



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE YUCATAN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

LICENCIATURA EN BIOLOGIA

DETECCION DEL GEN DE LA  
3-HIDROXI-3-METILGLUTARIL COENZIMA A  
REDUCTASA (HMGR) EN EL GENOMA DE  
*Bixa orellana* L.

T E S I S

PRESENTADA POR:

*Santy Peraza Echeverría*

EN SU EXAMEN PROFESIONAL EN OPCION AL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

MERIDA, YUCATAN, MEXICO,  
1998.



| CONTENIDO                                                                                               | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Indice                                                                                                  | i      |
| Lista de figuras                                                                                        | iv     |
| Lista de cuadros                                                                                        | v      |
| Resumen                                                                                                 | vi     |
| <br>                                                                                                    |        |
| I. INTRODUCCIÓN.                                                                                        | 1      |
| <br>                                                                                                    |        |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA.                                                                             | 3      |
| 2.1. <i>Bixa orellana</i> .                                                                             | 3      |
| 2.1.1. Sistemática.                                                                                     | 3      |
| 2.1.2. Sinonimias                                                                                       | 4      |
| 2.1.3. Morfología.                                                                                      | 4      |
| 2.1.4. Origen y distribución geográfica.                                                                | 5      |
| 2.1.5. <i>Bixa orellana</i> y sus carotenoides.                                                         | 6      |
| 2.1.6. Usos.                                                                                            | 7      |
| 2.1.7. Producción y mercado.                                                                            | 7      |
| 2.1.8. <i>Bixa orellana</i> como modelo de estudio de la biosíntesis de carotenoides a nivel molecular. | 8      |
| 2.2. 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGR).                                             | 10     |
| 2.2.1. La HMGR cataliza la síntesis de mevalonato en la ruta metabólica de los isoprenoides.            | 10     |
| 2.2.2. La HMGR en animales.                                                                             | 13     |
| 2.2.3. La HMGR en plantas.                                                                              | 13     |
| 2.2.4. Estructura molecular de la HMGR en plantas                                                       | 15     |
| 2.2.4.1. Dominio N-terminal.                                                                            | 15     |
| 2.2.4.2. Dominio membranal.                                                                             | 15     |
| 2.2.4.3. Región de en enlace.                                                                           | 16     |
| 2.2.4.4. Dominio catalítico.                                                                            | 16     |
| 2.2.5. Organización genómica y expresión diferencial de los genes de la HMGR.                           | 17     |
| 2.3. Detección de ácidos nucleicos.                                                                     | 21     |

|                                                                                                                                                                       | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 2.3.1. Métodos de detección.                                                                                                                                          | 21     |
| 2.3.1.1. Southern blot                                                                                                                                                | 21     |
| <b>III. OBJETIVO</b>                                                                                                                                                  | 23     |
| <b>IV. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>                                                                                                                                        | 24     |
| <b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                                                                                                                        | 25     |
| 5.1. Material vegetal                                                                                                                                                 | 25     |
| 5.1.1. Asepsia de las semillas.                                                                                                                                       | 25     |
| 5.1.2. Cultivo <i>in vitro</i> de las plántulas.                                                                                                                      | 25     |
| 5.2. Southern blot.                                                                                                                                                   | 26     |
| 5.2.1. Aislamiento de ADN genómico.                                                                                                                                   | 26     |
| 5.2.2. Cuantificación de ADN genómico.                                                                                                                                | 27     |
| 5.2.3. Digestión del ADN genómico con enzimas de restricción.                                                                                                         | 28     |
| 5.2.4. Electroforesis en gel de agarosa.                                                                                                                              | 29     |
| 5.2.5. Tratamiento del gel de agarosa.                                                                                                                                | 30     |
| 5.2.6. Transferencia.                                                                                                                                                 | 31     |
| 5.2.7. Fijación del ADN a una membrana.                                                                                                                               | 32     |
| 5.2.8. Preparación de la sonda.                                                                                                                                       | 32     |
| 5.2.8.1. Vector de clonación.                                                                                                                                         | 32     |
| 5.2.8.2. Preparación de células competentes.                                                                                                                          | 34     |
| 5.2.8.3. Transformación.                                                                                                                                              | 35     |
| 5.2.8.4. Aislamiento del plásmido.                                                                                                                                    | 36     |
| 5.2.8.5. Digestión del plásmido y purificación de los fragmentos correspondientes al ADNc de la HMGR de <i>Catharanthus roseus</i> y de <i>Arabidopsis thaliana</i> . | 37     |
| 5.2.8.6. Marcaje de los fragmentos correspondientes al ADNc de la HMGR de <i>C. roseus</i> y de <i>A. thaliana</i> .                                                  | 38     |
| 5.2.9. Hibridación.                                                                                                                                                   | 40     |
| 5.2.10. Lavado de las membranas.                                                                                                                                      | 41     |
| 5.2.11. Autorradiografía.                                                                                                                                             | 41     |

|                                                                                                                                   | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 5.2.12. Revelado del film.                                                                                                        | 41     |
| <b>VI. RESULTADOS</b>                                                                                                             | 42     |
| 6.1. Aislamiento del ADN genómico de <i>B. orellana</i>                                                                           | 42     |
| 6.2. Obtención de los perfiles de digestión del ADN genómico                                                                      | 42     |
| 6.3. Obtención de la sonda.                                                                                                       | 44     |
| 6.3.1. Obtención y digestión del plásmido que contiene al ADNc de la HMGR <i>C. roseus</i> y de <i>A. thaliana</i> .              | 44     |
| 6.3.2. Purificación y marcaje de los fragmentos correspondientes al ADNc de la HMGR de <i>C. roseus</i> y de <i>A. thaliana</i> . | 44     |
| 6.4. Hibridación.                                                                                                                 | 47     |
| 6.4.1. Hibridación a alta astringencia.                                                                                           | 47     |
| 6.4.2. Hibridación a baja astringencia.                                                                                           | 47     |
| <b>VII. DISCUSIÓN</b>                                                                                                             | 51     |
| 7.1. Aislamiento del ADN genómico de <i>B. orellana</i> .                                                                         | 51     |
| 7.2. Obtención de los perfiles de digestión del ADN genómico.                                                                     | 51     |
| 7.3. Obtención de la sonda.                                                                                                       | 52     |
| 7.4. Hibridación.                                                                                                                 | 53     |
| 7.4.1. Hibridación a alta astringencia.                                                                                           | 53     |
| 7.4.2. Hibridación a baja astringencia.                                                                                           | 53     |
| <b>VIII. CONCLUSIÓN</b>                                                                                                           | 56     |
| <b>IX. PERSPECTIVAS</b>                                                                                                           | 57     |
| <b>X. LITERATURA CITADA</b>                                                                                                       | 58     |

## RESUMEN

---

*Bixa orellana* mejor conocida como el achiote o anato es una planta tropical cuya característica notable es la presencia de un pigmento rojo (bixina) que representa más del 80 % de los carotenos totales en la semilla de esta planta. Estos compuestos son producidos en la ruta metabólica de los isoprenoides donde la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGR) cataliza la síntesis de mevalonato, precursor de la gran variedad de isoprenoides. Esta enzima ha recibido gran interés debido a su probable importancia en la regulación de la biosíntesis de isoprenoides muchos de los cuales tienen importancia económica. Con la finalidad de iniciar el estudio de los genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides en *B. orellana*, se detectó la presencia del gen de la HMGR en el genoma de esta planta para lo cual se realizó un análisis Southern blot empleando dos sondas heterólogas. Los resultados demuestran que con la técnica de Doyle y Doyle (1990) se logró obtener ADN genómico que cumplió con los criterios de calidad e integridad, lográndose obtener hasta 80 µg de ADN por gramo de tejido fresco de las hojas de la plántula crecidas en condiciones *in vitro*, siendo las enzimas de restricción EcoR I, EcoR V y Hind III, las que generaron el mejor perfil de digestión en el genoma de esta planta. Por lo que respecta a la hibridación, la condición a baja astringencia (30 % de formamida, 5X SCC y 0.5 % de SDS a 42 °C) fue la que permitió detectar señales de hibridación lográndose obtener hasta 2 señales con la sonda de la HMGR de *Catharantus roseus* y hasta 3 señales con la sonda de *Arabidopsis thaliana*. Por lo tanto se concluye que el gen de la HMGR se encuentra presente en *B. orellana* y se estima que son entre 2 y 3 los genes de la HMGR que se encuentran en el genoma de esta planta.