulos negros la posición de los pares de cebadores diseñados para aislarlo de cDNA de *Bixa orellana* L.

No obstante al intentar amplificar la secuencia del contig 1009, con cDNA de hojas jóvenes de achiote, con los dos pares de cebadores diseñados (Figura 2.7.), se observó un bandeo inespecífico en las reacciones de PCR a diferentes temperaturas de fusión que aumenta conforme se baja la temperatura para ambos casos (Figura 2.8). Para los experimentos con el par de cebadores PDSa el tamaño esperado del amplicon (figura 2.3. rectángulo rojo), se localiza en el rango de temperaturas de 58 a 50 °C. Mientras que para el cebador PDSb se observa una banda con el tamaño esperado a una temperatura de fusión de 50.7 °C (figura 2.8 rectángulo rojo). Con las anteriores observaciones acerca del tamaño del amplicon esperado, se prosiguió a intentar purificar las bandas que corresponde al producto de PCR esperado (Figura 2.8) y re-amplificarlas para poder

clonarlas en el vector pGEM®-T (Promega) y enviar las clonas a secuenciar para corroborar que la secuencia corresponde a la del gen *pds*. Sin embargo no hubo éxito en las reacciones de PCR para re-amplificar las bandas con ambos pares de cebadores.

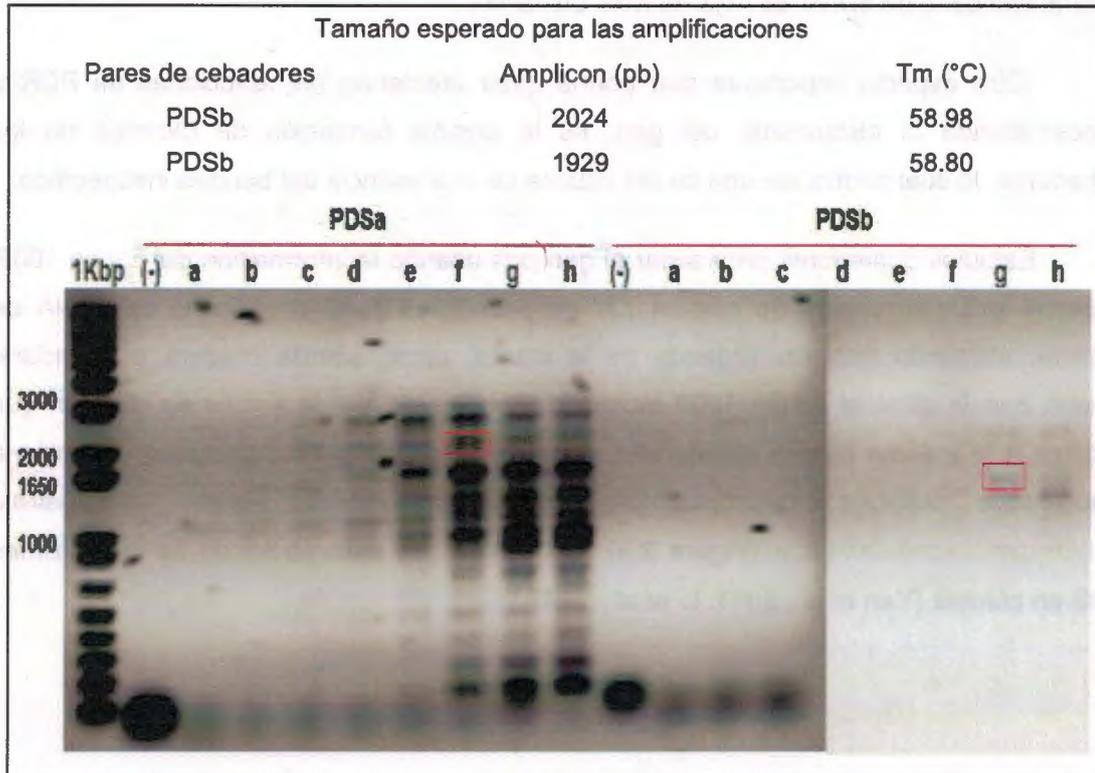


Figura 2.8 Reacción en cadena de la polimerasa utilizando los pares de cebadores PDSa y PDSb para aislar el contig 1009 a diferentes temperaturas de fusión. Para la reacción de PCR se usó cDNA extraído de hojas jóvenes de la planta P13 utilizando la enzima FastStart Taq DNA (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Suiza). Se indica con una línea roja los carriles que pertenecen a cada par de cebadores con el nombre en la parte superior de cada línea roja. Las temperaturas aplicadas a cada reacción son las siguientes: a= 60.0, b= 59.2, c= 58.0, d= 56.1, e= 53.7, f= 51.9, g= 50.7 h= 50.0. Se señala con un rectángulo rojo la banda que se aproxima al tamaño esperado para cada par de cebador. En la parte superior de la figura se mencionan las características de cada par de cebador.

Los problemas presentados anteriormente para aislar la secuencia del gen que codifica a la enzima PDS en achote usando la información de la secuencia del contig 1009, podría atribuirse a un error en el ensamblaje de las lecturas que forman los extremos del ORF del contig 1009 y de los cuales se diseñaron los dos par de cebadores para amplificarlo de cDNA de hoja de *Bixa orellana* L.

Otro aspecto importante que podría estar afectando las reacciones de PCR e imposibilitando el aislamiento del gen, es la posible formación de dímeros de los cebadores, lo cual podría ser una de las causas de la presencia del bandeo inespecífico.

Estudios posteriores para aislar el gen *pds* usando la información del contig 1009, deberán incluir el diseño de nuevos par de cebadores para amplificarlo de cDNA de achote, utilizando distintos órganos de la planta, como semilla madura e inmadura, puesto que *in silico* el contig 1009 mostro evidencias de ser la secuencia del gen que codifica a la enzima fitoeno desaturasa, como la presencia de los dominios de unión a dinucleótido GAGLaGLSTAKYLADAGHKPiLLEARDVLGG y de unión a sustrato AGDYTKQKYLASMEGAVLSGK (Figura 2.9), los cuales son característicos de las enzimas PDS en plantas (Yan *et al.*, 2011, Li *et al.*, 1996,).

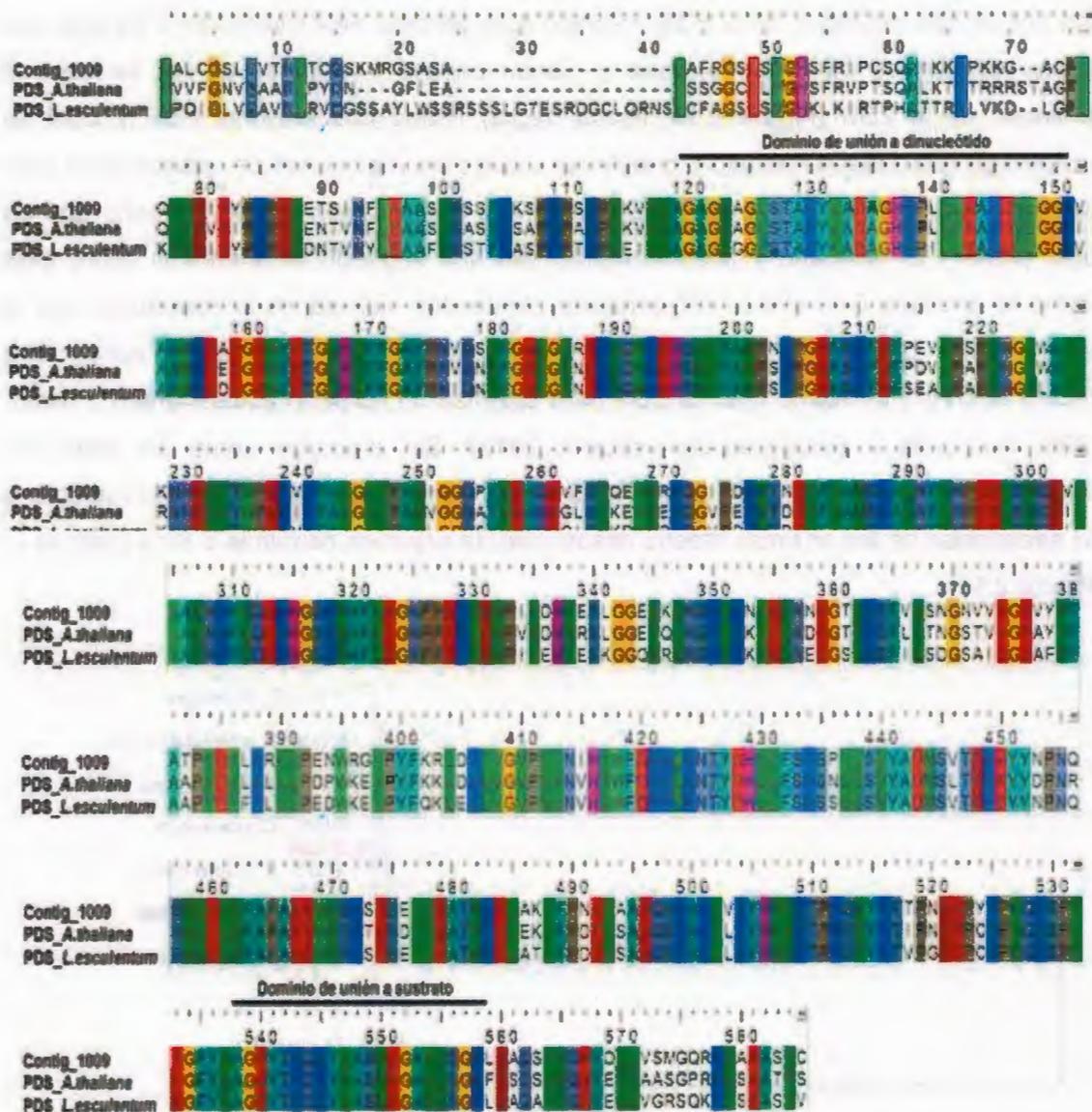


Figura 2.9 Análisis estructural de la enzima fitoeno desaturasa de *Bixa orellana* L. Para el alineamiento se utilizaron las secuencias de la enzima PDS de *A. thaliana* (AAA20109.1) y *C. annuum* (CAA48195.1). Las regiones con color en el alineamiento indican identidad entre las secuencias, mientras que las regiones con falta de color representan ausencia de identidad.

Además la secuencia del ORF del contig 1009 muestra estar relacionada con las enzimas fitoeno desaturasa de especies cercanas a achiote, donde forma un solo clúster

con secuencias ortólogas de la PDS, estando más cercana evolutivamente a las enzimas fitoeno desaturasa de *Citrus sinensis* y *Carica papaya* y alejadas de las secuencias ortólogas de la ZDS (Figura 2.10, flecha negra). Estas dos enzimas PDS y ZDS se encuentran relacionadas debido a que llevan a cabo las reacciones de desaturación para dar lugar al licopeno. La enzima PDS realiza una desaturación sobre el fitoeno que da lugar primero al fitoflueno y posteriormente con una segunda desaturación sobre este último se produce ζ -caroteno, el ζ -caroteno pierde dos hidrógenos al reaccionar con la enzima ZDS generando moléculas de neurosporeno, que finalmente sufren una desaturación por la misma enzima ZDS para sintetizar el licopeno (Cunningham y Gantt, 1998, Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Sin embargo como se mencionó anteriormente la secuencia del contig 1009 se encuentra más cercana evolutivamente a las secuencias de las enzimas fitoeno desaturasa de especies cercanas a *Bixa orellana* L. (Figura 2.10).

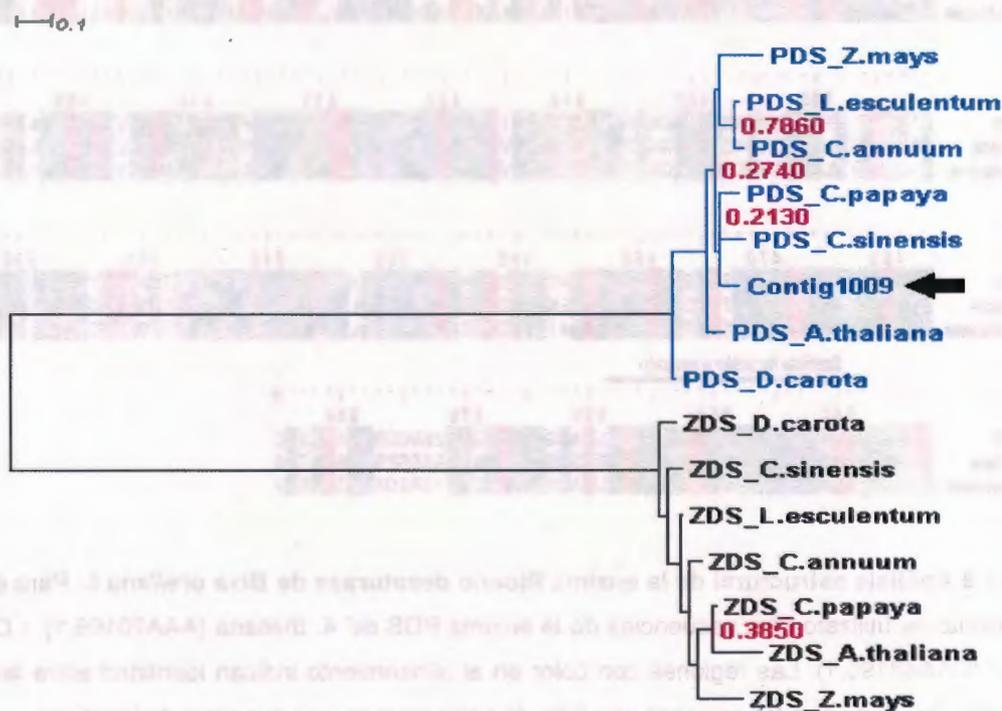


Figura 2.10 Análisis filogenético de la secuencia de aminoácidos traducido del contig 1009 con secuencias ortólogas de especies cercanas a *Bixa orellana* L. El análisis fue realizado con el programa MEGA5, usando el método estadístico Neighbor-Joining, con un Bootstrap de 1000 réplicas. La distancia evolutiva se infirió con el modelo

Jones-Taylor-Thornton con una distribución gamma de 0.2. Para el alineamiento se utilizó el algoritmo Clustalw. Las secuencias fueron editadas cortando los extremos de las secuencias y eliminando los gaps del alineamiento. La secuencia del contig 1009 se señala con una flecha negra, el color azul indica el clúster con secuencias pertenecientes a la enzima PDS en especies cercanas a *Bixa orellana* L., *L. esculentum* (CAB59726.1), *C. annuum* (CAA48195.1), *C. papaya* (ABG77271.2), *C. sinensis* (AEQ29524.1), *A. thaliana* (AAA20109.1), *D. carota* (ABB52082.1). El color negro indica las secuencias traducidas del gen ZDS de especies cercanas al achiote *L. esculentum* (ABD67160.1), *C. annuum* (AAB35386.1), *C. papaya* (ACO40527.1), *C. sinensis* (CAC85667.1), *A. thaliana* (AEE74149.1), *D. carota* (ABB52083.1). *Zea mays* se utilizó como control externo (PDS = AAC12846.1, ZDS = AAV91511.1).

2.5. DISCUSIÓN

Como se mencionó al inicio del capítulo, en el laboratorio se iniciaron estudios encaminados al estudio de polimorfismos en fragmentos de genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides en *Bixa orellana* (Martín-Rodríguez, 2010). No obstante para continuar con el trabajo y dilucidar cambios en las secuencias de estos genes para su uso como marcadores moleculares es necesario aislar las secuencias completas. Por lo que nos dimos a la tarea de aislar los genes *pds* y *β-lyc* en achiote.

Con la secuencia parcial del gen *β-lyc* de 491 pares de bases (AY836587) fue posible obtener el ORF del gen, usando la secuencia parcial como blanco en una base de datos de contigs de un transcriptoma de hoja, semilla madura e inmadura de achiote. Se sabe que esta enzima es la responsable de añadir anillos beta terminales en la molécula lineal C_{40} *trans*-licopeno para dar lugar al beta caroteno (Cunningham y Gantt, 1998). La secuencia identificada como el gen *β-lyc* en achiote mostró similitud con genes ortólogos de plantas como *Vitis vinifera* (JQ319639.1), *Citrus sinensis* (AY679168.1), *Carica papaya* (ACM24791.1), *Diospyros kaki* (ACR25158.1) entre otras especies, además de un ORF de 1511 pb que *in silico* traduce a un proteína de 504 aminoácidos, lo cual se asemeja al tamaño reportado para esta enzima entre las angiospermas (Scolnik y Bartley 1995, Young *et al.*, 2012,). Con la información del contig aislamos una secuencia de 1639 pb que *in silico* presenta regiones conservadas entre las ciclasas, entre las que destacan un posible sitio catalítico FLEET, un dominio de unión a dinucleótido, así como una región conservada entre las beta-ciclasas de plantas (Cunningham *et al.*, 1996, Hugueney *et al.*, 1995, Bouvier *et al.*, 1997). Estos dominios fueron propuestos mediante el alineamiento de secuencias ortólogas del gen *β-lyc* de *Arabidopsis thaliana* (U50739) y de la cianobacteria *Synechococcus sp.* (PCC7942), con el gen *ccs* de la especie *Capsicum annuum* (X86221) (Cunningham *et al.*, 1996, Hugueney *et al.*, 1995), esto debido a que la enzima que codifica el gen *ccs* es capaz en un sistema heterólogo, de formar anillos κ en moléculas de anteraxantina o violoxantina para producir capsantina o capsorubina así como anillos β en la molécula licopeno para sintetizar β -caroteno (Bouvier *et al.*, 1997). Estas observaciones y el hecho de que ambas enzimas CCS y β -LCY en *C. annuum* comparten 55% de identidad en su secuencia de aminoácidos, son las evidencias de Hugueney y colaboradores (1995) para sustentar la hipótesis de que los dos genes comparten una relación evolutiva en bacteria y en plantas superiores. La anterior hipótesis

se fortalece con la existencia de una segunda copia del gen β -*lcy* aislado en plantas de jitomate por Ronen y colaboradores (2000), y después en papaya por Devitt y colaboradores (2009), así como en *Crocus sativus* (Ahrazem *et al.*, 2010) la cual se expresa preferentemente en tejido no fotosintético durante la maduración del fruto y se encuentran evolutivamente más cerca al gen *ccs* que con el gen β -*lcy* expresado preferentemente en tejido fotosintético (Ahrazem *et al.*, 2010, Devitt *et al.*, 2009, Ronen *et al.*, 2000), no obstante el gen aislado de la planta *Bixa orellana* se encuentra evolutivamente más cercano con las secuencias ortólogas del gen β -*lcy* que se expresa en tejido fotosintético.

Para el fragmento del gen *pds* de 755 pares de bases (DQ924534) que codifica a la enzima fitoeno desaturasa que participa en las reacciones de desaturación de la molécula fitoeno (Cunningham y Gantt, 1998) se identificó al contig 1009 como posible secuencia del gen *pds*, además al igual que con la secuencia de aminoácidos traducida del gen β -*lcy*, se identificaron dominios conservados entre las enzimas fitoeno desaturasas de plantas superiores en la secuencia de aminoácidos traducida del contig 1009, (Li *et al.*, 1996, Yan *et al.*, 2011), y en el análisis filogenético se agrupa entre las enzimas PDS aisladas de otras plantas, estando distante de las enzimas ZDS, y mostrando estar más cerca evolutivamente con las enzimas fitoeno desaturasa de *C. papaya* (ABG77271.2), y *C. sinensis* (AEQ29524.1). La anterior evidencia fortalece la hipótesis de que el contig 1009, es la secuencia del gen *pds* de *Bixa orellana*. Sin embargo no se pudo corroborar la existencia del contig al intentar aislarlo del DNA complementario de hojas jóvenes de achiote. Los pares de cebadores diseñados para amplificar el contig 1009 se localizan fuera del ORF, por lo que existe la posibilidad de que estas regiones pudieran estar mal ensambladas y no pertenecer a los extremos del contig 1009, que muestra fuertes evidencias *in silico* de ser la secuencia del gen *pds*. Otra posible causa es que los pares de cebadores pudieran estar formando dímeros durante las reacciones de PCR, por lo que se deberá considerar para futuros experimentos el diseño de nuevos pares de cebadores localizados dentro del ORF del contig 1009.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., López, R. C., y L. Gómez-Gómez (2010). The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 105-119.
- Beyer, P., Kröncke, U., y V. Nievelstein (1991). On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17072-17078.
- Bouvier, F., y B. Camara (1997). Molecular analysis of carotenoid cyclase inhibition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 346(1), 53-64.
- Coesel, S. N., Baumgartner, A. C., Teles, L. M., Ramos, A. A., Henriques, N. M., Cancela, L., y J. C. S. Varela (2008). Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for *psy* and *pds* steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. *Marine Biotechnology*, 10(5), 602-611.
- Cunningham Jr, F. X., y E. Gantt (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 557-583.
- Cunningham, F. X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K. A., DellaPenna, D., y E. Gantt, (1996). Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *The Plant Cell Online*, 8(9), 1613-1626.
- Devitt, L. C., Fanning, K., Dietzgen, R. G., y T. A. Holton (2009). Isolation and functional characterization of a lycopene β -cyclase gene that controls fruit colour of papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 33-39.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., y G. S. Dveksler (1993). General concepts for PCR primer design. *Genome Research*, 3(3), S30-S37.

-
- Fraser, P. D., y P. M. Bramley (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 228-265.
- Hao, H., Ma, L., Cong, H., Li, Q., y X. Yu (2012). Isolation and characterization of a muskmelon cDNA encoding Lycopene Beta-cyclase. *Gene*, 503(1), 147.
- Huguenev, P., Badillo, A., Chen, H. C., Klein, A., Hirschberg, J., Camara, B., y M. Kuntz (1995). Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *The Plant Journal*, 8(3), 417-424.
- Kita, M., komatsu, A., Omura, M., Yano, M., Ikoma, Y., y T. Moriguchi (2001). Cloning and expression of CitPDS1, a gene encoding phytoene desaturase in *Citrus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 65, 1424-1428.
- Li, Z. H., Matthews, P. D., Burr, B., y E. T. Wurtzel (1996). Cloning and characterization of a maize cDNA encoding phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Molecular Biology*, 30(2), 269-279.
- Lopez, A. B., Yang, Y., Thannhauser, T. W., y L. Li (2008). Phytoene desaturase is present in a large protein complex in the plastid membrane. *Physiologia Plantarum*, 133(2), 190-198.
- Mann, V., Pecker, I., y J. Hirschberg (1994). Cloning and characterization of the gene for phytoene desaturase (*Pds*) from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Molecular Biology*, 24(3), 429-434.
- Martín-Rodríguez M. E. (2010). Uso de Genes Involucrados en la Síntesis de Carotenoides como Marcadores moleculares de Pigmentos en Achiote, Tesis de Maestría en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), 32-73.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T., y H. Erlich (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (Vol. 51, No. Pt 1, pp. 263-273).

-
- Rodríguez-Ávila, N. L., Narváez-Zapata, J. A., Aguilar-Espinosa, M. L., y R. Rivera-Madrid (2009). Full-Length Gene Enrichment by Using an Optimized RNA Isolation Protocol in *Bixa orellana* Recalcitrant Tissues. *Molecular Biotechnology*, 42(1), 84-90.
- Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D., y J. Hirschberg (2000). An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), 11102-11107.
- Ruiz-Sola, M. A., M. Rodríguez-Concepción (2012). Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 10, 2-28.
- Scolnik, P. A., y G. E. Bartley (1993). Phytoene desaturase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 103(4), 1475.
- Scolnik, P. A., y G. E. Bartley, G. E. (1995). Nucleotide sequence of Lycopene cyclase (Genbank L40176) from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 108(1342), 561-568.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., y S. Kumar (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Wan, Q., Zhang, X. G., y M. Song (2007). Fruit-specific RNAi-mediated *lcy* gene enhances content of lycopene in tomatoes silencing. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao= Chinese Journal of Biotechnology*, 23(3), 429.
- Welsch, R., Maass, D., Voegel, T., DellaPenna, D., y P. Beyer (2007). Transcription factor RAP2. 2 and its interacting partner SINAT2: stable elements in the carotenogenesis of *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology*, 145(3), 1073-1085.
- Yan, P., Gao, X. Z., Shen, W. T., y P. Zhou (2011). Cloning and expression analysis of phytoene desaturase and ζ -carotene desaturase genes in *Carica papaya*. *Molecular Biology Reports*, 38(2), 785-791.

Young, P. R., Lashbrooke, J. G., Alexandersson, E., Jacobson, D., Moser, C., Velasco, R., y M. A. Vivier (2012). The genes and enzymes of the carotenoid metabolic pathway in *Vitis vinifera* L. BMC Genomics, 13(1), 243.

Yu, B., Lydiate, D. J., Young, L. W., Schäfer, U. A., y A. Hannoufa (2008). Enhancing the carotenoid content of *Brassica napus* seeds by downregulating lycopene epsilon cyclase. Transgenic Research, 17(4), 573-585.



CAPÍTULO III

DETECCIÓN DE SNP (CAMBIOS PUNTUALES EN EL ADN), MEDIANTE LA TÉCNICA SSCP (POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA DE ADN) EN GENES INVOLUCRADOS EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN *BIXA ORELLANA* L.

3.1. INTRODUCCIÓN

Este capítulo se especifica la metodología necesaria para la utilización de la técnica SSCP en achiote. Esta técnica fue desarrollada por Orita y colaboradores (1989) para la identificación de mutaciones en células cancerígenas humanas. Sin embargo, se ha utilizado también en tejidos vegetales para la localización de polimorfismos en el DNA de plantas de interés agronómico como por ejemplo arroz (Shirasawa *et al.*, 2004), En este último estudio se aplicó la técnica SSCP en 45 genes amplificados al azar a partir de 21 diferentes accesiones de *Oryza sativa* L., obteniéndose 142 mutaciones puntuales así como también 32 inserciones y deleciones.

Así mismo la técnica SSCP ha sido probada en la especie *Quercus robur* L. Analizando tres familias del roble junto con sus parentales, los autores reportan diferentes perfiles SSCP entre los seis fragmentos de DNA estudiados; basándose en los resultados de las plantas segregantes. Las diferencias encontradas en el número de bandas de cada ejemplar se atribuyen a la existencia de múltiples alelos entre las variantes analizadas. Los autores estiman que los perfiles SSCP que exhiben solo dos bandas son homocigotos mientras que los perfiles con patrones de tres o cuatro bandas son probablemente heterocigotos (Bodenes *et al.*, 1996). En lo que concierne a los estudios realizados en genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides, se ha utilizado recientemente esta metodología para dilucidar el número de copias en el gen *psy* en *Brassica napus* L identificando seis miembros de la familia del gen que codifica a la enzima fitoeno sintasa en esta especie (Cardenas *et al.*, 2012).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Colecta de las muestras a analizar

El material vegetal fue colectado en la plantación “La Extra” ubicado en Chicxulub Pueblo en el estado de Yucatán, México (21.143698, -89.511256), donde se encuentran plantas con características fenotípicas contrastantes, como son el color de la flor, la tonalidad y dehiscencia del fruto, así como el contenido de bixina en las semillas maduras (Martín-Rodríguez, 2010, Rivera-Madrid *et al.*, 2006). En estudios previos por el grupo de la Dra. Rivera y colaboradores (2006), se observó que existen caracteres en las plantas de achiote asociados con el contenido de pigmento acumulado en las semillas. Por tal motivo se consideraron para el presente estudio las accesiones P12, P13, N20, P37 que poseen flor blanca y fruto indehisciente verde, así como las plantas N9, N8, N3, N6, N1, N4 y Bc que tienen pétalos de tonalidad rosada y fruto dehisciente verde con espinas rojas y por último la N5 que tiene flores de color rosado pero fruto dehisciente rojo (Cuadro 3.1., Cuadro 3.2.). Para la toma del material vegetal, se colectaron las hojas jóvenes enteras, las cuales fueron envueltas en papel aluminio y depositadas en un termo con nitrógeno líquido para su transporte, para luego ser colocadas en un ultra-congelador a -80° C para su conservación.

Cuadro 3.1. Características fenotípicas de las accesiones de *Bixa orellana* L., analizadas con la técnica Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP).

Accesión	Color de Flor	Color de Fruto	Dehiscencia
P12	Blanca	Verde	No
P13	Blanca	Verde	No
N20	Blanca	Verde	No
P37	Blanca	Verde	No
N9	Rosada	Verde/rojo	Si
N8	Rosada	Verde/rojo	Si
N3	Rosada	Verde/rojo	Si
N6	Rosada	Verde/rojo	Si
N1	Anteras Lila	Verde/rojo	Si
N4	Anteras Lila	Verde/rojo	Si
Bc	Anteras Lila	Verde/rojo	Si
N5	Anteras Lila	Rojo intenso	Si

Cuadro 3.2. Fenotipos contrastantes en color de flor y fruto de las 12 variantes de achiote usados en el estudio.

Accesión	Flor	Fruto
P12		
P13		
N20		

P37



N9



Y N8



N3



N6



N1



N4



Bc



N5



3.2.2. Extracción de DNA de 12 plantas de achiote

El DNA genómico de *Bixa orellana* L., fue aislado de las plantas P12, P13, N20, P37, N9, N8, N3, N6, N1, N4, Bc, y N5 usando el estuche comercial DNeasy® Plant Mini siguiendo el protocolo de manufactura (QIAGEN, Netherlands). La concentración de DNA se midió con un ensayo espectrofotométrico a A_{260} y A_{280} nm con el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA), seguido de un análisis electroforético con gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio, para verificar la calidad del DNA extraído.

3.2.3. PCR-SSCP

Usando como templado el DNA genómico se amplificaron por PCR regiones de 200 pares de bases a lo largo de toda la secuencia aislada del gen β -*icy*. Esto a causa de que si se amplifican regiones mayores a 200 pares de bases, la sensibilidad de la técnica SSCP se puede ver afectada, debido a que la detección de mutaciones depende del cambio conformacional de la cadena sencilla de DNA, por consiguiente una misma secuencia mayor a 400 pb puede adoptar varias conformaciones y dar lugar a falsos positivos (Hayashi, 1991). El diseño de cebadores se realizó con el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>).

Para la reacción de PCR se usó el mismo programa y las mismas concentraciones de reactivos señaladas en el apartado 2.2.2., usando 6 ng de DNA genómico. Para corroborar la longitud del amplicón se analizó 1 μ l del producto de la reacción de PCR en una electroforesis de gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

Para el análisis de SSCP se usaron 3 μ l del producto de PCR, con 3 μ l de una solución que contiene 0.05% de azul de bromo fenol, 0.05% de xileno cianol, 95% de formamida y 20 mM de EDTA. Las muestras se calentaron a 94 °C por 4 minutos para su desnaturalización, e inmediatamente incubadas en hielo por 5 minutos. Posteriormente las muestras fueron separadas en un gel de 31.0 cm x 38.5 cm x 0.4 mm (Model S2, GibcoBRL), usando 0.5x de solución Acrylamide for Mutation Detection (Sigma-Aldrich, USA), a un volumen final de 70 ml con 0.6x de TBE, filtrado con papel Whatman® (Cat. No. 1441 125), y enseguida polimerizado agregando 280 μ l de Persulfato de amonio al 10% así como 49 μ l de tetrametil-etileno-diamina (TEMED, Promega USA). Las condiciones de electroforesis fueron de 200 V, 15 mA y 5 W de potencia por 20 horas a 22

°C, usando 1x de TBE como buffer de corrida. Al terminar el tiempo de corrida se observaron las bandas, con tinción de plata de acuerdo el protocolo de Bassam y colaboradores (1991) y fueron registradas las imágenes de las electroforesis con un escáner ScanJet 6300C (Hewlett-Packard, USA).

3.2.4. Análisis de bandas polimórficas

Las bandas de interés se cortaron con un escalpelo y fueron depositadas en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, conteniendo 50 µl de una solución de elución con 0.5 M de acetato de amonio, 10 mM de acetato de magnesio tetra-hidratado, 1 mM de EDTA (pH 8.0) y 0.1% (w/v) de SDS (Maxam y Gilbert, 1977, Sambrook y Russel, 2001), y posteriormente se incubo por 12 horas a 37 °C. El DNA de las bandas disueltas en la solución anterior fue purificado con el High Pure PCR Product Purification Kit (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Suiza), siguiendo el protocolo de manufactura y fue enviado a secuenciar a la empresa MacroGen Inc (Korea). Para el análisis de las secuencias de las bandas se usó el programa Mega5 (Tamura *et al* 2011) y BioEdit 7.1.3.0.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Extracción de DNA de doce fenotipos de achioté

Las plantas fueron escogidas tomando en consideración sus características fenotípicas contrastantes, debido a la asociación observada entre los fenotipos de achioté y la cantidad de bixina que acumulan en el arilo de sus semillas maduras (Rivera *et al.*, 2006). La figura 3.1., muestra el DNA aislado de doce plantas con características morfológicas contrastantes a partir de tejido foliar, el cual no presenta indicios de degradación a causa del proceso de extracción.

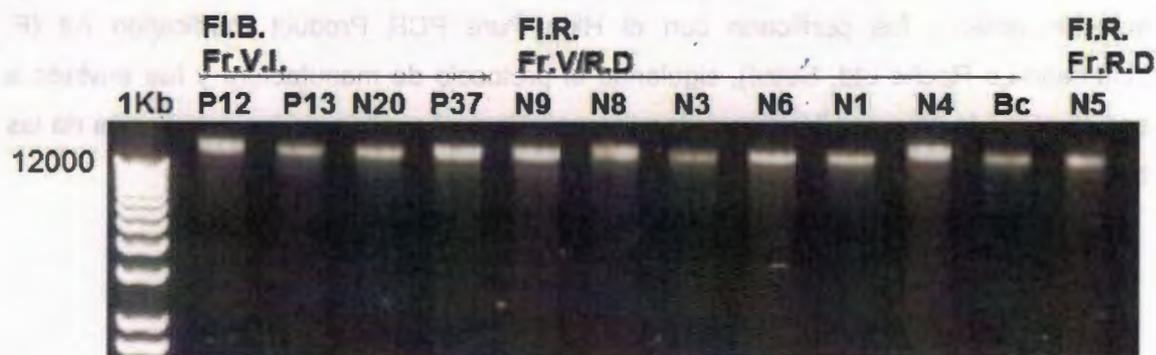


Figura 3.1. Análisis electroforético de las extracciones de DNA genómico de doce plantas de *Bixa orellana* L. El DNA fue aislado con DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Netherlands). En la parte superior se indican debajo de la línea horizontal el nombre de las doce accesiones y en la parte superior de la línea horizontal las características principales de los fenotipos bajo estudio abreviando para flor blanca = F.I.B., flor rosa= F.I.R., fruto verde indehiscente = Fr.V.I., fruto rojo dehiscente = Fr.R.D., fruto dehiscente verde con espinas rojas = Fr.V/R.D.

La cantidad de DNA extraído como se puede apreciar en la cuadro 3.3., es escasa en un rango de 3.2-5.6ng/μl, esto posiblemente a causa que en las extracciones de DNA, utilizamos poca cantidad material vegetal, debido a que en el laboratorio se encontró que los tejidos foliares de achioté contienen altas concentraciones de metabolitos secundarios, los cuales interfieren en las reacciones de PCR (Rodríguez-Ávila *et al.*, 2009, Martín-Rodríguez, 2010). Posterior a la extracción se midió la absorbancia en el espectro de luz ultravioleta (UV), de las muestras como parámetro para conocer la calidad y pureza del DNA aislado (Cuadro 3.3.). La relación del rango de absorbancia a 260/280nm, que es un

valor indicativo de la pureza del DNA, en la mayoría de las muestras, a excepción de las extracciones que pertenecen a las plantas N6 y N1, superan el valor aceptado de 1.8 como DNA puro, indicando la presencia de RNA en las muestras. Mientras que en el caso de las plantas N6 y N1 el parámetro resulta menor al 1.8, que indica posible infiltración de proteínas y fenoles en las extracciones. Mientras que para el ensayo de la absorbancia en el rango 260/230nm los valores alejados de 2.0-2.2 indican la presencia de fenoles y carbohidratos como el EDTA y el TRizol usados durante el proceso de extracción de DNA (Cuadro 3.3.).

Cuadro 3.3. Estimación de la concentración de DNA extraído A_{260} , A_{280} y A_{230} nm de doce plantas de achiote. Utilizando para el ensayo el equipo NanoDrop ND-1000.

Planta	Concentración ng/ μ l	Relación 260/280	Relación 260/230
P12	4.2	1.98	-2.32
P13	4.6	2.02	3.27
N20	5.5	1.96	3.16
P37	6.4	2.08	6.93
N9	5.5	1.89	1.66
N8	4.6	2.04	7.59
N3	3.2	1.87	-6.26
N6	5.3	1.63	2.38
N1	3.9	1.66	-3.26
N4	5.6	2.13	2.5
Bc	3.3	2.24	0.27
N5	4.0	2.2	-12.71

3.3.2. Análisis del gen *pds* con la técnica SSCP en doce fenotipos de achiote

Como se mencionó en materiales y métodos en el grupo de trabajo de la doctora Renata Rivera se aislaron, previo a este proyecto, fragmentos de genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides en achiote, diseñando cebadores a partir de regiones conservadas de un alineamiento de secuencias de genes ortólogos de especies cercanas evolutivamente a *Bixa orellana* L. De esta forma se aisló una secuencia corta de 755 pb utilizando cDNA de hoja inmadura de achiote, que pertenece al gen *pds*, el cual se clonó en el vector de clonación pGEM-T. Esta secuencia fue analizada, con la técnica SSCP para conocer si existen cambios en la cadena nucleotídica asociados con características fenotípicas importantes para el mejoramiento genético de achiote. Para lo cual se diseñaron y analizaron, dos pares de cebadores nombrados como PDS2 y PDS3, para amplificar regiones de aproximadamente 200 pb, sin embargo, se reportó en el estudio previo amplificaciones de alrededor de 1000 pb con ambos pares de cebadores, indicando posible presencia de intrones (Martín-Rodríguez, 2010). No obstante en el estudio realizado por Martín-Rodríguez (2010), decidieron analizar con la técnica SSCP las amplificaciones mayores a 1000 pb, con el objetivo de establecer la metodología de los SSCP por vez primera en achiote. En el análisis con la técnica SSCP, se dilucidaron patrones en los perfiles SSCP asociados con los fenotipos de las plantas de achiote estudiadas, sin embargo como se mencionó anteriormente, debido a que el tamaño de los fragmentos exceden el establecido como óptimo para la técnica (Hayashi, 1991, Orita *et al.*, 1989) es necesario secuenciar las bandas para determinar si existe o no cambio en la secuencia analizada, así como secuenciar la amplificación de DNA genómico de 1000 pb, para ser comparada con el fragmento de 755 pb aislado de DNA complementario.

Por lo tanto en el presente trabajo, con el objetivo de corroborar estos hallazgos y estandarizar la técnica SSCP utilizando nuevas accesiones de achiote, se realizaron reacciones de PCR con los pares de cebadores PDS2 y PDS3 usando como templado el DNA genómico de doce plantas de achiote. Como se aprecia en la figura 3.2., en todas las amplificaciones en las que se usó DNA genómico como templado, de las accesiones bajo estudio, se observa una banda de alrededor de 1000 pb, mientras que en el testigo que consta del fragmento clonado en el vector pGEM-T (aislado de cDNA con anterioridad en el trabajo previo de Martín-Rodríguez, 2010), se obtiene un amplicón de 200 pb, que

concuenda con lo reportado anteriormente para estos pares de cebadores (Martín-Rodríguez, 2010).



Figura 3.2. Resultados de las reacciones de PCR con los pares de cebadores PDS2 y PDS3 con doce plantas de achiote. En los experimentos utilizamos la enzima FastStart Taq DNA (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Suiza) usando como control positivo el fragmento del gen *pds* de DNA complementario clonado en el vector pGEM-T. En el inciso A se muestran las amplificaciones para el par de cebadores PDS2, y en el inciso B los resultados que corresponden al par de cebadores PDS3. Los triángulos indican el amplicón correspondiente al testigo positivo. Los amplicones se analizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Las amplificaciones se analizaron con la técnica SSCP, para la estandarización de la metodología y corroborar los hallazgos presentados en el trabajo anterior del grupo de la doctora Renta Rivera (Martín-Rodríguez, 2010). Como se puede observar en la figura 3.3.A., no se aprecia ningún cambio en la migración de las cadenas sencillas a través del gel de acrilamida no desnaturalizante. Mientras que para el caso con los pares de cebadores PDS3, se observan 3 distintos patrones (corchetes rojos figura 3.3.B), las plantas con flores blancas y fruto verde comparten un mismo perfil de bandeo que consiste de tres bandas, al igual que el testigo que es una repetición de la planta P13 (triángulos negros a,b,c, figura 3.3.B.), mientras que las plantas N9, N8, N6, N3, N1, y N4 presentan un perfil distinto al anterior, caracterizado por 3 bandas adicionales con

respecto al testigo (triángulos blancos d y e, Figura 3.3.B). El último patrón observado en los fenotipos Bc y N5 en sus perfiles comparten las dos bandas adicionales observadas en las plantas N9, N8, N6, N3, N1 y N4 pero presentan la ausencia de las bandas obtenidas en el testigo (Figura 3.3.B).

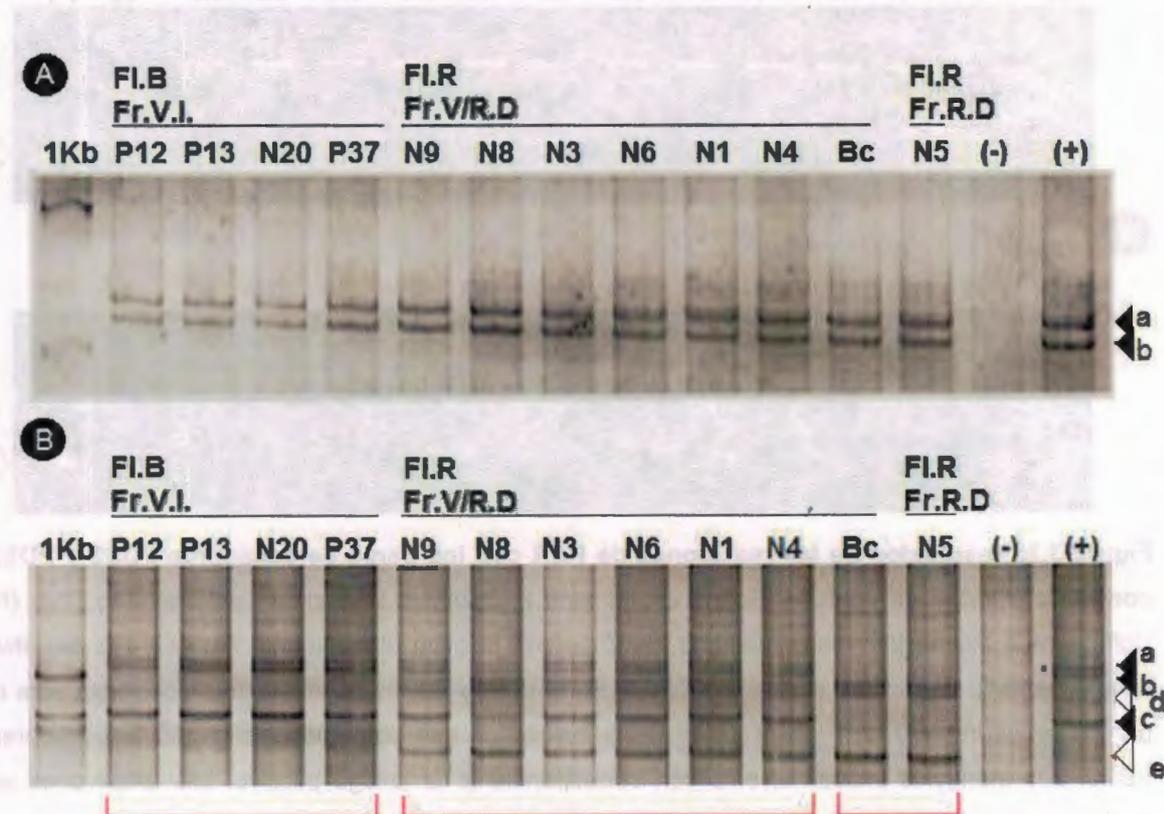


Figura 3.3. Análisis SSCP con el gen *pds* en doce fenotipos de *Bixa orellana* L. El estudio fue llevado a cabo en un gel de acrilamida no desnaturizante usando 0.5x de solución Acrylamide for Mutation Detection (Sigma-Aldrich, USA), teñido con nitrato de plata de acuerdo el protocolo de Bassam y colaboradores (1991). En el inciso A se presenta el perfil de bandeo que corresponde al par de cebadores PDS2. En el inciso B se muestran los resultados del par de cebadores PDS3. Los triángulos negros indican las bandas del testigo que es una réplica de la accesión P13, los triángulos blancos el bandeo adicional. Las abreviaciones corresponden al fenotipo de las plantas con el siguiente significado: flor blanca = Fl.B., flor rosa= Fl.R., fruto verde indehiscente = Fr.V.I., fruto rojo dehiscente = Fr.R.D., fruto dehiscente verde con espinas rojas = Fr.V/R.D. Las condiciones de electroforesis fueron de 200 V, 15 mA y 5 W de potencia por 20 horas a 22 °C, usando 1X de TBE como amortiguador de corrida.

3.3.3. Análisis del gen β -*lcy* con la técnica SSCP en doce fenotipos de achiote

Al igual que con el gen fitoeno desaturasa, anteriormente se aisló en el laboratorio un fragmento de la secuencia del gen licopeno beta ciclasa en achiote alineando secuencias de genes ortólogos. Con esta información se diseñó un par de cebadores que amplifica una región de alrededor de 491 pb nombrado BLYC, que al igual que con los cebadores mencionados anteriormente (PDS2 y PDS3) para el fragmento del gen *pds* sirvieron para establecer la técnica SSCP en achiote (Martín-Rodríguez, 2010). Los resultados de los perfiles SSCP usando este par de cebadores a una temperatura ambiental de 4 grados Celsius, presenta un bandeo inespecífico sin ningún patrón definido (Martín-Rodríguez, 2010). Lo anterior puede deberse a cambios en la temperatura del entorno, lo cual es uno de los factores que alteran la movilidad de las hebras de DNA, cuando migran en un gel de acrilamida no desnaturalizante con la técnica SSCP (Hayashi, 1991).

Usando el par de cebadores BLYC se prosiguió a realizar reacciones de PCR, con la finalidad de amplificar la región de 491 pb en los doce fenotipos a analizar, con el objetivo de estandarizar la metodología (Figura 3.4.A.). Decidimos usar para este experimento una temperatura ambiental de 22 grados Celsius en el ensayo electroforético de la técnica SSCP, con lo cual se logró observar un bandeo bien definido en los perfiles de las doce plantas analizadas, lo cual nos permitió identificar dos bandas adicionales con respecto al testigo (Triángulos blancos d y e, figura 3.3.B). Este perfil lo presento la planta N5, que se caracteriza por poseer un fruto dehiscente de color rojo, no presente en el fenotipo de las demás accesiones. La banda superior "d" en el perfil de la planta N5 (Figura 3.3.B. triangulo blanco d), está presente también en todas las plantas con flor de color rosa, mientras que la banda "e" (Figura 3.3.B.), no está presente en ningún perfil SSCP de las once plantas restantes (Figura 3.3.B).

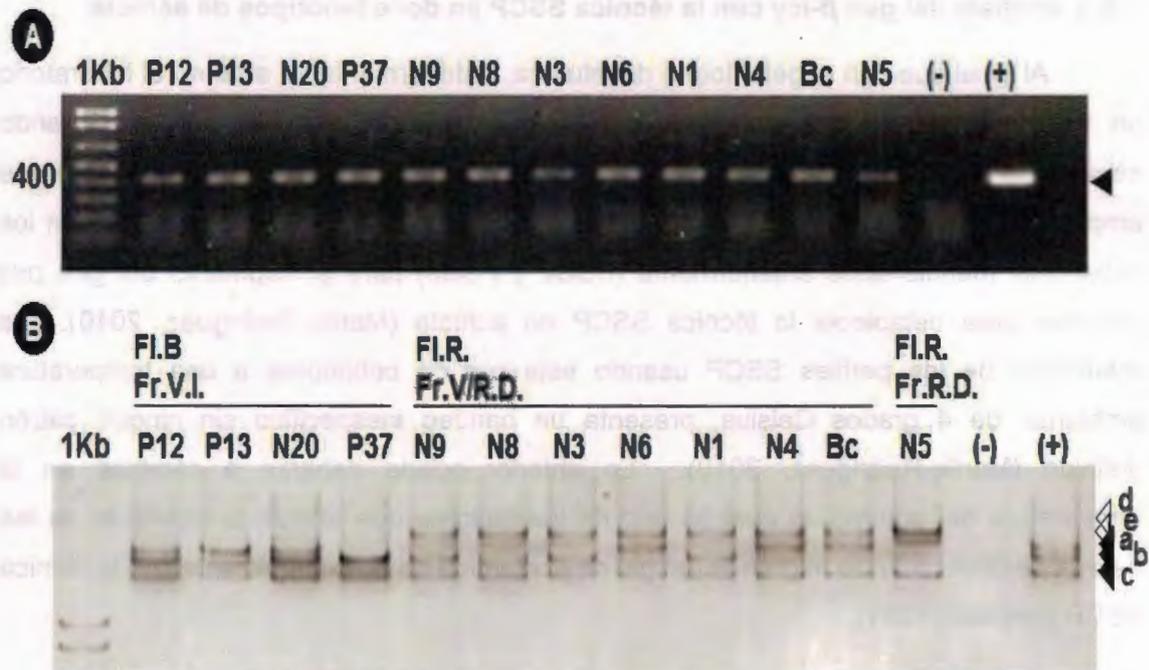


Figura 3.4. Resultados del análisis SSCP con el par de cebadores BLYC. Para la PCR se utilizó la enzima FastStart Taq DNA (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Suiza). En el inciso A se muestran las reacciones de PCR en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en doce plantas de achiote, el triángulo negro indica el amplicón del testigo usando el gen clonado en el vector pGEM-T como templado. En el inciso B se presenta el perfil de bandeo de la técnica SSCP con el par de cebadores BLYC, los triángulos negros "a", "b" y "c" indican el bandeo correspondiente al testigo que es una réplica de la accesión P13, los triángulos blancos "d" y "e" señalan el bandeo no presente en el testigo. Las características de cada accesión se mencionan en la parte superior del gel con la siguiente abreviación: flor blanca = FI.B., flor rosa= FI.R., fruto verde indehiscente = Fr.V.I., fruto rojo dehiscente = Fr.R.D., fruto dehiscente verde con espinas rojas = Fr.V/R.D. Las condiciones de electroforesis fueron de 200 V, 15 mA y 5 W de potencia por 20 horas a 22 °C, usando 1x de TBE.

3.3.3.1. Diseño de pares de cebadores

Como se mencionó anteriormente en el capítulo II de este trabajo se logró aislar una secuencia de 1639 pb del gen *β-lcy*, con la cual se prosiguió a continuar el estudio de la búsqueda de polimorfismos con la técnica SSCP. Por lo tanto el siguiente paso para llevar a cabo esta tarea, es el diseño de cebadores que amplifiquen regiones de alrededor de 200 pb de longitud, puesto que amplificaciones con mayor tamaño aumentan la probabilidad de falsos positivos, debido a que la conformación que adoptan las hebras

simples de DNA durante el procedimiento de la técnica es altamente dependiente de la cadena nucleotídica, por lo tanto entre mayor sea el fragmento de DNA a analizar mayores serán las posibles interacciones azarosas no dependientes de la información de la secuencia (Hayashi, 1991). Por esta razón se diseñaron cebadores tomando lo anterior como principal característica para su elección (Cuadro 3.4).

Cuadro 3.4. Características de los cebadores "B" para amplificar regiones de 200 pares de bases en el gen β -Icy.

Par de cebadores	Secuencia	Posición	Longitud del amplicón	Tm (°C)
B2	<u>Sentido</u> 5' CTGCTTGCTCTTGGAGTCTCAT 3'	<u>Sentido</u> 1	201	66
	<u>antisentido</u> 5' TGTGCGTCTTAAGTAGCGTGTC 3'	<u>Antisentido</u> 201		
B3	<u>Sentido</u> 5' CACGCTACTTAAGACGCACAAC 3'	<u>Sentido</u> 182	240	66
	<u>antisentido</u> 5' GGGTCATAGAGAGGAAGCTCAA 3'	<u>Antisentido</u> 421		
B4	<u>Sentido</u> 5' GCTTCCTCTCTATGACCCATCA 3'	<u>Sentido</u> 404	235	60
	<u>Antisentido</u> 5' GTAAACAACAGCACCCTCCAG 3'	<u>Antisentido</u> 632		

B5	<u>Sentido</u> 5' CTGGAGTGGTGCTGTTGTTTAC 3' <u>Antisentido</u> 5' CCAAGGTAGCCTGAACCGTA 3'	<u>Sentido</u> 617 <u>Antisentido</u> 834	218	66
B6	<u>Sentido</u> 5' ATGGTGTTACGGTTCAGGCTAC 3' <u>antisentido</u> 5' TCTCTCCCTCAGCTCCTTATTG 3'	<u>Sentido</u> 808 <u>Antisentido</u> 995	209	66
B7	<u>Sentido</u> 5' CACCAACAATAAGGAGCTGAGG 3' <u>Antisentido</u> 5' CCCATCGGAATCACACAATG 3'	<u>Sentido</u> 995 <u>Antisentido</u> 1210	222	66
B8	<u>Sentido</u> 5' GCATTGTGTGATTCCGATGG 3' <u>antisentido</u> 5' GAATCCCTCTGTCTCCTCCTTTC 3'	<u>Sentido</u> 1190 <u>Antisentido</u> 1439	250	60
B9	<u>Sentido</u> 5' ATTGTCCAGTGCCTTGGTTC 3' <u>antisentido</u> 5' CCATGCCAATATCGAGGTTC 3'	<u>Sentido</u> 1335 <u>Antisentido</u> 1537	203	66

Los pares de cebadores fueron identificados con el nombre de "B" y enumerados de acuerdo a su posición en la secuencia (Figura 3.5).

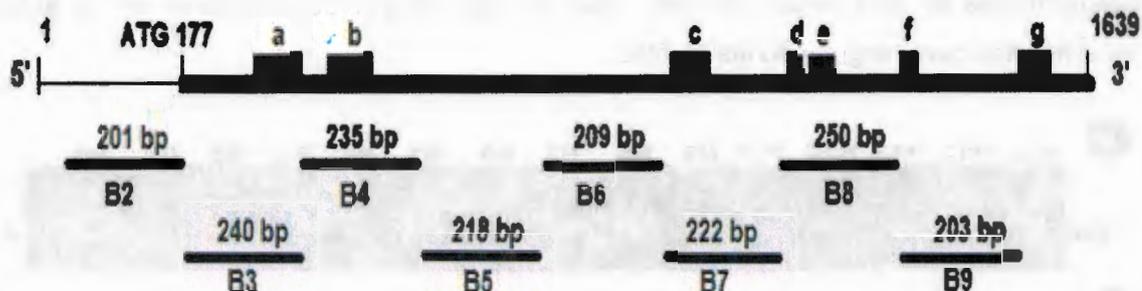


Figura 3.5. Representación esquemática de la posición de los pares de cebadores B, a lo largo de la secuencia del gen β -*lyc*. B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, y B9 corresponden a los nombres de los pares de cebadores diseñados para amplificar regiones cortas del gen β -*lyc* de achote, que codifica a la enzima licopeno beta ciclasa de la ruta de biosíntesis de carotenoides. En la figura se presenta además la esquematización estructural del gen β -*lyc* de achote el rectángulo "a" corresponde a la región conservada entre las ciclasas "b" al motivo de unión a dinucleótido, "c" el motivo I, el "d" el motivo II, el "e" un sitio transmembranal "f" una región con carga, y "g" un segundo motivo transmembranal.

3.3.3.2. Análisis por PCR-SSCP del gen β -*lyc* en doce fenotipos de achote con los cebadores "B".

Como se comentó anteriormente usamos la información del amplicón de 1639 pb para el diseño de pares de cebadores que amplifiquen regiones de 200 pb, debido a que es el tamaño reportado como óptimo para la técnica SSCP (Orita *et al.*, 1989, Hayashi, 1991). Estos pares de cebadores nombrados como B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 Y B9, fueron usados para examinar la secuencia del gen con la técnica SSCP, en busca de cambios nucleotídicos asociados con características importantes para utilizarlos como marcadores moleculares. En la figura 3.6., se presentan los resultados de las amplificaciones con los pares de cebadores B2, B3 y B5. Para las reacciones de PCR se usó como testigo positivo la secuencia del gen de 1.639 Kb clonado en el vector pGEM-T. Como se puede apreciar en la figura 3.6, en el inciso A y B, para el experimento utilizando los pares de cebadores B2 y B3, las reacciones de PCR con DNA genómico para las doce accesiones de achote no presentaron ningún problema. Las amplificaciones con DNA genómico de las plantas P13, N4, Bc y N5 con el par de cebadores B5 (Figura 3.6.C.),

poseen baja intensidad al irradiarlas con luz ultravioleta. Lo cual puede deberse a problemas durante la unión de los cebadores a la cadena de DNA a causa de polimorfismos en esta región del gen. Para el caso del par de cebadores B4 no hubo amplificación para ninguna de las plantas.

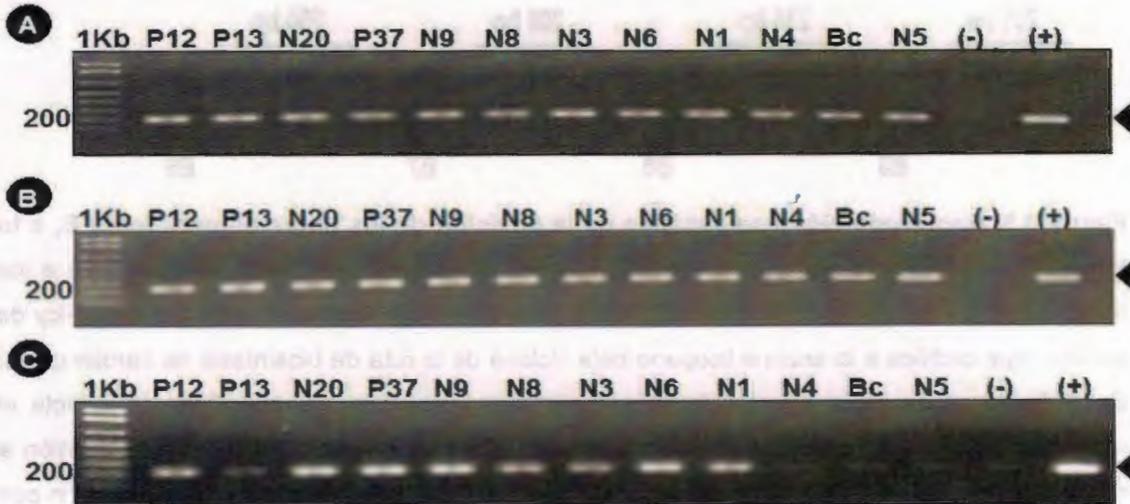


Figura 3.6. Amplificaciones de PCR con los pares de cebadores B2, B3 y B5 con DNA genómico de doce plantas de achiote. Para la PCR usamos la enzima FastStart Taq DNA (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Suiza) y la analizamos en un ensayo electroforético en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Inciso A, análisis electroforético del producto de PCR con el par de cebadores B2 usando como templado doce plantas de achiote. Inciso B, amplificaciones con el par de cebadores B3 y en el inciso C se presentan los resultados de las reacciones de PCR con el par de cebadores B5.

No obstante para los experimentos realizados con las amplificaciones que corresponden al par de cebadores B5, los resultados del análisis SSCP no exhibieron un cambio en los perfiles SSCP (Figura 3.7.C.). Para el experimento con el par de cebadores B2 logramos observar tres patrones de perfiles SSCP bien definidos asociados con las características fenotípicas de las doce plantas de achiote (indicados con corchetes rojos, figura 3.7.A.). En los perfiles SSCP con el par de cebadores B2 se puede identificar una banda adicional con respecto al testigo (Triangulo negro "c" figura 3.7.A.). Esta banda adicional está presente en todas las plantas cuyo fenotipo poseen flor de color rosa; en el caso de la planta N5 su perfil se distingue de las demás plantas con flor rosa, por la ausencia de una banda presente en todas las demás plantas y corresponde a la banda "a"

en la imagen 3.7.A. Las accesiones con flor blanca y fruto verde indehiscente presentan el mismo perfil que el testigo, constituyendo un solo patrón que las distingue de las otras accesiones. Para el ensayo con el par de cebadores B3 se observa un resultado similar al encontrado con el par de cebadores B2, debido a la presencia de tres patrones que se asocian con el fenotipo de flor y fruto de las plantas bajo estudio (corchetes rojos figura 3.7.B.). Para el par de cebadores B3, se identifican 2 bandas adicionales con respecto al testigo, las cuales se encuentran en todas las accesiones con flor blanca y fruto verde con espinas rojas, que además en su perfil SSCP muestran dos bandas que migran a la misma altura que las dos bandas del perfil SSCP del testigo (bandas "c" y "d" figura 3.7.B.). En el experimento con el par de cebadores B2 la accesión N5 posee un perfil diferente de las demás accesiones, mostrando dos bandas en diferente posición en el gel ("c" y "d" figura 3.7.B.) ausente en las plantas P12, P13, N20 Y P37 que tienen el fenotipo de flor blanca y fruto verde (Figura 3.7.B.)

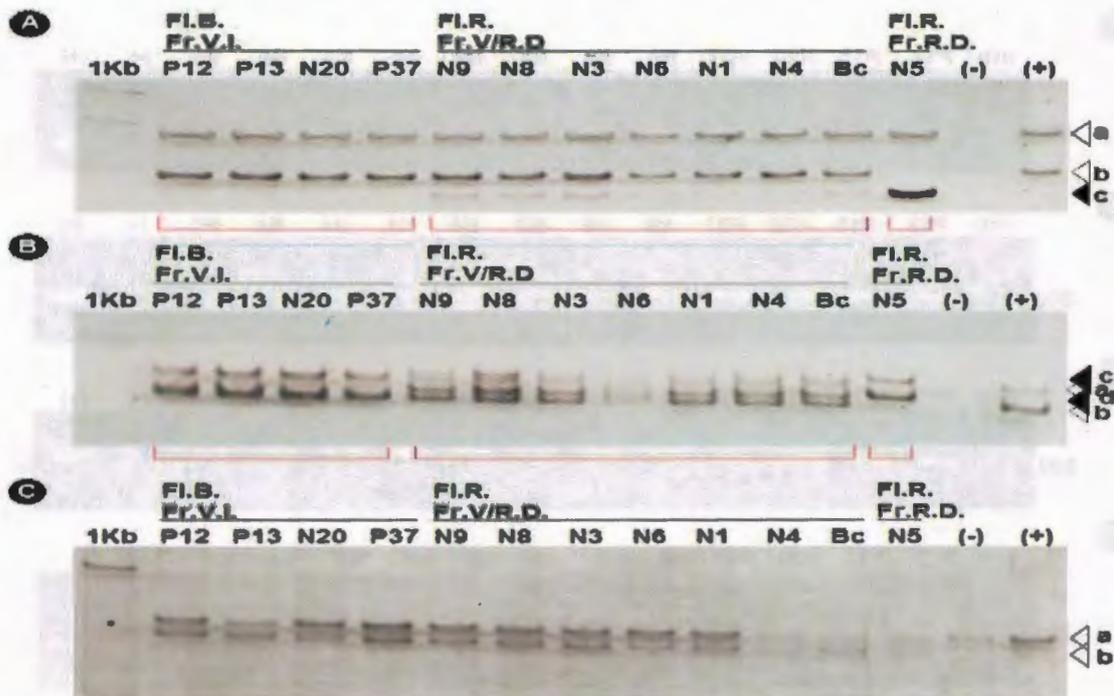


Figura 3.7. Resultados del perfil de bandeos SSCP con los pares de cebadores B2, B3 y B5. Las muestras se analizaron con la técnica SSCP en un gel de acrilamida no desnaturalizante usando 0.5x de solución Acrylamide for Mutation Detection (Sigma-Aldrich, USA), teñido con nitrato de plata de acuerdo el protocolo de Bassam *et al.* (1991).

En el inciso A se presenta el resultado del SSCP para el par de cebadores B2. En el inciso B el análisis para el par de cebadores B3 y en el inciso C el perfil de SSCP para el par de cebadores B5 en doce fenotipos de achiote. Los triángulos blancos "a" y "b" indican la posición de la migración de las bandas con respecto al testigo. Los triángulos negros indican las diferencias con respecto al testigo y los corchetes rojos señalan los patrones encontrados. El fenotipo de cada planta se mencionan en la parte superior del gel con la siguiente abreviación: flor blanca = Fl.B., flor rosa= Fl.R., fruto verde indehisciente = Fr.V.I., fruto rojo dehiscente = Fr.R.D., fruto dehiscente verde con espinas rojas = Fr.V/R.D. Las condiciones de electroforesis fueron de 200 V, 15 mA y 5 W de potencia por 20 horas a 22 °C, usando 1x de TBE como buffer de corrida.

La reacción de PCR con los pares de cebadores B6, B7 B8 y B9 no presentó ningún problema logrando amplificar una región de alrededor de 200 pb en cada reacción de PCR con el DNA genómico de las doce plantas de *Bixa orellana* L (Figura 3.8.).

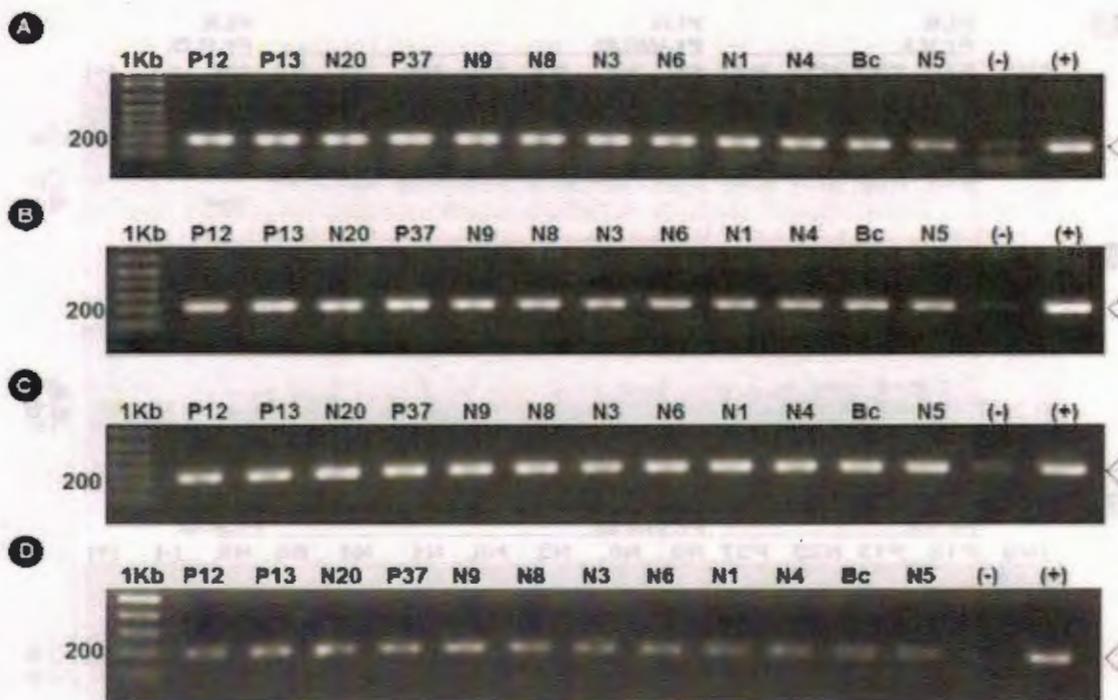


Figura 3.8. Reacciones de PCR con doce accesiones de achiote con los pares de cebadores B6, B7, B8 y B9. El resultado fue analizado en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. En el inciso A, B, C, y D se presentan las amplificaciones con el par de cebadores B6, B7, B8 y B9 respectivamente. El triángulo blanco señala el tamaño del amplicón del testigo de alrededor de 200 pb.

Utilizando el resultado de la reacción de PCR para el par de cebadores B6, se logró dilucidar 3 patrones de bandeo (figura 3.9.A.), que coinciden con los hallazgos encontrados, para los experimentos con los pares de cebadores B2 y B3 en las doce plantas de achiote con fenotipos contrastantes. Las plantas identificadas como P12, P13, N20 y P37 que poseen flores de color blanco y fruto verde espinoso, muestran en el análisis con la técnica SSCP dos bandas que corresponden con las del testigo (Triángulos "a" y "b" Figura 3.9.A.). Además se observa la presencia de una banda adicional con respecto a las dos bandas presentes en el testigo (Triángulo negro "c" Figura 3.9.A.). Esta banda es distintiva pues se encuentra en todos los perfiles SSCP que corresponden a las plantas con flores de color rosa, encontrándose ausente en las plantas con flor blanca (Figura 3.9.A.). La planta identificada como N5 además de presentar el perfil descrito anteriormente para las plantas de flor rosa, en el análisis con la técnica SSCP presenta una segunda banda que corresponde a la banda "b" del testigo (Figura 3.9.A.). Lo anterior coincide con lo encontrado en los experimentos con los pares de cebadores B2 y B3, en donde la planta N5, que representa el fenotipo de plantas de achiote con fruto rojo dehiscente presenta un único perfil SSCP que la distingue de los resultados encontrados para las demás accesiones en el panel de estudio.

Los resultados para los experimentos llevados a cabo con los pares de cebadores B7, B8 y B9 con las doce plantas de achiote analizadas con la técnica SSCP, no presentaron ningún cambio significativo en su patrón de bandeo con respecto al testigo, pues en los tres ensayos las bandas correspondientes a cada accesión son iguales (Figura 3.9. inciso B, C y D). Para el experimento con el par de cebadores B8 se observa una única banda en todos los ensayos con las doce plantas bajo estudio así como en el testigo. Una posible explicación es que las cadenas sencillas de DNA, obtenido con estos pares de cebadores durante el análisis, adoptan una única conformación lo cual sugiere que no existen cambios en las secuencias (Figura 3.9.C.)

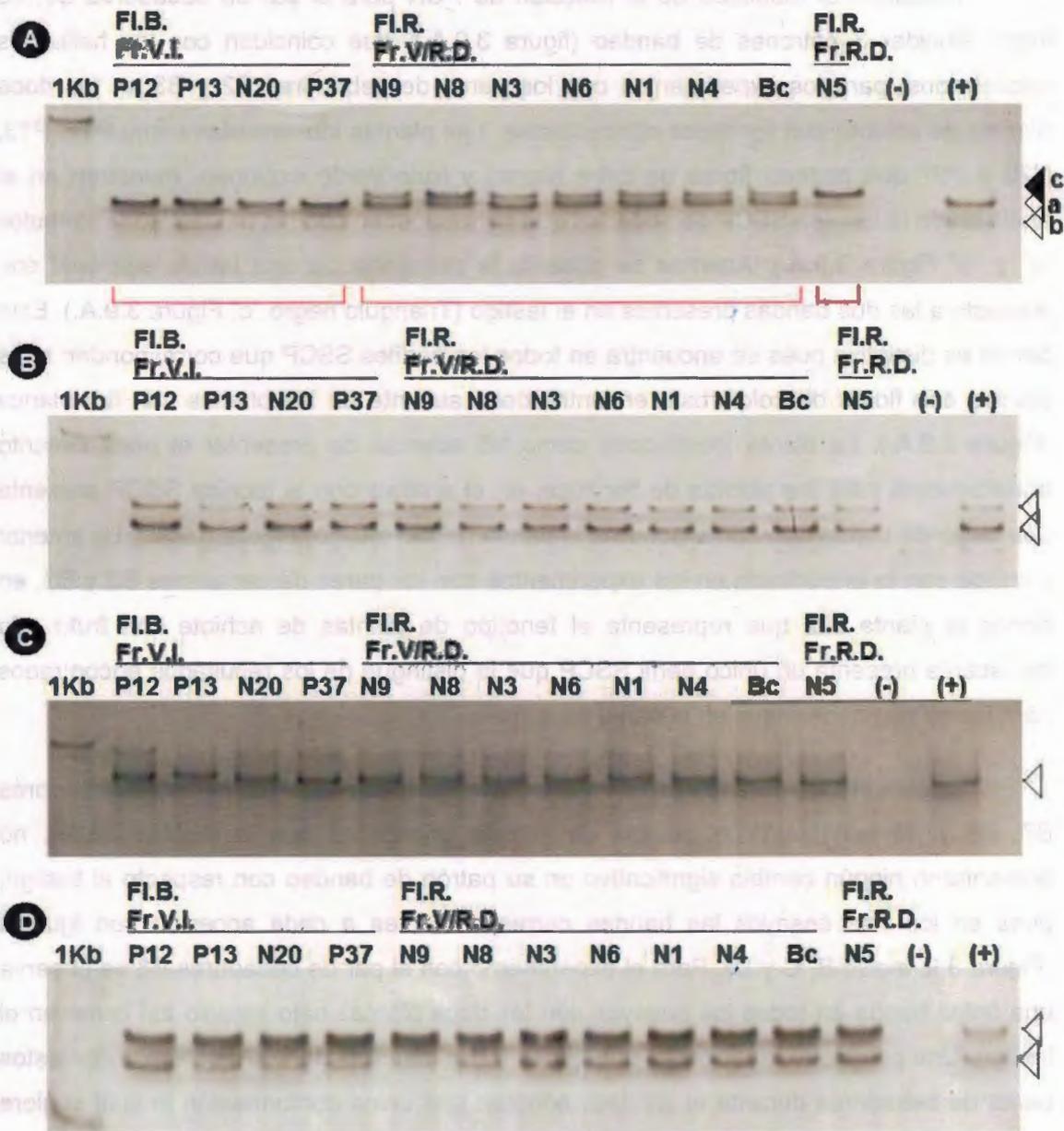


Figura 3.9. Análisis del perfil de bandeo SSCP con los pares de cebadores B6, B7, B8 y B9 contra el gen licopeno beta ciclasa en achiote. El análisis se realizó en geles de acrilamida no desnaturizante en doce plantas de achiote. Inciso A SSCP con el par de cebadores B6, inciso B análisis con el par de cebadores B7, inciso C perfil SSCP con el par de cebadores B8 e inciso D con el par de cebadores B9. Los triángulos blancos indican la posición de las bandas pertenecientes a los testigos. Los triángulos negros en el gel de acrilamida del par de cebadores B6 señalan la posición de bandeo diferencial con respecto al testigo y los corchetes rojos indican

los patrones encontrados. Las características de las accesiones se indican en la parte superior de cada gel con la siguiente abreviación: flor blanca = Fl.B., flor rosa= Fl.R., fruto verde indehisciente = Fr.V.I., fruto rojo dehiscente = Fr.R.D., fruto dehiscente verde con espinas rojas = Fr.V/R.D.. Las condiciones de electroforesis fueron de 200 V, 15 mA y 5 W de potencia por 20 horas a 22 °C, usando 1x de TBE como amortiguador de corrida.

3.3.4. Análisis de la secuenciación de bandas polimórficas

De acuerdo a los resultados obtenidos con la técnica SSCP, existen tres regiones en la secuencia de DNA del gen licopeno beta ciclasa, que presentan cambios importantes entre los 12 genotipos de achiote, estas regiones corresponden a los experimentos llevados a cabo con los pares de cebadores B2, B3 y B6. Con el objetivo de verificar y conocer el tipo de polimorfismo en el DNA de estas accesiones, aislamos las bandas que mostraron cambios significativos asociados a las características fenotípicas del panel de plantas analizadas, los cuales corresponden a los pares de cebadores B2, B3 y B6. Para ello aislamos por duplicado cada patrón presente en los análisis SSCP, identificándolas en el gel de acrilamida como 1a, 1b, 4a y 4b para el primer patrón y correspondientes a los perfiles encontrados para las plantas P12 y P37 respectivamente. Para el segundo esquema asignamos 5a, 5b y 5c para las bandas del perfil de la planta N9 y 11a, 11b y 11c para el perfil de la planta Bc que constituyen el segundo patrón. Por último 12a y 12b que conforman las bandas del perfil SSCP de la planta N5, para este caso en particular no se aisló por duplicado debido a que es un solo perfil el que conforma este patrón (Figura 3.10).

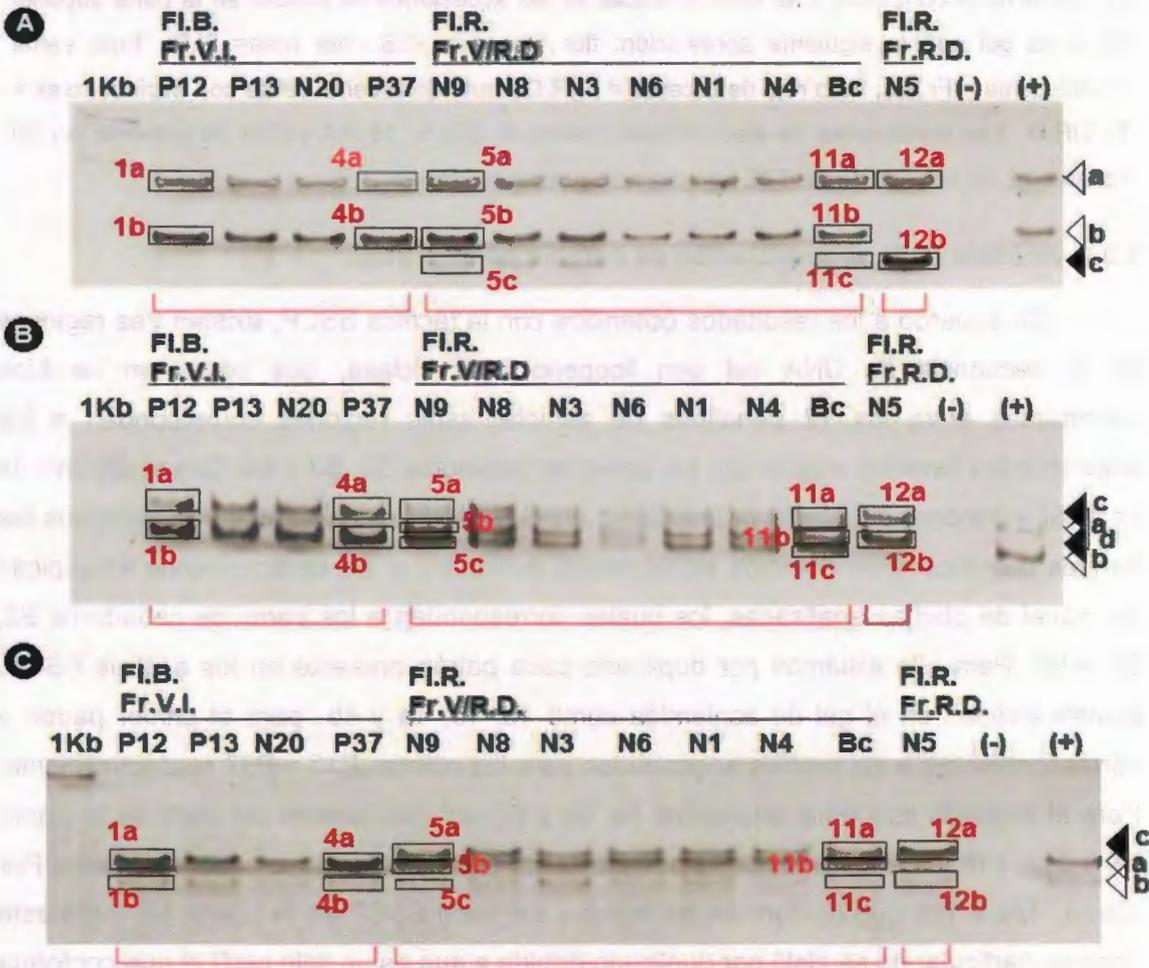


Figura 3.10. Bandas secuenciadas para corroborar la existencia de cambios en la secuencia del gen β -*lyc* en doce genotipos de achiote. En el inciso A las bandas correspondientes al análisis con el par de cebadores B2 en el inciso B para el par de cebadores B3 y por ultimo las bandas para el SSCP con el par de cebadores B6. Las bandas seleccionadas se indican con rectángulos negros y el nombre con el que son identificadas.

Posterior al análisis de la secuenciación de las bandas logramos identificar para el par de cebadores B2 tres cambios de un solo nucleótido en las posiciones 96(G/C), 125(T/G) y 140(A/T) del gen β -*lyc* (Cuadro 3.3.), así mismo con la secuenciación de las bandas del par de cebadores B3 se evidenció la existencia de cinco polimorfismos en las posiciones 320(A/C), 362(G/T), 374(C/A), 379(T/C) y 399(T/C) (Cuadro 3.5.). Estos SNPs diferencian a las plantas P12 y P37 que poseen flores de color blanco y fruto verde indehiscente, de la planta N5 que tiene flor rosa y fruto dehiscente rojo, no obstante las

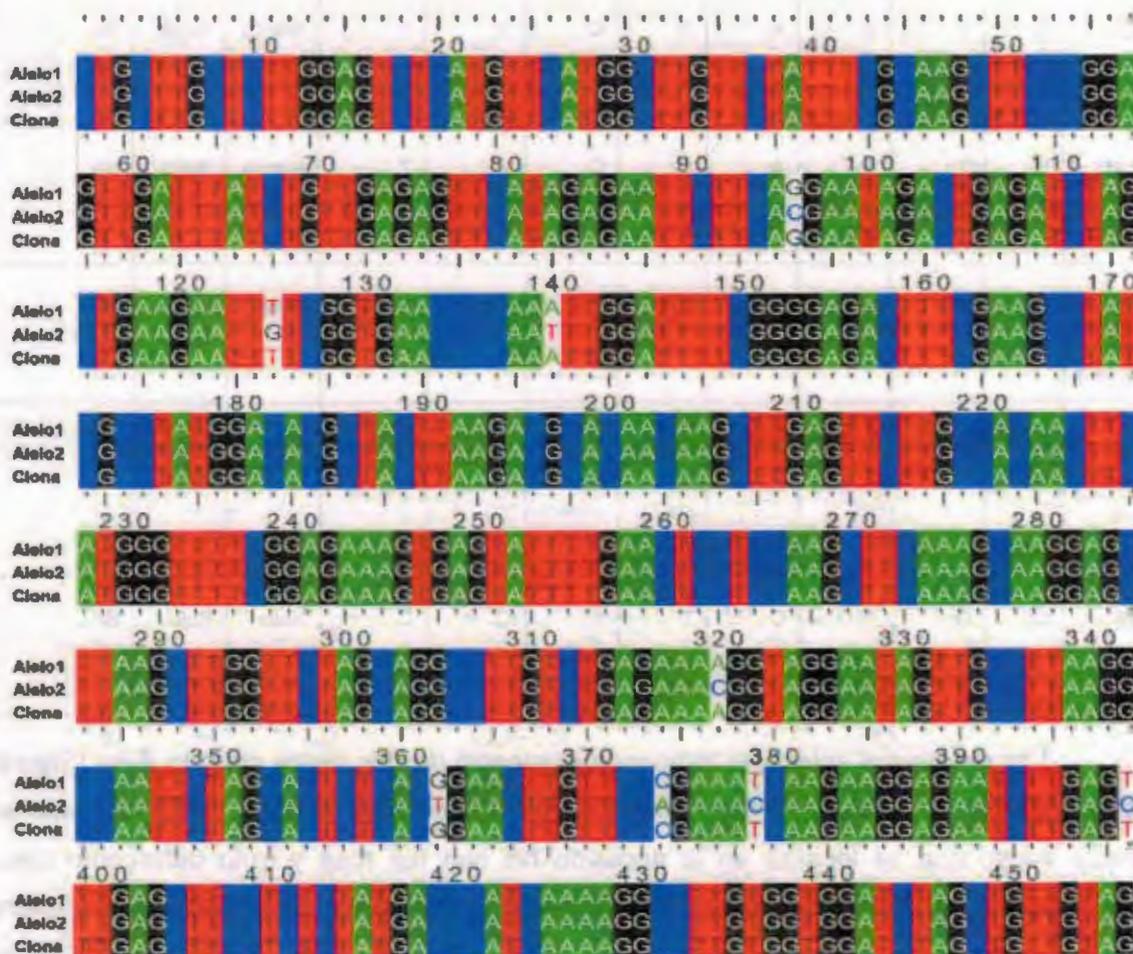
plantas N9 y Bc presentan ambos alelos en los resultados de secuenciación (Cuadro 3.5.). Para el caso de las bandas del análisis del SSCP con el par de cebadores B6 no se encontró ningún cambio.

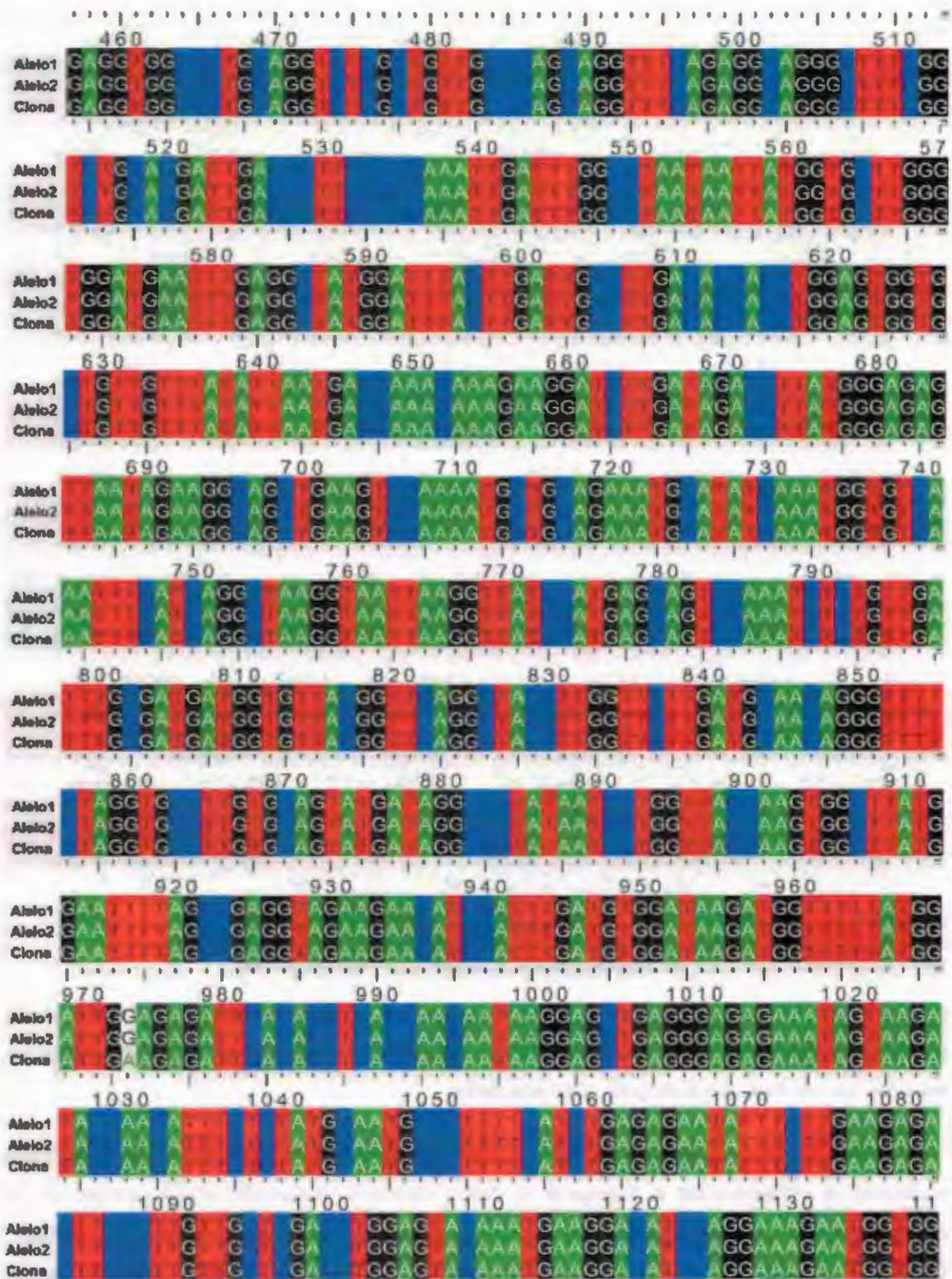
Cuadro 3.5. Resultados de la secuenciación de bandas del análisis SSCP en plantas de achiote. Los SNP encontrados en el gen β -Icy son enumerados de acuerdo a su posición en el gen.

Planta	B2			B3					Fenotipo		
	SNPI (96)	SNPII (125)	SNPIII (140)	SNPIV (320)	SNPV (362)	SNPVI (374)	SNPVII (379)	SNPVIII (399)	Flor	Fruto	Dehiscencia
P12 (1a, 1b)	G	T	A	A	G	C	T	T	Blanca	Verde	No
P37 (4a, 4b)	G	T	A	A	G	C	T	T	Blanca	Verde	No
N9 (5a, 5b, 5c)	G/C	T/G	A/T	A/C	G/T	C/A	T/C	T/C	Rosa	Verde/ Rojo	Si
Bc (11a, 11b, 11c)	G/C	T/G	A/T	A/C	G/T	C/A	T/C	T/C	Rosa	Verde/ Rojo	Si
N5 (12a, 12b)	C	G	T	C	T	A	C	C	Rosa	Rojo	Si

Los resultados anteriores indican la existencia de dos alelos del gen β -Icy (Figura 3.11.), uno que se encuentra presente en las plantas con flor blanca y fruto indehisciente verde y otro que se localiza en la accesión N5 con flor rosa y fruto dehiscente rojo. Mientras que los fenotipos con flor rosa y fruto dehiscente verde con espinas rojas poseen ambos alelos en su genoma. Además como se puede observar en el alineamiento de la figura 3.11., el alelo 1 corresponde a la secuencia de la clona del gen de la planta P13, no

obstante en la posición 974 de la clona existe un cambio de una adenina por una guanina con respecto a los dos alelos. La posición 974 del gen, es abordada en los análisis SSCP con los pares de cebadores B6, los cuales mostraron perfiles similares a los encontrados con los SSCP de los pares de cebadores B2 y B3. Sin embargo como se mencionó anteriormente no se encontraron cambios en la secuencia de las bandas analizadas. No obstante la posición 974, se sitúa en la región donde se asienta el par de cebadores B6 en la cadena nucleotídica, como se puede confirmar en la cuadro 3.2. Por lo que con las evidencias anteriores de que existen cambios en esta posición de la secuencia, deberá analizarse de nuevo esta región, utilizando cebadores que flanqueen esta posición en el gen con la técnica SSCP, para verificar este resultado.





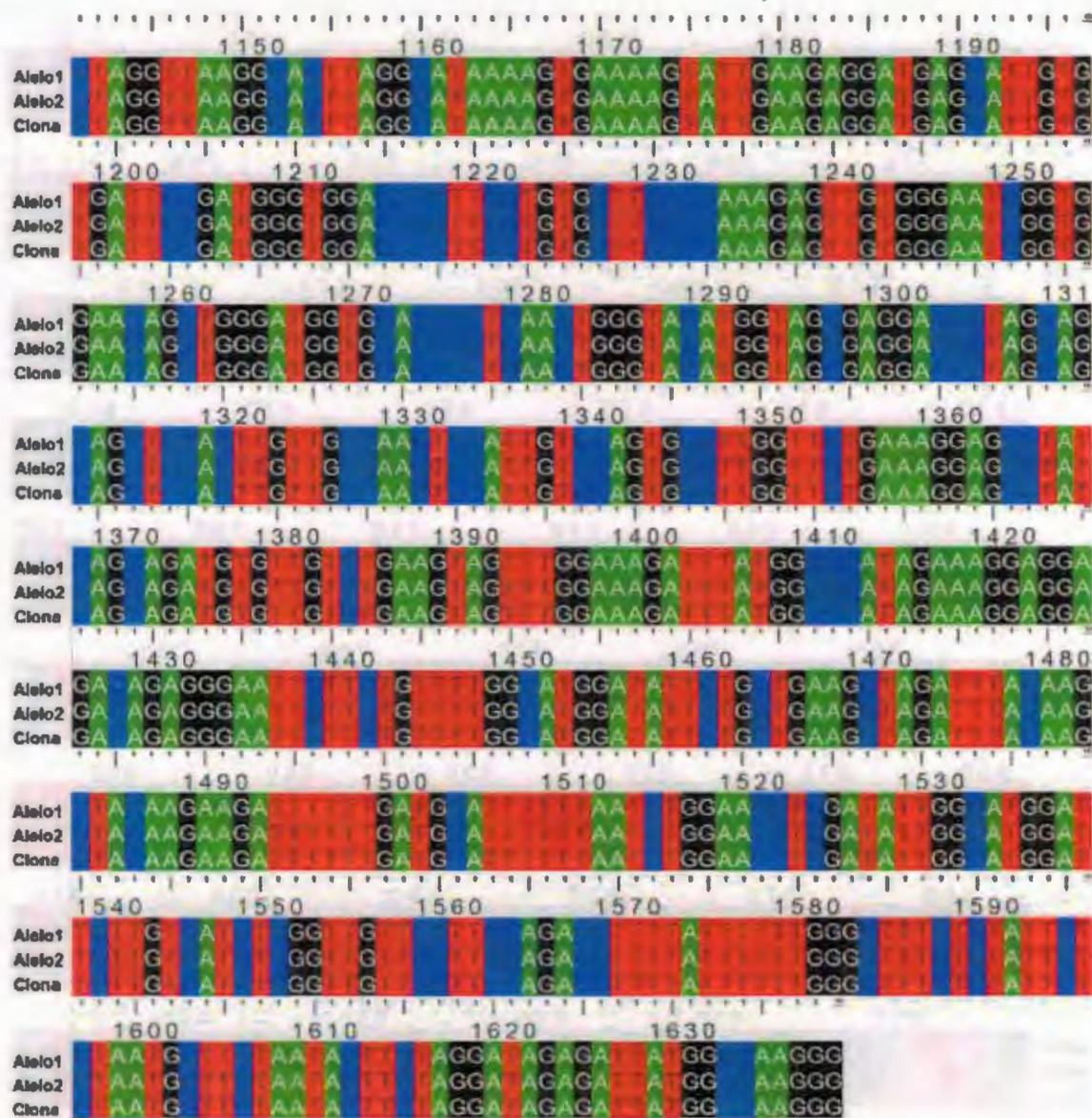


Figura 3.11. Alineamiento de alelos dilucidados con la técnica SSCP y la secuencia de la clonada del gen β -*lcy* de *Bixa orellana* L. La ausencia de color indica los lugares donde se localizan los cambios que distinguen a los dos alelos.

Con la información anterior de la posición de estos polimorfismos en la cadena nucleotídica proseguimos a averiguar si estos cambios ocasionan algún cambio en la información de aminoácidos de la proteína traducida del gen licopeno beta ciclasa. Encontramos que tres de los SNPs (SNPI, SNPII y SNPIII) se localizan poco antes del inicio del ORF de la secuencia, por lo que son cambios silenciosos, no obstante los 5

Analizando los SNPIV, SNPV, SNPVII y SNPVIII, encontramos que para el SNPIV localizado en la posición 320(A/C) de la secuencia ocasiona un cambio de un aminoácido de una lisina (aminoácido con carga positiva, polar), presente en las plantas de flor blanca y fruto indehiscente verde, por una asparagina (aminoácido polar) en la planta N5 que posee fruto rojizo (Figura 3.13.). Para el SNPV encontrado en la posición 362(T/G) no origina ningún cambio en la secuencia de aminoácidos, manteniendo una treonina en las secuencias. Lo mismo ocurre con el SNPVI en la posición 374(C/A), ambos son silenciosos, sin cambiar el aminoácido prolina. Sin embargo para el SNPVII 379(T/C), el cambio de una timina por una citosina en la secuencia nucleotídica resulta en la sustitución de una isoleucina (aminoácido alifático, hidrofóbico) en las plantas P12 y P37 por una treonina (aminoácido neutro) en la planta N5 (Figura 3.13.). Por último el SNPVIII encontrado en la posición 399(T/C) de la secuencia ocasiona una sustitución de una fenilalanina (aromático e hidrofóbico) presente en las plantas con fruto verde, por una leucina (alifático aromático) en la accesión N5 que presenta un fenotipo con fruto rojizo (Figura 3.13.). Las plantas con flores rosas y fruto verde con espinas rojas presentan ambas sustituciones de aminoácidos en los SNPs encontrados (Figura 3.13.).

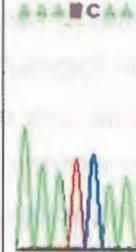
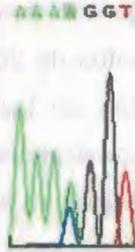
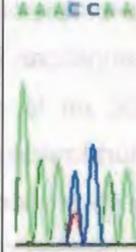
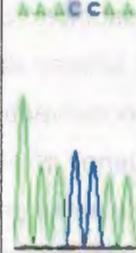
Fenotipo		SNP	SNP	SNP	
		IV	VII	VIII	
		473	532	552	
		(A/C)	(T/C)	(T/C)	
		K	 AAAAGGT	 AAAACAA	 CAGTTTG
		K/N	 AAAAGGT	 AAAACAA	 CAGTTTG
		N	 AAAAGGT	 AAAACAA	 CAGTTTG

Figura 3.13. Sustituciones de aminoácidos originados por los SNP en el ORF del gen que codifica a la enzima licopeno beta ciclasa en fenotipos contrastantes de achiote. Al costado izquierdo de los cromatogramas se muestra abreviado el aminoácido sustituido a causa del cambio puntual en el DNA de los alelos encontrados del gen.

3.4. DISCUSIÓN

La técnica SSCP, desarrollada por Orita y colaboradores (1989) para detectar mutaciones puntuales en el DNA en células humanas, fue también exitosa en la detección de polimorfismos del gen β -*lcy* asociados con las características fenotípicas importantes para el mejoramiento genético de achiote. El análisis con la secuencia de 755 pb del gen *pds*, y del fragmento de 491 pb del gen β -*lcy* sirvieron para estandarizar las condiciones necesarias para el funcionamiento de la técnica SSCP en achiote. Durante los experimentos de estandarización, se observaron diferentes perfiles SSCP en las plantas analizadas, sin embargo el análisis de los polimorfismos mostrados en la figura 3.3 y 3.4, no pudieron ser estudiados a profundidad debido a problemas en la secuenciación de las bandas.

Por otro lado los experimentos con la secuencia del gen β -*lcy* con los pares de cebadores "B" que amplifican fragmentos de 200 pb del gen, encontramos tres regiones que exhiben cambios en la migración de las hebras sencillas de DNA en geles de acrilamida no desnaturizante en las posiciones 1-201 pb, 182-421 pb y 808-995 pb de la secuencia del gen β -*lcy* en doce genotipos de achiote. Estos cambios se confirman con la secuenciación de las bandas polimórficas, logrando dilucidar ocho sustituciones: G/C(96), T/G(125), A/T(140), A/C(320), G/T(362), C/A(374), T/C(379) y T/C(399) de las cuales las tres primeras son transversiones que se encuentran fuera del ORF hacia la región 5', mientras que las restantes cinco sustituciones están dentro del ORF, tres de ellas transversiones y las últimas dos transiciones. Estos cambios se encuentran localizados en una región muy conservada entre las secuencias de aminoácidos traducidas del gen β -*lcy* en plantas (Huguene *et al.*, 1995, Cunningham *et al.*, 1996, Bouvier *et al.*, 1997). No obstante lo notable de estos polimorfismos es que corresponden al fenotipo de las plantas analizadas en este estudio, donde cada uno de estos SNP permite diferenciar de las plantas con fruto verde y flor blanca de la variante N5 que posee fruto rojo con flor rosa. Además un hecho interesante es que todas las plantas con flor rosa y fruto verde con espinas rojas presentan ambos polimorfismos. Las sustituciones que se localizan en el ORF en la posición 362(T/G) así como en la posición 374(C/A) son silenciosas, mientras que los cambios en las posiciones 320(A/C), 379(T/C) y 399(T/C) ocasionan las sustituciones de aminoácidos K/N(48), I/T(68) y F/L(75) respectivamente en la secuencia traducida del gen. Las sustituciones de aminoácidos ocasionadas por las

mutaciones encontradas en los alelos del gen β -*lcy*, no son tan frecuentes y no comparten completamente propiedades fisicoquímicas por lo que podrían ser la causa de algún tipo de alteración en la reacción de ciclación de la enzima debido a que se encuentran en una región conservada entre las ciclasas de plantas (Taylor, 1986, Cunningham *et al.*, 1996, Hugueney *et al.*, 1995, Barnes y Gray, 2003).

Los SNP encontrados indican la presencia de dos alelos en el gen β -*lcy* en *Bixa orellana* L., donde las plantas con flor rosa y fruto verde con espinas rojas poseen los dos tipos de alelos, mientras que los fenotipos con flor blanca y fruto verde poseen solo una forma alterna del gen β -*lcy*, lo mismo para las accesiones de flor rosa y fruto rojo. La existencia de más de un alelo para el gen β -*lcy* asociado con el fenotipo de plantas se ha encontrado también en otras especies. Bang y colaboradores (2007), aislando el gen β -*lcy* en dos variedades de sandía con frutos contrastantes, revelaron la existencia de tres SNP situados en el ORF del gen β -*lcy* que co-segregan con los fenotipos del fruto de sandía analizados. Uno de estos SNP origina un cambio de una fenilalanina en la posición 226 por una valina en la secuencia traducida del gen licopeno beta ciclasa, que se encuentra asociado con el color rojo y amarillo del fruto de las plantas. Ellos proponen que los dos tipos de alelos encontrados para este gen determinan el color del fruto maduro en sandía. Un caso similar se demostró *in vitro* en variedades de papaya que difieren en su contenido y nivel de carotenos en su fruto (Devitt *et al.*, 2009). Devitt y colaboradores (2009) lograron aislar una segunda copia del gen licopeno beta ciclasa en dos variedades de papaya que se caracteriza por su expresión en tejido no fotosintético (Ronen *et al.*, 2000). Las variedades de papaya analizadas por Devitt y colaboradores (2009), difieren en el contenido de carotenos en su fruto, encontrándose que la variedad con fruto amarillo acumula licopeno y beta caroteno, mientras que la variedad con fruto rojo solo resguarda licopeno en su fruto maduro. Analizando la secuencia del gen licopeno beta ciclasa específica de cromoplasto en estas dos variedades de papaya, identifican una inserción de dos timinas en el gen que corresponde a la variedad roja, ocasionando un codón de paro en la secuencia de aminoácidos, que *in vitro* inactiva la enzima permitiendo la acumulación del compuesto licopeno en la variedad roja. Además de las implicaciones que esto significa en la regulación de la síntesis de carotenos, Devitt y colaboradores (2009), proponen estos hallazgos importantes para el mejoramiento genético de papaya,

en la generación de marcadores moleculares. Alelos de genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides asociados con características fenotípicas en plantas se han demostrado además en otros miembros de la familia de las ciclasas. Ha y colaboradores (2007) encuentran en el gen que codifica a la enzima CCS en *Capsicum annuum* (que es capaz de añadir tanto anillos terminales κ a la molécula anteraxantina o violoxantina como anillos β al *trans*-licopeno) la existencia de inserciones que dan lugar a cambios no sinónimos en la secuencia de aminoácidos. Así mismo encuentran deleciones en la secuencia nucleotídica del gen *ccs* que ocasiona un cambio de lectura en el ORF, en grupos de variedades de *Capsicum sp.* que difieren en el nivel y contenido de carotenoides en el fruto maduro, que se propone esta involucrados en la ausencia de la expresión del gen *ccs* en variedades amarillas de *Capsicum sp.* que se asocian con menor cantidad de carotenos acumulados durante la maduración del fruto en estas variedades (Ha *et al.*, 2007). Por otra parte también se ha visto que cambios en la secuencia en genes de la familia de las ciclasas pueden alterar el flujo de síntesis de carotenos en plantas. Harjes y colaboradores (2008), demuestran que mutaciones en el gen licopeno épsilon ciclasa que añade anillos terminales épsilon al *trans*-licopeno, están asociados con la tasa de acumulación de α -caroteno versus β -caroteno y β -criptoxantina en las plantas de maíz analizadas. Los alelos en el gen *ϵ -lcy* permitieron a Harjes y colaboradores (2008) desarrollar marcadores moleculares para la selección de plantas con mayor contenido de beta caroteno en sus semillas.

Los alelos encontrados para el gen licopeno beta ciclasa en achote asociado con el color de la flor y el fruto podrían estar implicados en la regulación del flujo y contenido de carotenoides como se propone en sandía, papaya, chile y maíz, lo cual está vinculado con los cambios en el fenotipo de los frutos de las plantas estudiadas. No obstante, la mayor implicación que este hallazgo significaría en *Bixa orellana* es la utilización de estos alelos en la generación de marcadores moleculares para la selección de plantas con mayor contenido de bixina a edad temprana de la planta; haciéndolo una herramienta muy importante para el mejoramiento genético de achote el cual exhibe su primera floración alrededor de los tres años de edad (Rivera-Madrid *et al.*, 2006, Valdez-Ojeda *et al.*, 2008).

BIBLIOGRAFÍA

- Bang, H., Kim, S., Leskovar, y D., S. King (2007). Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in lycopene β -cyclase (β -*lcy*) gene. *Molecular Breeding*, 20(1), 63-72.
- Barnes, M.R. y I.C. Gray (2003). Amino acid Properties and Consequences of substitutions. In: Betts MJ, Russell RB, eds. *Bioinformatics for Geneticists*. Chichester: Wiley, 289-316.
- Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G., y P. M. Gresshoff (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196(1), 80-83.
- Bodenes, C., Kremer, A., y F. Laigret (1996). Inheritance and molecular variations of PCR-SSCP fragments in pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 93(3), 348-354.
- Bouvier, F., y B. Camara (1997). Molecular analysis of carotenoid cyclase inhibition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 346(1), 53-64.
- Cárdenas, P. D., Gajardo, H. A., Huebert, T., Parkin, I. A., Iniguez-Luy, F. L., y M. L. Federico (2012). Retention of triplicated phytoene synthase (PSY) genes in *Brassica napus* L. and its diploid progenitors during the evolution of the *Brassicaceae*. *Theoretical and Applied Genetics*, 124(7), 1215-1228.
- Cunningham, F. X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K. A., DellaPenna, D., y E. Gantt (1996). Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *The Plant Cell Online*, 8(9), 1613-1626.
- Devitt, L. C., Fanning, K., Dietzgen, R. G., y T. A. Holton (2009). Isolation and functional characterization of a lycopene β -cyclase gene that controls fruit colour of papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 33-39.

-
- Ha SH, Kim JB, Park JS, Lee SW, y KJ. Cho (2007). A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *Journal of Experimental Botany* 58, 3135-3144.
- Harjes CE, Rocheford TR, Bai L, *et al.* (2008). Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science*, 319, 330-333.
- Hayashi, K. (1991). PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *Genome Research*, 1(1), 34-38.
- Huguenev, P., Badiillo, A., Chen, H. C., Klein, A., Hirschberg, J., Camara, B., y M. Kuntz (1995). Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *The Plant Journal*, 8(3), 417-424.
- Martín-Rodríguez M. E. (2010). Uso de Genes Involucrados en la Síntesis de Carotenoides como Marcadores moleculares de Pigmentos en Achiote, Tesis de Maestría en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), 32-73.
- Maxam, A. M., y W. Gilbert (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(2), 560-564.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., y T. Sekiya (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8), 2766-2770.
- Rivera-Madrid, R., Escobedo-Gm, R. M., Balam-Galera, E., Vera-Ku, M., y H. Harries (2006). Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). *Scientia Horticulturae*, 109(2), 165-172.
- Rodríguez-Ávila, N. L., Narváez-Zapata, J. A., Aguilar-Espinosa, M. L., y R. Rivera-Madrid, (2009). Full-length gene enrichment by using an optimized RNA isolation protocol in *Bixa orellana* recalcitrant tissues. *Molecular Biotechnology*, 42(1), 84-90.

-
- Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D., y J. Hirschberg (2000). An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), 11102-11107.
- Sambrook J. F., y D. W. Rusell (2001). *Gel Electrophoresis of DNA and pulsed-field Agarose Gel Electrophoresis, Molecular Cloning: A laboratory manual, Tercera edición*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, vol.1, cap.5, 5.51-5.56.
- Shirasawa, K., Monna, L., Kishitani, S., y T. Nishio (2004). Single nucleotide polymorphisms in randomly selected genes among japonica rice (*Oryza sativa* L.) varieties identified by PCR-RF-SSCP. *DNA Research*, 11(4), 275-283.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., y S. Kumar (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Taylor, W. R. (1986). The classification of amino acid conservation. *Journal of Theoretical Biology*, 119(2), 205-218.
- Valdez-Ojeda, R., Hernández-Stefanoni, J. L., Aguilar-Espinosa, M., Rivera-Madrid, R., Ortiz, R., y C. F. Quiros (2008). Assessing morphological and genetic variation in annatto (*Bixa orellana* L.) by sequence-related amplified polymorphism and cluster analysis. *HortScience*, 43(7), 2013-2017.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

El trabajo previo de Martín-Rodríguez, (2010) realizado en nuestro laboratorio, mostro evidencias de la presencia de posibles cambios (mutaciones) en un fragmento del gen beta-ciclasa de *B. orellana* (previamente aislado en nuestro grupo), (Martín-Rodríguez, 2010). Con el objetivo de conocer si existen cambios en la secuencia de este gen de la ruta de biosíntesis de carotenoides, se utilizó la técnica de SSCP para analizar diferentes morfotipos de *B. orellana*. Para lo anterior es necesario obtener el gen completo que codifica a la enzima licopeno beta ciclasa. Se prosiguió al aislamiento de una secuencia de 1639 pb de ADN complementario, a partir de una base de datos del transcriptoma de achote a partir del alineamiento con la secuencia del fragmento homólogo de 495 pb, arriba mencionado. La secuencia de aminoácidos traducida del gen aislado presenta *in silico* regiones conservadas entre las ciclasas de plantas tales como un posible sitio catalítico, un sitio de unión a cofactor y regiones transmembranales (Hugueney *et al.*, 1995, Cunningham *et al.*, 1996, Bouvier *et al.*, 1997). Esta secuencia además sigue mostrando similitud con el gen β -*lcy* al compararlo con la base de datos del NCBI en plantas como *Citrus sinensis* (AAM21152.1), *Carica papaya* (ABD91578.1), *Arabidopsis thaliana* (AAB53337.1) entre otras especies. Se ha reportado además en cultivos como *C. papaya* y *L. esculentum* la existencia de dos copias del gen β -*lcy* que se diferencia principalmente por su nivel de expresión en diferentes órganos de la planta, no obstante la secuencia del gen que se aisló de la planta de achote se encuentra agrupada entre las ciclasas que se expresan preferencialmente en tejido fotosintético, por lo cual es probable que la secuencia del gen que codifica a la enzima licopeno beta ciclasa aislada de *Bixa orellana* L., pertenece a esta clase de genes ortólogos (Ronen *et al.*, 2000, Devitt *et al.*, 2009,). Lo cual sería de esperarse debido a que el DNA complementario del cual se aisló el gen es un órgano fotosintético.

Al analizar la secuencia del gen β -*lcy* aislado de *Bixa orellana* para la búsqueda de polimorfismos con la técnica SSCP desarrollada por Orita y colaboradores (1989); logramos identificar ocho SNPs a lo largo del gen y confirmadas con la secuenciación de los patrones SSCP. Estos SNPs se encuentran ubicados en las posiciones G/C(96), T/G(195), A/T(140), A/C(320), G/T(362), C/A(374), T/C(379) y T/C(399) nombrados como

SNPI, SNPII, SNPIII, SNPIV, SNPV, SNPVI, SNPVII y SNPVIII respectivamente. Los SNPI, SNPII y SNPIII se localizan en las regiones no traducidas hacia el 5' del gen (5'UTR), mientras que los SNPs V, VI, VII y VIII se localizan en un dominio conservado entre las ciclasas de plantas (Cunningham *et al.*, 1996, Huguene y colaboradores (1995), Bouvier *et al.*, 1997). Huguene y colaboradores (1995) proponen que este dominio que se encuentra ausente entre las ciclasas de bacterias y de algunos genes de la misma familia como la ϵ ciclasa, desempeña un papel importante en la interacción de la enzima LCYB con la membrana del plasto. Por lo que los SNPs VII y VIII que se encuentran en esta región y que ocasionan un cambio de un aminoácido en la secuencia de la enzima, podrían estar afectando la función de la proteína al interferir con la unión a la membrana del plasto y afectando por consiguiente la clase así como el nivel de acumulación de carotenoides y derivados en achote entre ellos la bixina. Por lo que se propone además ser un posible mecanismo de regulación en la ramificación de la ruta en el punto de las reacciones con el compuesto licopeno.

Lo anterior se ha reportado en otras especies con los genes de la familia de las ciclasas en sandía, papaya, chile y maíz en donde alteran el flujo y la tasa de acumulación de carotenos y derivados a causa de polimorfismos en la secuencia de estos genes (Bang *et al.*, 2007, Ha *et al.*, 2007, Harjes *et al.*, 2008, Devitt *et al.*, 2009). Los SNPs identificados en achote en este trabajo, forman dos alelos del gen β -*lcy* en achote. Uno de ellos se localiza en las plantas de *Bixa orellana* L., con flores blancas y fruto indehiscente verde, mientras que el segundo alelo se encuentra en la planta N5 que posee flor rosa y fruto rojo dehiscente. Ambos alelos sin embargo se ubican en las plantas con flores rosa y frutos dehiscentes verdes con espinas rojas. La presencia de los dos alelos encontrados en este trabajo, en las plantas con características intermedias en cuanto al fenotipo del fruto (fruto verde con espinas rojas), podría ser una evidencia de la heterocigosidad para estas plantas (morfortipos N9, N8, N3, N6, N1, N4 y Bc), mientras que la existencia de un solo alelo en los fenotipos completamente contrastantes (fruto verde en comparación con la planta N5 que posee fruto rojo) sugiere homocigosidad para el gen licopeno beta ciclasa en las plantas con el alelo 1 (morfortipos P12, P13, N20 y P37) así como para el alelo 2 (morfortipo N5). Esto es de suma importancia debido a que la ausencia o presencia de estos alelos, podrían estar implicados en la impartición del color del fruto en los morfortipos analizados en achote. Lo anterior se sustenta, en que la

enzima licopeno beta ciclasa reacciona con el licopeno añadiendo anillos beta terminales, para dar lugar al beta caroteno o alfa caroteno, este último dependerá si reacciona en conjunto con la enzima épsilon ciclasa (Cunningham *et al.*, 1996, Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Sin embargo si la actividad de la enzima se ve disminuida, a causa de los SNPs presentes en los alelos que la codifica, podría dar lugar a una acumulación de licopeno en el fruto de los morfotipos analizados, así como también a un cambio en el flujo de la ruta de biosíntesis hacia el alfa caroteno. Sin embargo, de igual forma, existe la posibilidad de que ambos alelos posean una función redundante y no represente una diferencia, ya sea la ausencia o presencia de alguno de los alelos del gen β -*lcy* encontrados en achiote. Por otro lado es importante tener en cuenta, la posibilidad de que los SNPs identificados en el DNA genómico de *Bixa orellana*, podrían producir más de una forma alterna del transcrito, al estar situados en regiones donadoras del proceso del empalme alternativo, pudiendo afectar de igual modo la tasa de acumulación del licopeno y derivados en achiote. Lo anterior ha sido reportado en estudios con el endospermo de trigo, donde una duplicación en la secuencia del gen fitoeno sintasa, origina un nuevo sitio de empalme, que da lugar a 4 diferentes transcritos que junto con un SNP en la secuencia del gen épsilon ciclasa, alteran el contenido de carotenoides en el endospermo del trigo y por consiguiente el fenotipo de las plantas analizadas (Howitt *et al.*, 2009).

Los cambios localizados en la región no traducida hacia el 5' del gen, que corresponden a los polimorfismos G/C(96), T/G(125), y A/T(140). Representan también un importante hallazgo por las implicaciones que pudieran tener en la regulación de los transcritos del gen licopeno beta ciclasa, sobre todo en el proceso de traducción del mRNA en los ribosomas (Wever *et al.*, 2010). Por lo que los tres cambios identificados en los alelos del gen β -*lcy*, podrían modificar la estructura secundaria que adoptan estas regiones y afectar la síntesis de la enzima aumentándola o disminuyéndola.

La identificación de los alelos del gen β -*lcy* representa un importante avance para el mejoramiento genético de achiote debido a su potencial uso como marcadores moleculares, para diferenciar plantas de acuerdo a sus características fenotípicas, estas a su vez pueden estar relacionadas con la capacidad de las variantes de acumular pigmentos en sus semillas maduras a edad temprana en la planta.

En cuanto a la flor de los morfotipos de *Bixa orellana* analizados, existe una correlación con la presencia del segundo alelo con las flores de color rosa, así como la presencia del alelo uno con los morfotipos con flores blancas, por lo tanto existe la posibilidad de que tenga implicaciones en la regulación de los carotenoides presentes en la flor de achiote de una forma similar antes mencionada. Sin embargo en este aspecto, al tener flores blancas y rosas en distintos morfotipos de achiote, es más probable que el gen fitoeno desaturasa que participa en las reacciones de desaturación del fitoeno (carotenoide sin color) para dar lugar al licopeno (carotenoide con color rojo) se encuentre implicado de manera determinante en la impartición del color en las flores de achiote. Puesto que una inactivación o disminución de la enzima PDS, afectaría drásticamente a la síntesis de fitoflueno y ζ -caroteno, ambos precursores para la síntesis de licopeno, y por consiguiente llevaría a una acumulación de fitoeno en las flores de color blanco (Cunningham y Gantt, 1998, Carol *et al.*, 1999, Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). En este aspecto los experimentos llevados a cabo con el cebador PDS3 que amplifica un fragmento de alrededor de 1000 pb (Martín-Rodríguez, 2010) , y que se utilizó para la estandarización de la técnica SSCP en achiote, muestra patrones de bandeo similares a los observados con el análisis del gen licopeno beta ciclasa, en el sentido de que correlacionan con el fenotipo de las plantas analizadas (flor y fruto), no obstante como son amplificaciones mayores a las señaladas por la técnica como óptimas para su sensibilidad (>200 pb) y además no se logró secuenciar las bandas por problemas con la secuenciación, no es posible aseverar si existen cambios en la secuencia analizada del gen fitoeno desaturasa.

BIBLIOGRAFÍA

- Bang, H., Kim, S., Leskovar, D., y S. King (2007). Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in lycopene β -cyclase (LCYB) gene. *Molecular Breeding*, 20(1), 63-72.
- Bouvier, F., y B. Camara (1997). Molecular analysis of carotenoid cyclase inhibition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 346(1), 53-64.
- Carol, P., Stevenson, D., Bisanz, C., Breitenbach, J., Sandmann, G., Mache, R., ... y M. Kuntz (1999). Mutations in the *Arabidopsis* gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *The Plant Cell Online*, 11(1), 57-68.
- Cunningham Jr, F. X., y E. Gantt (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 557-583.
- Cunningham, F. X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K. A., DellaPenna, D., E. Gantt (1996). Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *The Plant Cell Online*, 8(9), 1613-1626.
- Devitt, L. C., Fanning, K., Dietzgen, R. G., y T. A. Holton (2009). Isolation and functional characterization of a lycopene β -cyclase gene that controls fruit colour of papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 33-39
- Ha SH, Kim JB, Park JS, Lee SW, y KJ. Cho (2007). A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *Journal of Experimental Botany* 58, 3135-3144.
- Harjes CE, Rocheford TR, Bai L, *et al.* (2008). Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science*, 319, 330-333.
- Howitt, C. A., Cavanagh, C. R., Bowerman, A. F., Cazzonelli, C., Rampling, L., Mimica, J.

-
- L., y B. J. Pogson (2009). Alternative splicing, activation of cryptic exons and amino acid substitutions in carotenoid biosynthetic genes are associated with lutein accumulation in wheat endosperm. *Functional & Integrative Genomics*, 9(3), 363-376.
- Huguenev, P., Badillo, A., Chen, H. C., Klein, A., Hirschberg, J., Camara, B., y M. Kuntz (1995). Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *The Plant Journal*, 8(3), 417-424.
- Martín-Rodríguez M. E. (2010). Uso de Genes Involucrados en la Síntesis de Carotenoides como Marcadores moleculares de Pigmentos en Achiote, Tesis de Maestría en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), 32-73.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., y T. Sekiya (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8), 2766-2770.
- Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D., y J. Hirschberg (2000). An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), 11102-11107.
- Ruiz-Sola, M. A., y M. Rodríguez-Concepción (2012). Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 10, 2-28.
- Wever, W., McCallum, E. J., Chakravorty, D., Cazzonelli, C. I., y J. R. Botella (2010). The 5' untranslated region of the VR-ACS1 mRNA acts as a strong translational enhancer in plants. *Transgenic Research*, 19(4), 667-674.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1. CONCLUSIONES

La técnica SSCP es una excelente herramienta para la detección de mutaciones en los genes *pds* y *β-lcy* de *B. orellana*.

Las 62 secuencias de los contigs del transcriptoma de hoja, semilla madura e inmadura de *Bixa orellana*, secuenciado con el método de illumina puede ser utilizado para la identificación de genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides.

Existen dos alelos del gen que codifica a la enzima licopeno beta ciclasa en *Bixa orellana* L., que pudiera estar implicada en la regulación de la biosíntesis de carotenoides en achiote.

Los resultados nos indican que contamos con ocho SNPs en las posiciones G/C(96), T/G(195), A/T(140), A/C(320), G/T(362), C/A(374), T/C(379) y T/C(399) que pueden ser usados como marcadores moleculares para diferenciar plantas con flor blanca y fruto indehiscente verde de las plantas con flor rosa y fruto dehiscente rojo de achiote, así como las plantas con flor rosa y fruto dehiscente verde con espinas rojas.

A pesar de que no se logró aislar la secuencia del gen fitoeno desaturasa, el análisis con la técnica SSCP con el cebador PDS3, da indicios de que existen posibles cambios en la secuencia del gen relacionada con los fenotipos de achiote, por lo que es necesario continuar el análisis con este gen en busca de polimorfismos asociados al fenotipo.

4.2. PERSPECTIVAS

El resultado de los diferentes patrones encontrados en el gen β -*lcy* con la técnica SSCP, representa una prueba evidente de la heterozigosidad en las secuencias de genes entre los diferentes fenotipos de plantas de achiote. Por lo que estudios futuros deberán implicar el análisis del genoma de estas plantas, para poder sentar las bases genéticas de los diferentes fenotipos existentes de achiote, así como inferir su relación evolutiva, que servirán como herramientas imprescindibles para su mejoramiento genético.

Con los indicios de que posiblemente existen cambios en la secuencia del gen *pds* relacionados con los fenotipos de achiote, se deberán de diseñar nuevos cebadores para intentar aislar la secuencia del contig 1009, para posteriormente ser analizado con la técnica SSCP y de esta manera dilucidar si existen cambios en la secuencia del gen *pds*. Asimismo es importante realizar futuros estudios bioquímicos, que involucren la purificación de las enzimas correspondientes a estos alelos del gen β -*lcy*, así como también el análisis de las interacciones con los elementos implicados en la reacción de ciclación, además de estudios moleculares en cuanto al nivel de expresión de estos alelos en diferentes tejidos y poder inferir de esta manera su participación en la regulación de la biosíntesis de carotenoides y derivados en achiote.

Es importante investigar si existen formas alternas de los transcritos, como consecuencia de los SNPs localizados en la región codificante del gen β -*lcy*, que pudieran estar implicados en los procesos de empalme alternativo. Con la información de los cambios en la región no traducida hacia el 5' del gen, se deberán plantear experimentos que conlleven a la dilucidación de las posibles consecuencias en la tasa de síntesis de la enzima licopeno beta ciclasa. Además es importante el desarrollo de líneas transgénicas para el estudio *in vivo* de la ruta de biosíntesis de carotenoides en achiote con la finalidad de analizar la función de los alelos del gen β -*lcy* así como otros genes con el objetivo de manipular la ruta de síntesis de estos compuestos y sus derivados como la bixina.

Con la metodología obtenida se podrán seguir explorando otros genes de interés que permitan la obtención de marcadores de interés para el mejoramiento genético del cultivo.