

INDICE

Abreviaturas	1
Resumen	2
Abstract	3
Introducción	7
Capítulo 1. Antecedentes	
1. Modelo de estudio, <i>Bixa orellana</i> L.	7
Características de <i>B. orellana</i> L.	7
Clasificación	7
Descripción de la planta	7
Variedades cultivadas	7
2. Isoprenoides	8
Características generales de los isoprenoides	8
Rutas biosintéticas para la formación del IPP en plantas	8
Compartimentación del IPP en las plantas superiores	10
Cooperación entre las dos rutas productoras de IPP en las plantas superiores	11
3. Biosíntesis de carotenoides	12
Carotenoides	12
Desaturaciones y ciclizaciones de los carotenoides	12
Apocarotenoides	13
Carotenoides en <i>B. orellana</i> L.	14
4. Enzimas de estudio	15
Generalidades de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa	16
HMGR en plantas	16
Estructura de la HMGR de plantas	17
Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa	19
Fitoeno sintasa	19
Hipótesis	22
Objetivos	22
Capítulo 2. Métodos	31
1. Obtención del material vegetal	31
Planta adulta	31
Obtención de las plántulas	31
Obtención de los callos	31
2. Aislamiento del ADN genómico	32
3. Aislamiento de ARN total	32
4. Obtención de las sondas homólogas de los genes del <i>hmg</i> , <i>psy</i> y <i>DXS</i>	33
Selección y diseño de las secuencias de oligonucleótidos	33
Amplificación por PCR de los genes de interés	34
Clonación de los productos de PCR	34
Análisis de los insertos de interés	36
5. Estudios de expresión	37
Análisis de los mensajeros que codifican para la HMGR por dot blot	37
Análisis de los mensajeros <i>hmg</i> y <i>psy</i> por northern blot	37
Ensaya de protección de ARN contra ribonucleasas para el gen <i>hmg</i>	38
6. Análisis de pigmentos	39
Purificación y cuantificación de carotenos y bixina	39
Análisis de HPLC de los pigmentos en los cultivos <i>in vitro</i>	39
7. Análisis de la actividad enzimática	39
8. Determinación del número de copias del gen <i>hmg</i>	40
Capítulo 3. Resultados	43
1. Establecimiento del material vegetal	43
2. Extracción de ARN total	43
3. Clonación de las secuencias parciales de los <i>hmg</i> , <i>psy</i> y <i>DXS</i>	46
Aislamiento y clonación de la secuencia parcial del <i>hmg</i>	46
Aislamiento de la secuencia parcial del gen <i>psy</i>	46
Clonación de productos de PCR amplificados con oligonucleótidos específicos para el gen	49

<i>DXS</i>	52
4. Evaluación de la expresión de mensajeros en diferentes tejidos de <i>B. orellana</i>	53
Análisis de expresión de los mensajeros que codifican para la HMGR usando la técnica de dot blot	53
Análisis de expresión de los mensajeros del <i>hmg</i> por northern blot	54
Análisis de expresión de los mensajeros del <i>hmg</i> por RPA	55
Análisis de expresión de los mensajeros del <i>psy</i> por northern blot	55
5. Evaluación de la acumulación de pigmentos en <i>B. orellana</i> L.	57
Análisis de la cantidad de carotenoides en los tejidos seleccionados de <i>B. orellana</i> L..	57
Cuantificación de carotenos totales y bixina en todos los tejidos analizados de <i>B. orellana</i> L.	58
Desarrollo del método de HPLC para separar los carotenos totales en los cultivos de callos de <i>B. orellana</i> L.	59
6. Análisis de la actividad enzimática de la HMGR	60
7. Análisis de southern blot del gen <i>hmg</i>	61
Capítulo 4. Discusión y conclusiones generales	63
Discusión	63
1. <i>Bixa orellana</i> como un modelo para el estudio de la ruta biosintética de los carotenoides	63
2. Extracción del ARN total	63
3. Clonación de las secuencias parciales de los genes de interés	64
Secuencia parcial del <i>hmg</i>	64
Secuencia parcial del <i>psy</i>	65
Caso del pseudogen para el <i>psy</i>	65
Secuencias clonadas con los oligonucleótidos específicos para el <i>DXS</i>	66
4. Análisis de expresión	66
Expresión del <i>hmg</i> durante el desarrollo de la flor, el fruto y formación de semillas en <i>B. orellana</i>	66
Posible regulación transcripcional del <i>hmg</i> en <i>B. orellana</i> L.	67
La HMGR de <i>Bixa orellana</i> es codificada por una familia génica	67
Expresión del <i>psy</i> durante el desarrollo del fruto y formación de semillas en <i>B. orellana</i> L.	68
5. Acumulación de carotenoides en <i>B. orellana</i> L.	69
Análisis de carotenoides y bixina durante el desarrollo de la flor, el fruto, semillas y cultivos <i>in vitro</i> de <i>B. orellana</i> L.	69
Análisis del perfil de HPLC obtenido para los cultivos <i>in vitro</i> de <i>B. orellana</i> L.	69
Conclusiones generales	71
Capítulo 5. Perspectivas	75
Introducción	75
Función de la HMGR en <i>B. orellana</i> L.	75
Regulación de la PSY durante la acumulación de bixina	75
Clonación de la secuencia parcial del gen <i>DXS</i>	75
Análisis de la síntesis de bixina	76