

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

CLONACIÓN DEL ADNc QUE CODIFICA PARA LA ENZIMA ANTOCIANIDIN

SINTASA (ANS) DE MANGO (*Mangifera indica* L)



TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
CON OPCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

1942

LUCIA TERESA ANGULO SANCHEZ

# Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos  
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## **FORMATO DE APROBACIÓN**

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Lucia Teresa Angulo Sanchez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con opción en Biotecnología.

---

Dra. María Auxiliadora Islas Osuna  
Director de Tesis

---

Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta  
Sinodal Secretario

---

Dra. Gloria Irma Ayala Astorga  
Sinodal

---

Dra. Carmen Arminda Contreras Vergara  
Sinodal

## DEDICATORIA

*A mis padres: María Teresa y Oscar Ernesto*

*A mis hermanos: Jesús Enrique y Andrea,*

*Héctor Alberto*

*Gracias por su amor, apoyo y por no dejarme desistir,*

*Y lograr esta meta.*

*Los quiero mucho =)*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, por ser la institución responsable de mi formación académica y profesional.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) y a la Coordinación de Programas Académicos, especialmente al programa de Iniciación a la Investigación por el apoyo brindado.

Al Departamento de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, por brindarme el apoyo y los medios para realizar este trabajo de investigación en sus instalaciones.

A la Dra. María Auxiliadora Islas Osuna, por aceptarme como su alumna y parte de su equipo de trabajo, por apoyarme y confiar en mí para la realización de este trabajo. Además por su apoyo fuera de este trabajo y por su confianza en mí. Gracias.

Al los miembros de mi comité de tesis por ayudarme en la realización del trabajo. Dra Guadalupe Burboa Zazueta, por su tiempo y cooperación. Dra. Gloria Irma Ayala Astorga, por estar ahí siempre que la necesite, por echarme porras siempre, por sus consejos y por su amistad. Dra. Carmen Arminda Contreras Vergara, por auxiliarme en todo momento y ayudarme y estar al pendiente siempre en el laboratorio, por su amistad. En general, gracias por apoyarme, orientarme, ser paciente conmigo y poder lograr esta meta.

Al Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas, por recibirme y ayudarme a desarrollar este trabajo. A todos aquellos que estuvieron y están en el laboratorio: Mitzuko, Magda, Mario, Dulce, por su compañía y amistad.

Al Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores, por la colaboración y apoyo en la realización del modelo estructural de la enzima, gracias.

A Biol. Eduardo Hernández por su colaboración en la realización del dendograma, así como su amistad y alegrías dadas. Gracias Edi.

A la unidad INIFAP, Navojoa, Sonora, especialmente a M.C. Ernesto Sánchez Sánchez, por su apoyo y disponibilidad en la toma de muestras de mango.

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal, especialmente a la M.C Marisol Ochoa, M.C. Emmanuel Aispuro y Q.B. Francisco Soto, gracias por su apoyo técnico que me fue muy útil y la ayuda brindada en todo momento.

Al M.C. A. Javier Ojeda por su apoyo técnico, además de su disponibilidad y por escuchar mis ideas y locuras. Al M.C. Alberto Sánchez por su apoyo técnico, disponibilidad y apoyo.

A mis maestros de la carrera, por su conocimiento brindado y aclarar todas mis dudas. Gracias.

A mis compañeros del Z13, su apoyo y amistad en todo.

A mis padres: María Teresa y Oscar Ernesto, por ser los pilares de mi vida, por no dejarme caer y creer siempre en mí. Gracias por enseñarme que hay que seguir lo que uno se propone, y les agradezco que siempre estén ahí. Gracias por su amor, por todo. Los quiero muchísimo.

A mis hermanos: en especial a Jesús Enrique y Andrea, por creer en mí, por ser parte fundamental en mi vida, por su apoyo, amor y paciencia. Los quiero muchísimo.

A Héctor Alberto, por tu amor, comprensión, paciencia y por estar a mi lado siempre apoyándome, tanto académicamente como en lo personal. Gracias por ser parte de mi vida, te quiero demasiado.

A mis amigos: Damariz, Melinda, Karina, Irene, María José, Lulu, Gert, Gabriel, Emmanuel y Fox, por su amistad, por estar ahí echándome porras, aguantando mis locuras y por todos los buenos momentos. Gracias.

A Marina, quien está ahí siempre que la necesito. Eres como mi hermana, eres mi cuata. Gracias por tu amistad, por aguantarme, te quiero mucho.

A todos los que fueron parte de este trabajo, aquellos que me escucharon en todo momento. Gracias por ser parte de este logro.

A Dios.

## CONTENIDO

<b>LISTA DE TABLAS</b>	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ix
<b>RESUMEN</b>	x
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	3
<b>II.1. <i>Mangifera indica</i> L</b>	3
II.1.1. Origen del mango	3
II.1.2. Descripción de la Planta de Mango ( <i>Mangifera indica</i> )	4
<b>II.2. Metabolismo de las Plantas</b>	7
II.2.1 Metabolismo secundario	7
II.2.2 Biosíntesis en el metabolismo secundario	8
<b>II.3.Fenilpropanoides</b>	10
II.3.1. Biosíntesis de los flavonoides	10
II.3.2. Derivados del p-coumaroil-coA	11
<b>II.4.Antocianinas</b>	12
II.4.1. Biosíntesis de las antocianinas	13
II.4.2. Importancia de las antocianinas para el entorno	14
<b>II.5.Antocianidin Sintasa</b>	15
II. 5.1. Características de antocanidin sintasa	15
II.5.2. Secuencia nucleotídicas que codifican para antocianidin sintasa	16
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	18
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	19
<b>V.OBJETIVOS</b>	20
<b>V.1. Objetivo General</b>	20
<b>V.2. Objetivos Específicos</b>	20
<b>VI. METODOLOGÍA</b>	21
<b>VI.1. Extracción de ARN total</b>	21
<b>VI.2. Purificación y Análisis de ARN Total</b>	21
<b>VI.3. Síntesis de ADNc</b>	22
<b>VI.4. Diseño de Iniciadores</b>	23
<b>VI.5. Amplificación de Fragmento de Antocianidin Sintasa por PCR</b>	23

<b>VI.6. Clonación</b>	24
<b>VI.7. Secuenciación y Análisis de Secuencias</b>	26
<b>VI.8. Modelación de Estructura de Antocianidin Sintasa</b>	26
<b>VI.9. Dendograma de Secuencias de Antocianidin Sintasa</b>	27
<b>VII. RESULTADOS</b>	28
<b>VII.1. Extracción de ARN Total</b>	28
<b>VII.2. Purificación y Análisis de ARN Total</b>	29
<b>VII.3. Síntesis de ADNc</b>	30
<b>VII.4. Clonación de ANS</b>	31
<b>VII.5. Análisis de Secuencias</b>	32
<b>VII.6. Diseño de Iniciadores</b>	33
<b>VII.7. Clonación hacia el Extremo 5' del ADNc de Antocianidin Sintasa</b>	33
<b>VII.8. Ensamble de Secuencias</b>	35
<b>VII.9. Análisis Comparativo de Secuencias Aminoacídicas en Antocianidin Sintasa</b>	37
<b>VII.10. Modelación Estructural de la Enzima MiANS</b>	39
<b>VII.11. Dendograma de Secuencias Aminoacídica de Antocianidin Sintasa</b>	40
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	41
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	43
<b>X. LITERATURA CITADA</b>	44



## LISTA DE TABLAS

Tabla I	Antocianinas, sus sustituyentes y colores producidos.	14
Tabla II	Iniciadores antisentido para ANS (Antocianidin sintasa).	33

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Producción de mangos, mangostanes y guayabas.	4
Figura 2	Esquema de la vía de la biosíntesis de antocianinas y sus ramas.	9
Figura 3	Ruta biosintética general de los fenilpropanoides.	11
Figura 4	Estructura química general de las antocianinas.	12
Figura 5	Esquema de la reacción de antocianidin sintasa.	13
Figura 6	Modelo estructural de ANS en <i>Arabidopsis thaliana</i> , cristalizada.	16
Figura 7	Electroforesis en gel agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes para ARN total de <i>Mangifera indica</i> .	28
Figura 8	Electroforesis en gel de agarosa al 1%, reacciones de PCR prueba de ADN genómico.	29
Figura 9	Electroforesis en gel de agarosa al 1%, de los productos amplificados de ADNc.	30
Figura 10	Análisis electroforético de la digestión de la clona parcial de ANS1 de mango ( <i>Mangifera indica</i> L).	31
Figura 11	Distribución espacial de la secuencia de ANS1 para <i>Mangifera indica</i> L en comparación con la secuencia de aminoácidos de ANS en <i>Citrus sinensis</i> .	32
Figura 12	Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión de la clona parcial ANS2.	34
Figura 13	Esquema del ensamble de secuencias ANS1 y ANS2.	35
Figura 14	Secuencia nucleotídica y secuencia aminoacídica deducida de MiANS.	36
Figura 15	Alineamiento de secuencias aminoacídicas de ANS de diferentes especies con MiANS por medio del algoritmo ClustalW.	37
Figura 16	Alineamiento de secuencias aminoacídicas para identificación de regiones conservadas, según lo reportado para ANS de <i>A. thaliana</i> , a partir del aminoácido180.	38
Figura 17	Modelo estructural de la MiANS de mango ( <i>Mangifera indica</i> L).	39
Figura 18	Dendograma comparativo de secuencias aminoacídicas de ANS de diferentes especies comparada con la secuencia de MiANS.	40

## RESUMEN

La antocianidin sintasa (ANS) es una enzima que participa en el metabolismo secundario de las plantas en la ruta de los fenilpropanoides, hidroxila el carbono 3 de las leucoantocianidinas para producir las antocianidinas, compuestos precursores de los pigmentos que dan color a las plantas. El objetivo de esta investigación fue clonar la región codificante para la antocianidin sintasa de mango (*Mangifera indica* L). Se obtuvo la secuencia nucleotídica de una clona parcial del extremo 3' de la antocianidin sintasa a partir de un banco de genes construido de mesocarpio de mango. Para completar la región codificante (extremo 5') se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa y como molde una mezcla de ADN complementario de mesocarpio, epicarpio, hojas y embrión. Se obtuvo un fragmento de 800 pares de bases y se clonó en el vector pCR2.1 para ser secuenciado y al analizarse mediante el algoritmo BLAST, se identificó como antocianidin sintasa. Posteriormente, se realizó un ensamble de ambos fragmentos resultando un marco de lectura continuo de 1056 pares de bases que codifican para una antocianidin sintasa de 351 aminoácidos, la cual posee dos dominios característicos. Un dominio es de la familia 2 oxoglutarato dioxigenasa dependiente de hierro II y otro de la familia Diox-n. La secuencia aminoacídica se comparó contra la antocianidin sintasa de *Vitis vinifera*, *Citrus sinensis*, *Dimocarpus longan*, *Theobroma cacao* y *Garcinia mangostana*, presentando una alta identidad entre ellas. Además, se realizó una modelación tridimensional de la antocianidin sintasa de mango por medio del programa MOE, donde se observa una alta similitud con las estructuras de las enzimas de *Arabidopsis thaliana* y *Spinacia oleracea*. Por lo tanto, la región codificante de la antocianidin sintasa de mango es muy parecida en tamaño y secuencia nucleotídica a la de otras plantas, así como su secuencia aminoacídica y estructura modelada.

## I. INTRODUCCIÓN

El fruto de mango (*Mangifera indica* L) es apreciado a nivel mundial por sus características, buen sabor y sus propiedades benéficas al consumirlo. Además, en nuestro país posee una importancia comercial, ya que según la FAO en el 2010, a México le pertenece el quinto lugar a nivel mundial en la producción de *Mangifera indica* L, con 1,632,650 toneladas. En México se producen diversas variedades de mango, tales como las criollas, Kent, Keitt, Ataulfo, Sensation, Zill, Manila, entre otras. Por otra parte, México es el primer exportador de mango a nivel mundial, donde su principal importador es Estados Unidos (E.E.U.U.) con el 85% del producto exportado (Yahia, 2006). Por lo que a nivel nacional es un producto importante; mientras que a nivel de investigación se pretende utilizar como modelo de estudio, debido a que se ablanda muy rápido durante su almacenamiento. Se investigan tecnologías para mantener la calidad del mango durante su postcosecha, además de sus propiedades nutricionales (contenido de compuestos fenólicos antioxidantes y los beta carotenos).

La ruta del metabolismo secundario de los fenilpropanoides es generalmente conocida como la ruta de los fenoles, cuenta con una estructura C6-C3-C6. De esta ruta se derivan diversos productos: quinonas fenólicas, cumarinas, lignanos, estilbenos, ligninas, taninos y los flavonoides (Piñol, 2008). Estos compuestos son importantes para la señalización e interacción de la planta con el medio ambiente, ya que los diversos compuestos, le proporcionan protección contra rayos ultravioleta, agentes microbianos y defensa contra animales. Además, ayudan en la polinización y distribución de semillas para la reproducción de la planta, y protección contra fitopatógenos. También son importantes en la señalización durante la nodulación, la fertilidad masculina y el transporte de auxinas que les proporciona tejido suberizado a plantas complejas (Koes et al., 2005; Croteau et al., 2000).

Las antocianinas poseen el esqueleto característico de los flavonoides C6-C3-C6, y su estructura es de 2-fenilbenzopirilio de la sal de flavilio, que son capaces de absorber la luz fuertemente en la región visible del espectro. Las antocianinas únicamente se sintetizan en ciertos tejidos y durante determinadas etapas de la vida de la planta (Valle et al., 2005). La biosíntesis de las antocianinas proviene de la hidroxilación del carbono 3 de los compuestos leucoantocianidinas, esta reacción es catalizada por la enzima antocianidin sintasa (ANS). Tres de las principales antocianinas son la cianidina, delphinidina y pelargonidina. Estas a su vez son glicosiladas por una enzima glicosil transferasa para su estabilidad, además de reacciones de metilación y acetilaciones (Cuevas et al., 2008; Lock, 1997). El ADN complementario (ADNc) de ANS en *Arabidopsis thaliana* codifica una proteína de 356 aa (Pelletier et al., 1997), en

*Ipomea batatas* una de 362 aa (Liu et al., 2010), en *Malus crabapple* “Royalty” una de 357 aa (Tian et al., 2010) y en *Brassica campestris* var. *Purpurea* una de 358 aa (Jiang et al., 2011). Al comparar las secuencias aminoacídicas de esas ANS, se observa que son muy similares.

Por lo que el estudio de estas enzimas es importante por su relevancia en la producción de pigmentos y por su función de defensa contra agentes bióticos y abióticos. El objetivo de este estudio fue obtener el ADNc de la antocianidin sintasa de frutos de mango y realizar análisis comparativos entre las secuencias de ANS reportadas en el banco de genes.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. *Mangifera indica* L

#### II.1.1. Origen del mango

Los mangos fueron mencionados por primera vez hace aproximadamente 4,000 años, y comercialmente se cree que el Emperador de los mongoles, Akbar, en el año 1,500 D.C. plantó 100,000 árboles Darbhan, al Este de la India. Algunos autores señalan a la India como centro del origen del mango, pero Hooker en 1876, menciona que fue introducido en este país. El centro primario de evolución del mango (*Mangifera indica* L) es señalado en la región Indo-Birmana y Sureste de Asia, Isla de Borneo y Sumatra. Se encontró en forma silvestre en toda la región tropical de Asia (India, Sri Lanka, Myanmar, Tailandia, Indochina, Sureste de China, Malasia, Indonesia, Papúa, Nueva Guinea, Filipinas) e incluso lugares distantes de Asia como las Islas Carolina y Salomón. Se introdujo al Archipiélago Malayo durante el cuarto y quinto siglo antes de Cristo. Los portugueses se lo llevaron de su lugar de origen a Brasil durante el siglo XVII, de donde se dispersó por América del Sur. Para 1742, se encontraba en Barbados, y en 1782 en República Dominicana y Jamaica. Los españoles lo llevaron a Filipinas, a México y a las Indias Occidentales a comienzos del siglo XIX. De las Indias Occidentales, el mango es llevado a Miami-EE.UU por Henry Perrine en 1833, posteriormente por el Dr. Flecheor en 1862 y así con las posteriores introducciones efectuadas en el último cuarto del siglo XIX, se establecieron plantaciones experimentales en Florida a principios del siglo XX (Sergent, 1999).

En la actualidad la India tiene la mayor producción de mango, mangostanes y guayabas con una producción de 16,337,400 de toneladas. Mientras que México se encuentra en el quinto lugar de producción, con una producción de 1,632,650 toneladas reportadas para el año 2010 (Figura 1). Además México cuenta con un área cosechada de mango que en años recientes ha fluctuado entre 120,000 y 167,000 ha, con una tasa de crecimiento anual promedio de 6.8 % en cuanto a nuevas áreas de cultivo (Yahia, 2006).

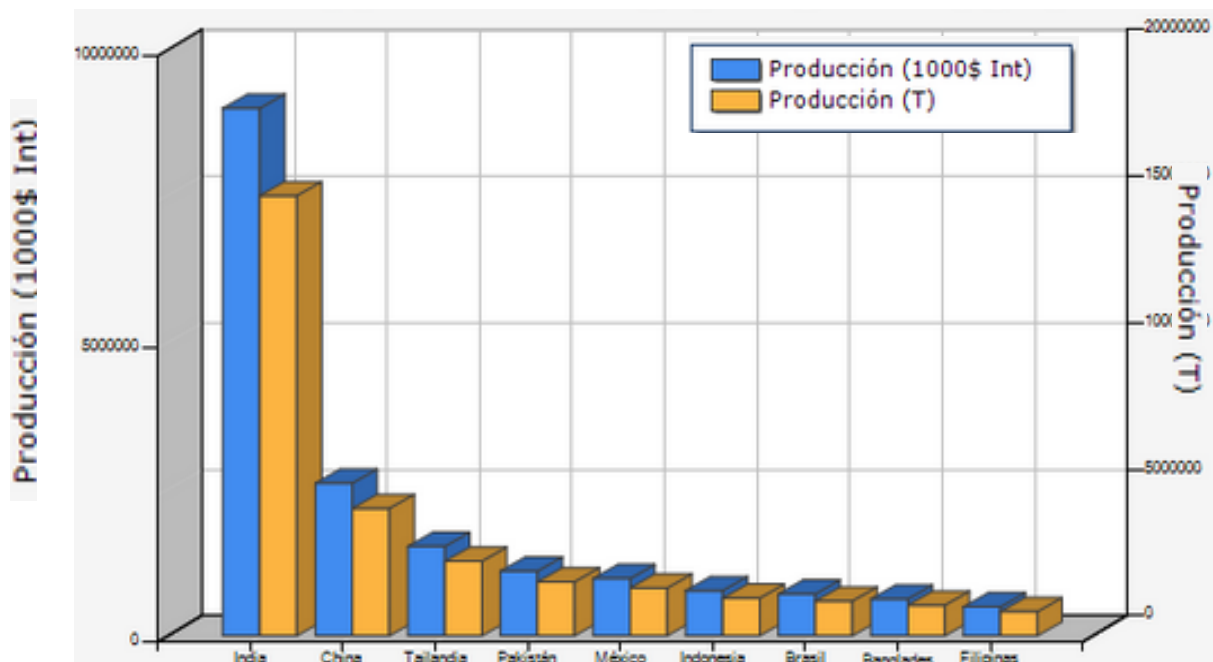


Figura 1. Producción de mangos, mangostanes y guayabas. Fuente: FAO en el 2010.

Aunque México ocupa el quinto lugar como país productor de mango, es el principal exportador a nivel mundial, que participa con un porcentaje de 33%, seguido por Brasil 11%, Filipinas 6%, India 6%, Holanda 6% (totalmente de re-exportación) y Perú 1.12%. México es el principal exportador a Estados Unidos, con el 85% del mango exportado debido a la calidad de su fruta (Yahia, 2006); sin embargo, las pérdidas postcosecha de éste fruto resultan en grandes pérdidas.

### II.1.2. Descripción de la planta de mango (*Mangifera indica*)

El mango pertenece a la familia *Anacardiaceae*. El género *Mangifera* incluye más de 60 especies que dan frutos comestibles. La mayoría de estos árboles frutales que se conocen comúnmente para consumo humano pertenecen a la especie *Mangifera indica*. Las otras especies comestibles de *Mangifera* generalmente tienen frutos de baja calidad y se conocen comúnmente como mangos silvestres. *M. indica* es una especie que crece en climas cálidos tropicales y subtropicales, los cuales se encuentran en su mayoría en los continentes de Asia, África y América. El mango es una fruta de gran demanda, ya que se cuenta con alrededor de mil cultivos diferentes en el mundo. Además, el mango es una excelente fuente de vitaminas como el ácido ascórbico, vitamina E, tiamina, riboflavina, niacina y beta-carotenos, entre otros (Yahia, 2006).

Los frutos del mango se clasifican como una drupa (fruto carnoso con una sola semilla encerrada en un endocarpio coriáceo). Los mangos de diferentes variedades pueden ser muy variables en forma, color, sabor y la textura de la carne o pulpa. La forma del fruto varía de redonda a oval a oblonga y alargada con compresión lateral variable. Los frutos puede pesar desde menos de 50 g (0,35 libras) hasta más de 2 kg (4.4 libras). El fruto tiene un color verde oscuro cuando está en desarrollo en el árbol, posteriormente se convierte a verde claro y después a amarillo cuando madura. Algunas variedades desarrollan un fondo de color rojo que en algunos frutos se mantiene hasta la maduración. El mesocarpio es la parte carnosa y comestible de la fruta (pulpa) que por lo general tiene un sabor dulce (Yahia, 2006).

Existen diferentes variedades de *Mangifera indica* alrededor del mundo, entre las que se encuentran la variedad Manila, Haden, Keitt, Kent, Tommy Atkins, Irwin, Sensation, y Ataulfo; que son las 8 más importantes por su cultivo en México. De acuerdo con Yahia (2006), los frutos de estas variedades se describen de la siguiente manera:

Manila: Su fruto va de pequeño a mediano, de 9 a 17 cm de longitud y de 180 a 550 g en promedio. Es de forma oblonga, con la inserción del pedúnculo oblicua y sin cavidad, con la base redonda y ápice punteado; el seno y el punto estigmático están ausentes, con la espalda ventral alta y redonda y la dorsal, vertical. La cáscara es amarilla, lisa, gruesa y con numerosas lenticelas que son pequeñas y de color amarillo; ésta constituye 12.2% del peso total del fruto. La pulpa tiene color amarillo a anaranjado, con un contenido moderado de jugo y fibra, de baja firmeza, la cual es dulce con un contenido de sólidos solubles totales de 21% y de muy buen sabor y representa 74.0% de peso. La semilla es mono-embriónica. El cultivar es muy productivo en Guerrero, México (Yahia, 2006).

Haden: Es de tamaño mediano a grande (14 cm de largo y 600 g de peso), de forma oval y regordeta; el color de fondo es amarillo con chapeado rojo carmesí y numerosas lenticelas blancas producen un aspecto abigarrado atractivo. Tiene hombros bien desarrollados en la terminación del pedúnculo. La pulpa es firme, jugosa, con una cantidad moderada de fibra, de sabor ligeramente ácido y de buena calidad. La semilla (mono-embriónica) es relativamente pequeña y ocupa alrededor de 8% del peso total de la fruta (Yahia, 2006).

Keitt: Su fruto es grande, de 15 cm de largo y pesa hasta 1kg es oval, regordeta y gruesa. El color de fondo es amarillo con zonas ligeramente rosa. La cáscara contiene numerosas lenticelas pequeñas amarillas a rojas, y representa 9.4% del peso total del fruto. La pulpa es jugosa, sin fibra (excepto cerca de la semilla), de sabor dulce (alcanza hasta 16.8% de sólidos solubles totales) y muy buena calidad. La semilla (mono-embriónica) es pequeña y representa de



7 a 8.5 % de su peso total. Se transporta bien y es uno de los mejores mangos tardíos (Yahia, 2006).

**Kent:** La forma del fruto de esta variedad es ovalada, más bien gruesa y regordeta, es un fruto grande, de 13 cm o más de longitud y con un peso promedio alrededor de 680 g. Su color de fondo varía de amarillo verdoso a albérico con un rojo oscuro y grisáceo, con numerosas lenticelas pequeñas y amarillas. La pulpa, que representa 79.5% del peso del fruto, es jugosa y sin fibra, de color amarillo naranja, sabor muy dulce (18.9% de sólidos solubles totales) y de calidad de muy buena a excelente. La semilla representa alrededor de 9 % del peso del fruto. Igual que el Keitt, se transporta bien y es otro de los mejores mangos tardíos (Yahia, 2006).

**Tommy Atkins:** Su fruto es ligeramente largo (13 cm) y va de 450 g a 700 g, tienen forma oval a elongada con punta ampliamente redondeada. La inserción del pedúnculo es recta y ligeramente levantada. El color de fondo va de un amarillo naranja o rojizo brillante a rojo oscuro, con zonas rojizas que cubren la mayor parte de la superficie del fruto. La superficie de la fruta es lisa, de cáscara gruesa y resistente al daño mecánico. Las lenticelas son numerosas, pequeñas y blancas. La pulpa varía de un color amarillo claro a un amarillo oscuro, con textura firme debido a la presencia de abundantes fibras finas, es dulce (contiene 15% de sólidos solubles totales) y constituye un 79.2% del peso del fruto. Su sabor va de regular a bueno. La pulpa firme junto con la cáscara gruesa lo hace resistente a los daños causados por el manejo. La semilla es pequeña y representa al 6-8% del peso de la fruta. Esta variedad proviene de una semilla sembrada de Haden en 1922 (Yahia, 2006; Sergent, 1999).

**Irwin:** Esta tiene un fruto de tamaño mediano, de alrededor de 13 cm de largo y de hasta 450 g. Es elongado u ovalado y angosto, con el fondo amarillo-anaranjado y chapeo rojo brillante. Las lenticelas son blancas y la pulpa carece de fibra, pero tiene un aroma agradable y buena calidad. La semilla representa alrededor de 8% de su peso total (Yahia, 2006).

**Sensation:** La forma de su fruto es ovalada, su tamaño va de pequeño a mediano, de alrededor del 11 cm de longitud y de 280 a 340 g en promedio. El color de fondo va de amarillo brillante a amarillo-anaranjado con un rojo oscuro que a menudo cubre la superficie total. Tiene numerosas lenticelas pequeñas amarillas. La pulpa es jugosa y sin fibra, con sabor muy dulce y de calidad buena a muy buena. La semilla representa 8% de su peso.

**Ataulfo:** Es de excelente calidad comestible; su forma es oval-oblonga con inserción del pedúnculo vertical, de cavidad muy leve y base ligeramente aplanada con el ápice punteado, seno ligero y sin punto estigmático. La espalda ventral es elevada y redonda y la dorsal termina en una curva larga. La cáscara o epicarpio, que constituye 12.8% del fruto, es de color amarillo-anaranjado y de grosor moderado, con lenticelas muy abundantes, pequeñas y blancas. La pulpa

o mesocarpio es de color naranja y de jugosidad moderada; tienen muy buena firmeza, con poca fibra y alcanza 16.8 % de sólidos solubles totales, que constituye el 76% del fruto. Su semilla es poli-embriónica (Yahia, 2006).

## **II.2. Metabolismo de las Plantas**

Todas las células vegetales involucran procesos metabólicos que conducen a la formación de compuestos, tales como azúcares simples, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y polímeros derivados de los mismos, los cuáles son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. El conjunto de éstos procesos constituyen al metabolismo primario de las plantas, y a sus productos se les conoce como metabolitos primarios. Por otro lado, en las células vegetales existe también un conjunto de reacciones que se producen de forma paralela al metabolismo primario, llamado metabolismo secundario. Los productos del metabolismo secundario, conducen a la formación de compuestos peculiares de ciertos grupos taxonómicos. A los compuestos resultantes del metabolismo secundario se les denomina metabolitos secundarios (Piñol et al., 2008).

### **II.2.1 Metabolismo secundario**

Las plantas superiores han necesitado miles de años de evolución continua y perfeccionamiento, a través de la interacción con el medio ambiente y las relaciones interespecíficas (García, 2004). El metabolismo secundario es el resultado de las adaptaciones más sorprendentes en el reino vegetal, donde éste posee una importancia ecológica primordial en la mejora de la supervivencia plantas (Strack, 1997).

La biosíntesis de los metabolitos secundarios suele encontrarse restringida a fases específicas del desarrollo, tanto del organismo como de las células especializadas, así como en condiciones de estrés. De esta forma cumplen funciones, tales como la comunicación intra e interespecífica, defensa contra factores ambientales y ataque de depredadores, patógenos o parásitos, además, se sintetizan metabolitos encargados de los pigmentos de las flores para atraer polinizadores, protección a las planta de infecciones o depredadores. En general puede afirmarse que los metabolitos secundarios constituyen el mundo de señales químicas a través del cual las plantas se relacionan con su entorno (Piñol et al., 2008). Los metabolitos secundarios se encuentran principalmente en las vacuolas, la periferia adyacente interna o el centro de los orgánulos citoplasmáticos (García, 2004). Algunos metabolitos secundarios se producen por

razones apreciables (por ejemplo, la defensa, colorantes y atrayentes), pero para muchas de sus funciones y beneficios para la planta son prácticamente desconocidas (Russell et al., 2011).

De acuerdo con biólogos evolucionistas, los sistemas de defensa en vegetales deben haber surgido a través de los fenómenos de mutación hereditaria, selección natural y cambios evolutivos. Por ejemplo, las mutaciones al azar en las rutas metabólicas básicas darían aparición de nuevos compuestos, que pudieron ser tóxicos o disuasivos para herbívoros y microbios patógenos. Al ser estos compuestos no tóxicos para la planta y no generar mucho costo, representó una ventaja reproductiva contra aquellas que no, así mismo se fue generando una descendencia mayor ante las otras plantas, y dichos caracteres se transmitieron a las generaciones siguientes. Si las plantas no hubieran evolucionado con la respuesta del metabolismo secundario, no existiría la amplia gama de especies diferentes (Taiz et al., 2006; Strack, 1997).

### **II.2.2 Biosíntesis en el metabolismo secundario**

Los materiales de partida de las rutas importantes del metabolismo secundario, como el ácido siquímico, el acetil CoA y algunos aminoácidos, son producto del metabolismo primario (Russell et al., 2011). El ácido siquímico, es el precursor de aminoácidos como la fenilalanina, de la que se derivan, la mayoría de los compuestos fenólicos de la plantas, dando origen a muchos compuestos aromáticos, entre ellos los ácidos cinámicos y ciertos polifenoles (Figura 2) (Strack, 1997; Piñol et al., 2008). El acetil CoA, por la ruta de acetato/malonato, es precursor de algunas quinonas vegetales, así como de diversos felipropanoides (C6-C3-C6) (Strack, 1997). Por otro lado, la ruta acetato/mavalonato conduce a la síntesis de algunos terpenoides aromáticos, en su mayoría monoterpenos. Finalmente, los aminoácidos son precursores de los alcaloides y de los antibióticos, entre los que figuran las penicilinas y las cefalosporinas. Existen metabolitos secundarios en cuya formación concurren varias rutas metabólicas, tal es el caso de polifenoles como los estilbenos o los flavonoides, formados por la ruta del ácido siquímico y del acetato/malonato (Piñol et al., 2008).

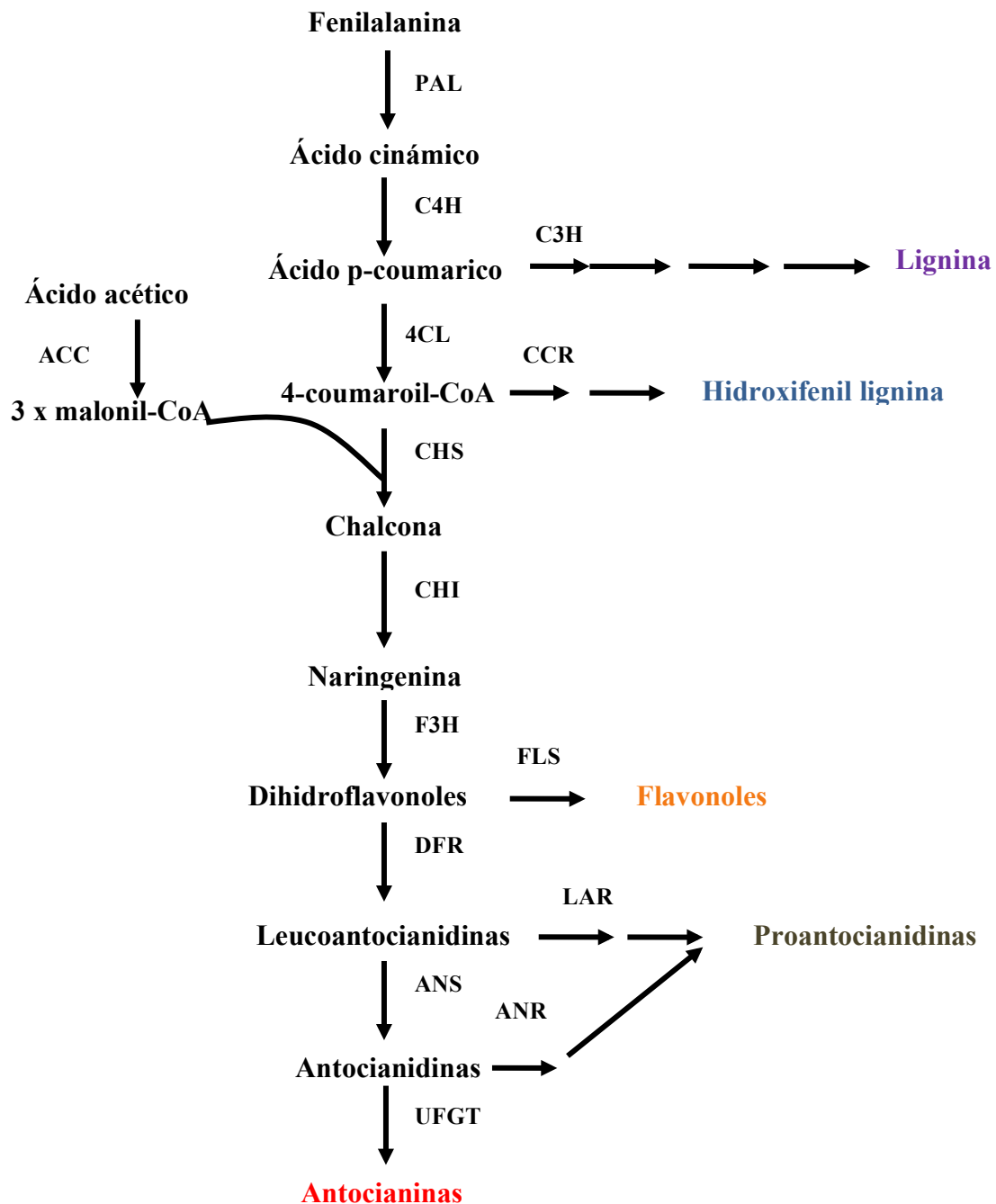


Figura 2. Esquema de la vía de la biosíntesis de antocianinas y sus ramas. PAL, fenilalanina ammonia liasa, C4H, cinamato 4-hidroxilasa; 4CL, 4-cumarato-CoA ligasa, CHS, chalcona sintasa, CHI, isomerasa chalcona; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; DFR, dihidroflavonol 4 -reductasa, ANS, la sintasa de antocianidina; UFGT, UDPG de flavonoides-3-O-glucosiltransferasa, ANR, antocianidina reductasa, LAR, leucoanthocianidina reductasa, FLS, flavonol sintasa, ACC, la acetil CoA carboxilasa, CCR, cinamilo-CoA reductasa; C3H, 4-3-hidroxilasa cumarato. Fuente: Xie et al., 2011

## II.3. Fenilpropanoides

La presencia de fenoles es una característica de todos los tejidos vegetales. Los fenoles son compuestos de estructura aromática con uno o varios grupos hidroxilo, libres o sustituidos. El compuesto básico es el fenol, pero la mayoría de éstos compuestos son polifenoles. Actualmente se conocen más de 8000 polifenoles donde figuran las quinonas fenólicas, las cumarinas, los lignanos, los estilbenos y los flavonoides. Además de las estructuras monoméricas y diméricas, existen importantes grupos fenólicos poliméricos, como las ligninas y los taninos. También se encuentran unidades fenólicas entre los compuestos nitrogenados (Piñol et al., 2008).

### II.3.1. Biosíntesis de los flavonoides

Las vías de síntesis de fenilpropanoides y flavonoides (Figura 2) han sido investigadas en algunos frutos mediante estudios genéticos, bioquímicos y moleculares. Se han evaluado los patrones de expresión de los principales genes que codifican para enzimas que participan en éstas vías. Estas rutas son moduladas por mecanismos genéticos durante el desarrollo de plantas y frutos, así como por el medio ambiente.

En la mayoría de las especies vegetales se llevan a cabo tres reacciones enzimáticas que dirigen el flujo de carbono desde el metabolismo primario, estos pasos iniciales constituyen la ruta general de los fenilpropanoides. La deaminación realizada por la fenilalanina amonio liasa (PAL) que conduce al cambio de forma del esqueleto de fenilpropanoides, produciendo ácido cinámico (Figura 3), siendo ésta la primera enzima en la ruta de la biosíntesis de los compuestos fenilpropanoides (Reyes et al., 2007). La enzima cinamato 4-hidroxilasa (C4H) cataliza la introducción de un grupo hidroxilo en la posición *-para* del anillo fenilo del ácido cinámico, produciendo ácido *p*-cumárico. El carboxilo del grupo de ácido *p*-cumárico es entonces activada por la formación de un enlace tioéster con CoA, un proceso catalizado por *p*-coumaroil: CoA ligasa (4CL). Esta ruta de los fenilpropanoides forma intermedios para vías de biosíntesis de ácido benzoico, ácido salicílico y cumarinas (Ferrer et al., 2008). El compuesto *p*-coumaroil CoA formado así, es capaz de entrar en las dos vías principales posteriores, del monolignol y la biosíntesis de flavonoides (Almeida et al., 2007).

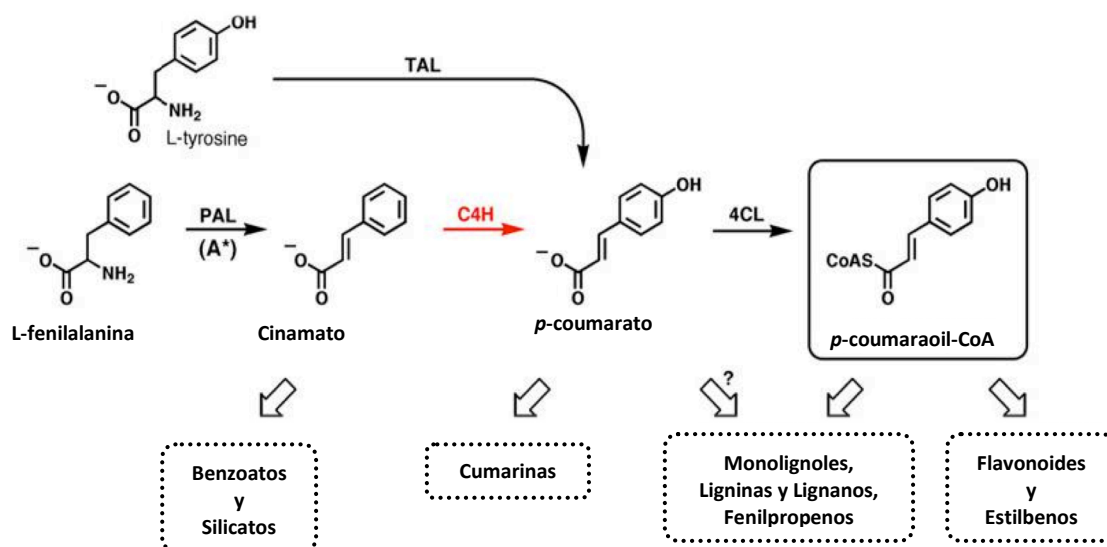


Figura 3. Ruta biosintética general de los fenilpropanoides. Fuente: Ferrer et al., 2008.

### II.3.2 Derivados del p-coumaroil-CoA

A través del compuesto p-coumaroil-CoA se derivan las diversas rutas de los fenilpropanoides en donde se puede obtener diversos metabolitos como las cumarinas, flavonoides, ligninas, lignanos y compuestos aromáticos (Croteau et al., 2000). Por lo tanto, las cumarinas pertenecen a la familia extendida de metabolitos de las plantas llamadas benzopiranoas, con más de 1,500 representantes en más de 800 especies. En plantas, estos compuestos se producen en la testa, frutas, flores, raíces, hojas y tallos, aunque en general las mayores concentraciones se encuentran en las frutas y las flores. Su actividad parece estar principalmente relacionada con la defensa, dada su potencia antimicrobiana, anti-ingesta, actividad antimicrobiana, detección de UV y las propiedades de inhibición de la germinación. La mejor propiedad conocida de las cumarinas, indirectamente, es su papel en la defensa de la planta, causando daños a los consumidores como los depredadores (Croteau et al., 2000).

Los monolignoles se convierten principalmente en dos diferentes clases de metabolitos vegetales: los lignanos y las ligninas. El flujo metabólico a través de la mayoría de la ruta biosintética de los fenilpropanoides se dirige a la producción de la lignina, que es un componente estructural de las paredes de las células (Croteau et al., 2000).

Los flavonoides, con más de 4,500 representantes diferentes conocidos hasta ahora, estos son un tipo enorme de productos fenólicos naturales. Estos están presentes en la mayoría de las plantas y tejidos, a menudo en las vacuolas, y pueden encontrarse como monómeros, dímeros y

oligómeros (Croteau et al., 2000). Los diversos flavonoides tienen múltiples funciones biológicas, incluida la protección contra los rayos UV y fitopatógenos, en la señalización durante la nodulación, la fertilidad masculina y el transporte de auxina (Koes et al., 2005).

Muchas interacciones entre plantas y animales son influenciadas por los flavonoides. Existen flavonoides relacionados como los flavonoles, flavonas, chalconas y auronas, que también contribuyen a la definición del color. Los colores de flores y frutos, comúnmente tienen la función de atraer polinizadores y dispersores de semillas, estos son el resultado principalmente de las antocianinas vacuolares como pelargonidinas, cianidinas y delphinidinas (Croteau et al., 2000).

#### II.4. Antocianinas

Las antocianinas están consideradas dentro del grupo de los flavonoides ya que poseen el esqueleto característico C6-C3-C6, y su estructura es de 2-fenilbenzopirilio de la sal de flavilio (Figura 4). Poseen el mismo origen biosintético de los flavonoides, pero difieren en que absorben la luz fuertemente en la región visible del espectro. Las antocianinas únicamente se sintetizan en determinados tejidos y durante determinadas etapas de la vida de la planta (Valle et al., 2005). En general, la función de las antocianinas es de atrayentes de insectos y pájaros para procesos de polinización y diseminación de semillas (Lock, 1997; Cuevas et al., 2008). Por lo que la acumulación visible de estos compuestos usualmente refleja la actividad de las enzimas involucradas en la ruta biosintética (Valle et al., 2005).

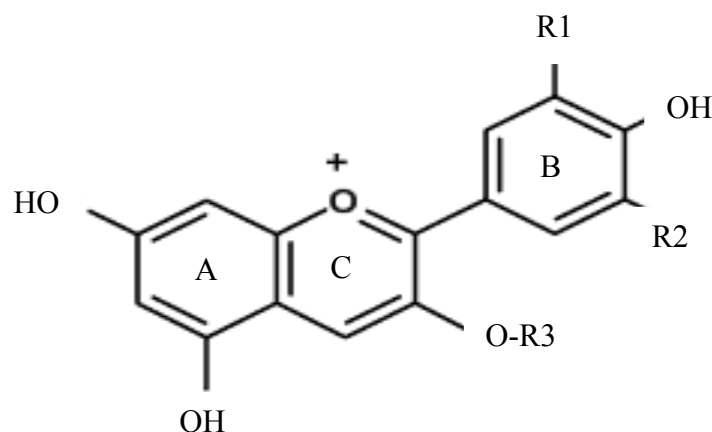


Figura 4. Estructura química general de las antocianinas. Los grupos R pueden ser -H, -OH y -OCH<sub>3</sub>. Fuente: Bueno et al., (2012).

## II.4.1 Biosíntesis de las antocianinas

La molécula *p*-coumaroil CoA es el precursor de las antocianinas, pero además de ésta molécula es necesario 3 moléculas de malonil CoA, provenientes de la ruta del ácido malónico (Acetato/Malato). El anillo A presente en las antocianinas es producto de la condensación de esas tres moléculas de malonil CoA. Mientras que el anillo B es sintetizado a través de la ruta del ácido siquímico hasta llegar al *p*-cumárico (Figura 4)(Cuevas et al., 2008; Garzon, 2008). El resultado de dicha condensación es la formación de una chalcona de 15C, la chalcona naranjina, esta reacción es catalizada por la enzima chalcona sintasa (CHS). Este compuesto intermedio reacciona con la enzima chalcona isomerasa (CHI) provocando una isomerización de la flavona (15C) (Cuevas et al., 2008). Posteriormente la flavona sufre una hidroxilación en el carbono 3 seguido por la deshidratación de la molécula, lo cual es posible por la acción de la enzima antocianidin sintasa (ANS), que da como resultado a una antocianidina (Figura 5), la cual es inestable. La antocianidina se estabiliza por la glicosilación del anillo heterocíclico y posteriores posibles reacciones de metilación de los hidroxilos, seguidas por acilaciones (Garzon, 2008). Las antocianinas presentan una inestabilidad inherente, los factores que influyen son: pH, presencia de O<sub>2</sub>, interacción con otros componentes en los alimentos, ácido ascórbico, iones metálicos, azúcares y copigmentos (Lock, 1997).

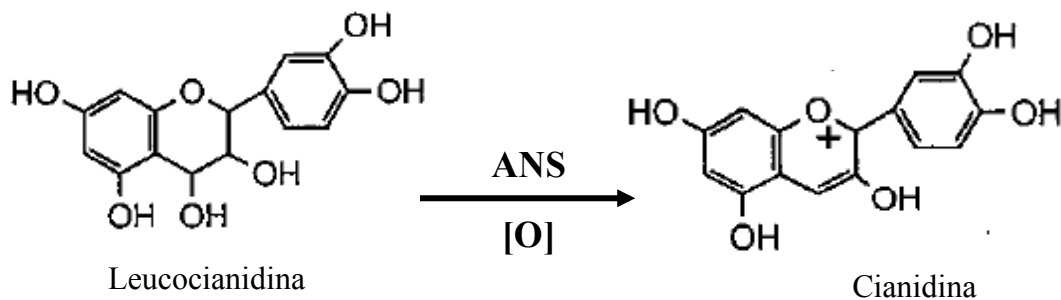


Figura 5. Esquema de la reacción de antocianidin sintasa. Fuente: Pelletier et al., 1997.

El color producido por las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules, mientras que incrementos en metoxilaciones producen coloraciones rojas (Tabla 1). En la naturaleza las antocianinas siempre presentan sustituciones glucosídicas en



las posiciones 3 y/o 5 con mono, di, o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Los monosacáridos son glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa, arabinosa; los disacáridos son rutinosa, sambibiosa, soforosa, gentiobiosa y laritrosa. Basadas en su glicosidación pueden clasificarse como 3-monoglicósidos, 3-biósidos, 3-5diglicósidos y 3,7 diglicósidos, siendo estos los últimos los menos comunes (Lock, 1997). Otra posible sustitución es la variación en la estructura por la acilación de los residuos de azúcares con una molécula con ácidos orgánicos, estos pueden ser alifáticos (malónica, acético, málico, succínico u oxálico) o aromáticos (p-coumarico, cafeico, ferulico, sináptico, gálico y *p*- hidroxibenzoico) (Garzon, 2008).

Tabla 1. Antocianinas, sus sustituyentes y colores producidos. \* metanol- ácido hidroclicórico.  
Fuente: Bueno et al., (2012)

Antocianidina	R1	R2	$\Lambda_{max}$ (nm)*		Algunos colores producidos
			R3=H	R3=gluc	
Delfinidina	OH	OH	546	541	Morado, azul, malva
Petunidina	OH	OCH3	543	540	Morado
Malvidina	OCH3	OCH3	542	538	Morado
Cyanidina	OH	H	535	539	Magenta y carmesí
Peonidina	OCH3	H	532	528	Magenta
Pelargonidina	H	H	520	516	Salmon naranja

#### II.4.2. Importancia de las antocianinas para el entorno

Muchos metabolitos secundarios están implicados en relaciones ecológicas, es decir existe relación entre la planta productora con otros organismos de su medio natural, como los pigmentos de las flores para atraer polinizadores, o para brindar protección a las plantas de infecciones o depredadores. En general, puede afirmarse que los metabolitos secundarios constituyen el mundo de señales químicas a través del cual las plantas se relacionan con su entorno (Piñol et al., 2008). Las antocianinas son el mayor grupo de pigmentos solubles en agua en el reino vegetal (Mazza, 2007). Las antocianinas son las responsables de la mayoría de los colores rojo, azul, y morado en las frutas, vegetales, flores y otros tejidos o productos de las plantas. Estos pigmentos se encuentran acumulados en las vacuolas de los tejidos vegetativos y

reproductivos, y ambos se encuentran en la epidermis y en el tejido sub-epidérmico (Stafford, 1994). Además, se han reportado diferentes actividades biológicas como: antioxidante, anti-inflamatoria, antimicrobial, actividades anticancerígenas, inducción de apoptosis, mejoramiento de la visión y efectos de neuroprotección. Un estudio de Mazza (2007), menciona que las antocianinas tiene la capacidad de reducir las enfermedades cardiovasculares.

## II.5. Antocianidin Sintasa

### II. 5.1 Características de antocianidin sintasa

La enzima antocianidin sintasa (ANS), cataliza el penúltimo paso en la biosíntesis de antocianinas, de una leucoantocianidina incolora a una antocianidina con color (Ferrer et al., 2008; Cheng et al., 2006). Un estudio con *Arabidopsis thaliana* en donde obtuvieron estructuras cristalinas para la ANS (Figura 6), sugiere un mecanismo de catálisis de ANS para la formación de antocianidinas a partir de los sustratos naturales leucoantocianidinas implica una estereoselectividad de hidroxilación en C-3 (Wilmouth et al., 2002).

La ANS es una enzima dependiente del oxoglutarato  $Fe^{2+}/_{3+}$  dioxigenasa que cataliza el penúltimo paso en la biosíntesis de antocianinas. La estructura cristalina de la ANS revela que la región interior consiste en ocho hojas  $\beta$  paralelas ( $\beta$ 5-12) dispuestas como una doble cadena  $\beta$  – hélice, llamada topología “Jelly Roll” (Ferrer et al., 2008). El “Jelly Roll” forma una cavidad hidrofóbica, tiene una larga hélice  $\alpha$  (A12) en el extremo N-terminal, que aparece para formar una estructura "esqueleto". La estructura “Jelly Roll” es conservada en todas las enzimas 2OG oxigenasas dependiente de Fe II, estructura característica de la familia de estas enzimas, como sugiere Roach et al., (1995) en el estudio de la enzima isopenicilina N sintasa. La región C-terminal de ANS tiene forma de un lazo largo (residuos 309-333) que conduce a una hélice  $\alpha$  ( $\alpha$ 17), que forma una tapa sobre la región terminal del sitio activo, la cual parece ser " flexible " (Figura 6) (Wilmouth et al. 2002).

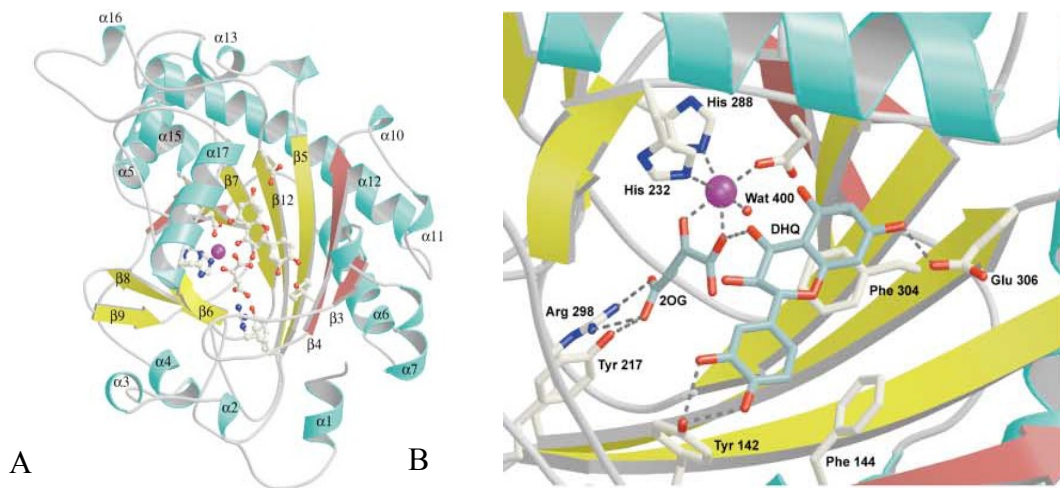


Figura 6. Modelo estructural de ANS en *Arabidopsis thaliana*, cristalizada. Panel A, estructura completa de la enzima ANS. Panel B, acercamiento al sitio activo de la enzima ANS, con sustratos análogos. Fuente: Wilmouth et al., (2002)

## II.5.2. Secuencias nucleotídicas que codifican para antocianidin sintasa

En estudios en los cuales se clonó la región codificante para la enzima ANS, se reportó que existe una gran homología o identidad entre las ANS de las especies en estudio con las ANS de las especies comparadas. En estudios efectuados con la planta *Arabidopsis thaliana* (Pelletier et al., 1997) se obtuvo una secuencia deducida de 356 aminoácidos con un peso molecular de 40.5 kDa. Esta secuencia presentó homología con ANS de *Malus ssp*, *Antirrhinum majus*, *Petunia hybrida*, *Vitis vinifera* y *Zea mays*, con porcentajes de identidad de 78%, 74%, 73%, 61% y 49%, respectivamente. Esta enzima en *Arabidopsis thaliana* se reporta codificado por un único gen, el cual fue localizado en el cromosoma de dicha planta por análisis de Southern blotting (Pelletier et al., 1997).

En un trabajo realizado en papa dulce (*Ipomea batatas*), llamado comúnmente camote, se obtuvo una secuencia de ADNc para ANS de 1,375 pb, correspondiente a un marco de lectura abierta de 1,086 pb que codifican para 362 aa (GU598212) (Liu et al., 2010). Esta secuencia mostró una alta similitud con ANS de *Ipomea nil* (94%), *I. purpurea* (95%), *I. horsfalliae* (95%) y *Solenostemon scutellarioides* (80%).

También a partir de hojas de manzana (*Malus crabapple* “Royalty”), se obtuvo la secuencia completa del ADNc la cual fue de 1,350 pb, éste presenta un fragmento de lectura abierta de 1,074 pb que codifica para una proteína de 357 aminoácidos. La secuencia de ADN es

de 1,268 pb incluyendo un intrón. La secuencia de aminoácidos codificada en el ADNc de ANS de la manzana presenta una alta homología, respecto a la *Vitis vinífera* con 80.11%, *Fragaria x ananassa* con 81.98% y *Pyrus communis* con 99.44% (Tian et al., 2010).

Por otra parte a partir de ADN genómico de cotiledones de nabo silvestre (*Brassica campestris* var. *purpurea*), obtuvieron el gen de ANS, con una longitud de 1,637 pb que incluye un intrón de 560 pb (GenBank GQ120562) y una secuencia codificante completa de 1,077 pb que se traduce en 358 aminoácidos. El estudio de alineamiento de secuencias reveló identidades con las ANS de *Brassica campestris* var. *purpurea* y *B. oleracea* var. *capitata* (96%), *B. juncea* (97%), *Matthiola incana* (86%) y *Arabidopsis thaliana* (89%) (Jiang et al., 2011).

Un estudio en alcachofa (*Saussurea medusa*) reporta la secuencia para ANS (*SmANS1*) de 1068 pb que codifica para 356 aa con un peso molecular de 40.3 kDa. Al compararlas encuentran que presenta alta identidad con ANS de *Callistephus chinensis* (82.9%) a nivel de aminoácidos, mientras que comparada con ANS de *Gervera hybrid* presenta una baja identidad (78.9%). Además, mencionan que al realizar los análisis de estructura primaria de *SmANS1* presenta dominios conservados de 2OG oxigenasa dependiente de FeII (Cheng et al., 2006).

### III. JUSTIFICACIÓN

La antocianidin sintasa (ANS) es una enzima clave en la ruta del metabolismo secundario de los fenilpropanoides que cataliza la síntesis de las antocianidinas usando leucoantocianidinas como sustrato. Las antocianidinas son posteriormente transformadas en las antocianinas correspondientes, las cuáles dan coloración roja, azul y violeta a las plantas (flores, hojas, tallos, raíces y frutos). Los colores atractivos de éstos tejidos vegetales sirven para la atracción de los polinizadores herbívoros lo cual es esencial para la distribución de semillas. Por otro lado, son benéficos al humano al consumirlos en frutos debido a que son compuestos bioactivos con capacidad antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, inhibe la proliferación celular y es antimutagénico. La secuencia nucleotídica codificante de la enzima ANS de mango no ha sido depositada en los bancos de genes, por lo que el clonarla sería una aportación importante, ya que podrá ser base para estudios en la evaluación de su expresión génica durante la maduración de los frutos de mango (*Mangifera indica*).

#### **IV. HIPÓTESIS**

La secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos para antocianidin sintasa (ANS) de mango (*Mangifera indica*) es conservada en comparación con ANS de otros frutos.

## **V. OBJETIVOS**

### **V.1. Objetivo General**

Obtener la secuencia nucleotídica que codifica para la enzima antocianidin sintasa (ANS) en mango (*Mangifera indica* L.)

### **V.2. Objetivos Específicos**

- a. Sintetizar el ADNc a partir de RNA extraído de tejidos de mango, para obtener la colección de genes expresados en los diferentes tejidos.
- b. Diseñar iniciadores específicos para amplificar ANS por PCR a partir de ADNc preparado de tejidos de mango (hojas, epicarpio, mesocarpio), clonar y obtener su secuencia nucleotídica.
- c. Deducir la secuencia de aminoácidos de ANS y comparar las secuencias aminoacídicas de la ANS de mango y ANS de otros frutos mediante análisis bioinformáticos.
- d. Predecir un modelo de la estructura tridimensional de la ANS de mango.
- e. Realizar un dendograma de similitud entre ANS de diversas plantas.

## VI. METODOLOGÍA

### VI.1. Extracción de ARN Total

Para este estudio se extrajo ARN total de diferentes tejidos de mango (*Mangifera indica*). Se utilizó el protocolo según Zamboni et al (2008), con ciertas modificaciones. El método consiste en añadir a 500 mg de tejido lo siguiente: 1.2 mL de buffer de extracción (2% p/v CTAB, 2% p/v PVP, TRIS-HCl 100 mM pH 8, EDTA 25 mM, cloruro de sodio 2 M y 0.05 % de espermidina trihidro clorhídrico). Posteriormente, se agregó 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol y se mezcló con el mezclador de vórtice (vórtex) por un minuto y se procedió a incubar a 65°C durante 15 min (durante la incubación se mezcla en vórtex alrededor de 7-8 veces para resuspender el tejido vegetal). Posteriormente, se dividió el volumen en dos tubos y se añadió 600  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se agitó con el vórtex. Luego se centrifugó a 13,000 x g por 15 minutos a 4°C (Thermo IEC microlite RF, Lafayette, CO, USA) y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. La extracción con cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 se repitió y se agitó en vórtex. Se centrifugó a 13,000 x g por 15 minutos a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se agregó un tercio de LiCl 8 M al volumen obtenido y se dejó incubando durante toda la noche a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a 15,500 x g por 35 minutos, se desechó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado para luego resuspenderlo en 500  $\mu$ l de buffer (1M de NaCl, 0.5% de SDS, 10 mM TRIS- HCl pH8, 1mM EDTA pH 8). Luego, se añadieron a la solución 500  $\mu$ l de cloroformo alcohol isoamílico 24:1 y se procedió a centrifugar a 15,000 x g por 10 minutos y se recuperó la fase acuosa. Posteriormente, se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto y se dejó a -80°C por 30 minutos, para precipitar el ARN total. El precipitado se centrifugó a 17,000 x g por 20 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante, el cual se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente, se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

### VI.2. Purificación y Análisis de ARN Total

Para la eliminación de ADN genómico las muestras de ARN total se trataron con DNasa I (La Roche, USA). La mezcla de la reacción contenía 1  $\mu$ g de RNA, 2  $\mu$ l de buffer de incubación 10X, 2.5 U de DNasa I esta reacción se llevó a un volumen final de 20  $\mu$ l con agua libre de RNasas y se incubó a 35°C por 23 minutos. Para purificar las muestras de ARN y eliminar la DNasa I la reacción se aforó a 100  $\mu$ l con agua libre de RNasas y después se añadió 1  $\mu$ l de



EDTA 0.5 M pH 8, 2 µl de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 100 µl de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1). Esta mezcla se centrifugó a 12,000 x g por 6 minutos a 4°C, y la fase superior se transfirió a un tubo nuevo. Se adicionaron 300 µl de etanol absoluto frío y 10 µl de acetato de amonio 5 M. Se dejó incubando dos horas a 20°C para la precipitación del ARN y se centrifugó a 13,000 x g por 20 minutos a 4°C. Después se lavó el precipitado dos veces con etanol al 70%, se dejó secar por 5 minutos y finalmente se resuspendió en 20 µl de agua libre de RNAsas tratada con DEPC (Sambrook y Russell, 2000).

Para visualizarlo en gel, se analizó 0.500 µg de ARN por electroforesis en condiciones desnaturizantes en gel de agarosa/MOPS, para verificar que el ARN estaba íntegro (Fourney et al., 1988). Para preparar el gel de agarosa /MOPS se pesó 1 g de agarosa y se mezcló con 10 mL de MOPS 10X + 87 mL de agua DEPC; se disolvió la agarosa con calor y se dejó enfriar a 50°C. Luego se agregaron 5.1 mL de formaldehído y se mezcló bien, para finalmente vaciar en el molde del gel y analizar el ARN por electroforesis. El gel fue visualizado al teñirse con bromuro de etidio y se fotografió con un fotodocumentador digital (Kodak DS DC120).

Además del análisis por electroforesis se realizaron reacciones de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) utilizando el ARN como molde para verificar que no había de ADN genómico residual en las muestras. Esto se pudo llevar a cabo ya que se utilizan iniciadores específicos para un gen conocido y su amplificación es posible solamente a partir de ADN. Las reacciones de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% para verificar que no hubo producto de PCR amplificado cuando se utilizó ARN como molde. El gel se tiñó con bromuro de etidio para teñir los productos de PCR y visualizarse en el fotodocumentador digital.

### **VI.3. Síntesis de ADNc**

Para la síntesis de ADNc se utilizó la transcriptasa reversa de Super Script III (Invitrogen) y los adaptadores 5PRIMA (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCA GAGTACGCGG-3') y 3PRIMA (5'-GCTCGCGAGCGCGTTTAAACGGCGACGCG TTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3'). El protocolo que se siguió fue el siguiente: se mezcló 1.5 µg de ARN, 1 µl del iniciador 3PRIMA 50 µM, 1 µl de dNTP's 10 mM y se llevó el volumen a 10 µl con agua DEPC. Posteriormente, se incubó a 65°C por 5 minutos y se enfrió en hielo por un minuto. Después se realizó la mezcla de síntesis de ADNc, utilizando para una reacción 2 µl de buffer RT 10X, 4 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µl de DTT 0.1 M, 1 µl de RNase OUT (40 U/µl) y 1µl de Super script III RT (200 U/µl). Se añadió 10 µl de la mezcla de síntesis de ADNc a la mezcla de ARN-3PRIMA (iniciador), se mezcló suavemente y se incubó por 50 minutos a 50°C. Al

término, se colocaron las muestras a 85°C por 5 minutos y se mantuvieron en hielo. Se colectaron las muestras por centrifugación y se le añadió 1 µl de RNase H en cada tubo y se incubó por 20 minutos a 37°C. Finalmente, se almacenó el ADNc a -20°C. Para probar los ADNc se hizo una reacción de PCR utilizando iniciadores para un gen conocido, con condiciones ya estandarizadas y se analizó en un gel de agarosa/TBE. El gel se tiñó con solución de bromuro de etidio y posteriormente se paso a la visualización en el fotodocumentador digital (Sambrook y Russell, 2000)

#### **VI.4. Diseño de Iniciadores**

Se diseñaron iniciadores específicos en base a una clona parcial para la ANS, se diseñaron con el fin de amplificar hacia el extremo 5' UTR. Además se realizó un iniciador específico a partir de ATG inicial de la secuencia nucleotídica para ANS en *Vitis amurensis* (ACN38270.1). El diseño del iniciador basado en *V. amurensis* se propuso como una alternativa para la clonación hacia el extremo 5'UTR, ya que las secuencias de ANS en otras plantas son similares en esta región. Los iniciadores específicos se sometieron a un análisis de oligonucleótidos con un programa en línea de Sigma Aldrich (<http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp>). El programa evalúa los iniciadores siguiendo los parámetros: temperatura de disociación donde es preferible que no sea mayor a 60°C y no menor a 50°C, el porcentaje de GC que sea entre 45% y 55%. Lo anterior se debe a que G y C se unen mediante tres puentes de hidrógeno en su estructura por lo que requiere mayor energía/calor para separar de la hebra de ADN, en donde a mayor porcentaje de G-C se obtiene mayor temperatura de disociación. La presencia de dímeros y estructuras secundarias haría una imposible unión de los iniciadores hacia la cadena de ADN, en este caso ADNc. Los iniciadores se sintetizaron en la casa comercial IDT (San Diego, CA, USA).

#### **VI.5. Amplificación de Fragmento de Antocianidin Sintasa por PCR**

Se tomó el ADNc preparado a partir de tejidos de mango (*Mangifera indica* L.) como molde en las reacciones de PCR. Para los componentes de la reacción se utilizó el “Go Taq Green Master mix 2X” (Promega, México D.F.), que contiene todo lo necesario para la reacción con excepción de los iniciadores y el templado. De acuerdo a las indicaciones del sistema, las mezclas de reacción se prepararon como sigue: 12.5 µl de Go Taq Green Master mix 2X, 0.25-2.5 µl de iniciador sentido, 0.25-2.5 µl de iniciador antisentido, 1-5 µl de templado y se llevó con agua

milli Q a un volumen de 25  $\mu\text{L}$ . Se utilizaron diferentes condiciones de PCR para la obtención de un producto de amplificación, siguiendo los parámetros de desnaturalización, y variando la temperatura de alineación de iniciadores, extensión y elongación.

Las reacciones de PCR, se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% preparado con TBE (Tris-Borato-EDTA) como solución amortiguadora. En el gel, se tiñó el ADN con bromuro de etidio o con Tinción GelRed (Biotium, México, D.F.) y se procedió a documentar el resultado utilizando un fotodocumentador digital.

## VI.6. Clonación

Para la clonación se ligaron las amplificaciones obtenidas por PCR a un vector pCR 2.1 (Invitrogen, Carlsband, CA, USA) utilizando 3  $\mu\text{L}$  del producto de PCR, 1  $\mu\text{L}$  (50 ng) del vector pCR2.1 utilizando 1  $\mu\text{L}$  de ADN ligasa (3U/  $\mu\text{L}$ ) y 5  $\mu\text{L}$  de buffer de ligación 2X, en una reacción de 10  $\mu\text{L}$ . Esta mezcla se dejó incubando a 4°C toda la noche para posteriormente transformar las células *Escherichia coli* TOP10. En caso de que el producto de PCR no fuese ligado el mismo día de la obtención, se aplicó un procedimiento de “refreshing”, el cual consiste en agregar una adenina (A) adicional en los extremos del producto de PCR para asegurar su ligación al vector. Para lo anterior se agregó 1  $\mu\text{L}$  de dATP y 0.2  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerasa a 5  $\mu\text{L}$  de la reacción de PCR y se incubó a 95°C por 5 minutos y después a 72°C por 5 minutos.

De la reacción de ligación, se mezclaron 4  $\mu\text{L}$  con 50  $\mu\text{L}$  de células de *E. coli* TOP10, para la transformación bacteriana con la inserción del plásmido. La mezcla se colocó en hielo por 30 min, seguido de un baño a 42 °C por 1 minuto, inmediatamente después se transfirió de nuevo al hielo. Pasado un tiempo se agregaron a la reacción 250  $\mu\text{L}$  de medio SOC (5  $\text{gL}^{-1}$  de extracto de levadura, 20  $\text{gL}^{-1}$  de triptona, 0.584  $\text{gL}^{-1}$  de NaCl, 0.186  $\text{gL}^{-1}$  de KCl, 0.952  $\text{gL}^{-1}$  de  $\text{MgCl}_2$  y 3.6  $\text{gL}^{-1}$  de glucosa) a temperatura ambiente; se agitó horizontalmente durante una hora a 37°C a 225 rpm. Después se colocaron 200  $\mu\text{L}$  y 100  $\mu\text{L}$  aproximadamente de cada cultivo bacteriano a placas agar-LB con ampicilina (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), en presencia del sustrato X-gal 40 mM (5-boemo-4cloro-3indolil-beta-D-galactosido). Se esperó a que fuese absorbido el cultivo y se incubó invertido por 18 horas a 37°C. Para la selección de clonas recombinantes se utilizó el sistema de selección de colonias blancas y azules. Las colonias azules corresponden a las células transformadas con el vector que lleva el gen de la  $\beta$ -galactosidasa funcional y dicha enzima produce el color azul característico al reaccionar con el sustrato X-gal. Las colonias blancas corresponden a las células transformadas con el vector que lleva insertado un ADN (amplicón)

interrumpiendo el gen de la  $\beta$ -galactosidasa, la cual no es funcional por la inserción del fragmento de ADN de interés dentro del mismo (Sambrook y Russell, 2001).

Para la obtención de minipreparaciones de ADN plasmídico de las colonias transformadas, se utilizó el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001). Se inocularon colonias blancas de *E.coli* transformadas en 3 mL de caldo LB + 3  $\mu$ L Ampicilina ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y se dejaron incubando a  $37^\circ\text{C}$  con agitación a 225 rpm durante toda la noche (18 horas). Posteriormente, se centrifugó 1.5 mL del cultivo de células a  $10,000 \times g$  por 5 min (centrifuga Eppendorf 5417C), se descartó el sobrenadante, se repitió el procedimiento con el resto del cultivo (Sambrook y Russell, 2001).

El precipitado bacteriano se resuspendió en 250  $\mu$ L de solución I (2 mL de EDTA 0.5 M a pH 8, 2.5 mL de Tris-HCl 1 M a pH 8 y 10 mL de glucosa 0.5 M, aforando esta mezcla a 100 mL) formando una mezcla homogénea. Después se agregaron 250  $\mu$ L de solución II recién preparada (500  $\mu$ L de NaOH 2N, 500  $\mu$ L de SDS 10% y 4 mL de agua estéril), se mezcló por inversión 5 veces y se dejó incubando en hielo por 10 min. Posteriormente se le adicionó 250  $\mu$ L de solución III refrigerada (30 mL de acetato de potasio 5 M, 5.75 mL de ácido acético glacial y 14.25 mL de agua estéril), se mezcló por inversión 5 veces y se incubó en hielo por 5 min (Sambrook y Russell, 2001).

La mezcla se centrifugó por 10 min a  $12,000 \times g$ , y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Se agregaron 500  $\mu$ L de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló en el vórtex, después se centrifugó la mezcla a  $12,000 \times g$  por 30 min, y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó dos veces con 300  $\mu$ L etanol frío al 70%, se centrifugó por 3 minutos y se removió el etanol. Finalmente, el pellet se dejó secando a temperatura ambiente, y se resuspendió en 50  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$  milli Q estéril, y se le agregó 1  $\mu$ L de RNasa ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ). La mezcla se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 30 min, al término de este tiempo la mezcla se colocó en hielo para inactivar la enzima RNasa (Sambrook y Russell 2001).

Se cuantificó la concentración de ADN plasmídico por espectrofotometría en un NanoDrop ND-1000 UV-Vis, en donde se midió la absorbancia 260 nm y 280 nm. La pureza de la muestra se determina mediante la relación  $A_{260}/A_{280}$ : donde una relación de 1.8 a 2.0 corresponde a un ADN puro (Sambrook y Russell 2001).

Para poder verificar la presencia del inserto en la clonas positivas, se realizaron digestiones con la enzima de restricción *EcoRI*, que flanquea los sitios de inserción en el vector. Utilizando las minipreparaciones de ADN plasmídico como muestra, se mezcló 2  $\mu$ g del ADN plasmídico, 1  $\mu$ L de buffer H 10X, 3.6 U de enzima *EcoRI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), y se aforó a 10  $\mu$ L con agua milli Q. Las reacciones se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por una hora

(Sambrook y Russell 2001). Posteriormente, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% para visualizar las bandas referentes a los insertos en los plásmidos de PCR2.1, por medio de tinción con GelRed y posterior vista al fotodocumentador digital.

### **VI.7. Secuenciación y Análisis de Secuencias**

Los plásmidos recombinantes se limpiaron con el protocolo para desalar y concentrar soluciones de ADN de Qiaex II (QIAGEN, Valencia, CA, USA). El ADN obtenido se re-suspendió y una vez limpias las muestras de ADN plasmídico se determinó su concentración en el espectrofotometro Nanodrop ND 1000 y se prepararon. Se enviaron a secuenciar al Laboratorio de Secuenciación de la Universidad de Arizona (Tucson, AZ, USA). La concentración de las muestras fue de  $200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  en  $10 \mu\text{L}$ , las cuales fueron secuenciadas con los iniciadores universales M13Fw y M13Rv.

El análisis de secuencias nucleotídicas consistió primeramente en localizar los sitios de restricción correspondientes al corte de la enzima *EcoRI*, es decir GAATTC para cada una de las muestras. Posteriormente, para la identificación de la secuencia resultante, esta se analizó utilizando el algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990) en las bases de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Se utilizó el algoritmo CLUSTALW para el alineamiento de las secuencias obtenidas, así como para su comparación con otras secuencias reportadas en la base de datos GenBank del NCBI. Para la identificación del marco de lectura abierto se utilizó un algoritmo de traducción en los 6 posibles marcos de lectura abiertos (<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/translate/>), con lo cual se obtuvo la secuencia deducida de aminoácidos.

### **VI.8. Modelación de Estructura de Antocianidin Sintasa**

Para obtener un modelo de la estructura tridimensional de la secuencia de aminoácidos de ANS de mango, se realizó por medio del programa MOE (Molecular Operating Environment), utilizando como templado una ANS de *Arabidopsis thaliana* (PDB 1PG4), la cuál es 80% idéntica a la secuencia aminoacídica de ANS de mango. Posteriormente, los datos obtenidos en el programa MOE, se transfirieron al programa PyMOL (<http://pymol.org/>), en el cuál se visualizó la estructura de la enzima.

## VI.9. Dendograma de Secuencias de Antocianidin Sintasa

Se construyó un análisis de conglomerados, en donde se comparó la secuencia nucleotídica en el programa MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (Tamura et al., 2011), el cual cuenta con diversos algoritmos para la realización de árboles. Para obtener el dendograma, primeramente se obtuvieron las secuencias nucleotídicas para ANS de las siguientes especies: *Nicotiana tabacum* (AB723683.1), *Fragaria x ananassa* (JX134095.1), *Pyrus pyrifolia* (GU390546.1), *Paeonia lactiflora* (JQ070805.1), *Camellia chekiangoleosa* (JN944577.1), *Vaccinium corymbosum* (JN654701.1), *Dahlia pinnata* (AB591830.1), *Brassica juncea* (EU927146.1), *Arabidopsis thaliana* (JF681791.1), *Prunus salicina* var. *cordata* (JN560957.1), *Gynura bicolor* (AB550241.1), *Prunus avium* (GU990529.1), *Fagopyrum esculentum* (HM149791.1), *Brassica rapa* var. *purpuraria* (GQ120562.1), *Pericallis cruenta* (EU810806.2), *Malus hybrid* cultivar (FJ817488.1), *Solanum tuberosum* (HQ337900.1), *Lactuca sativa* (AB525912.1), *Saussurea medusa* (AY547342.1), *Citrus sinensis* (AY581048.1), *Dimocarpus longan* (FJ479616.1), *Theobroma cacao* cultivar *scavina* 6 (GU324350.1), *Garcinia mangostana* (FJ197133.1), *Vitis vinifera* (EU156063.1) del banco de genes del NCBI.

## VII. RESULTADOS

### VII.1. Extracción de ARN Total

Se realizó la extracción de ARN total de hoja, mesocarpio, epicarpio y embrión, en donde se cuantificó cada muestra y se obtuvo en promedio una concentración de  $159 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$  de ARN en las muestras. Después de la digestión con DNAsaI se volvió a cuantificar quedando las muestras de ARN a una concentración de  $134.7 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ . Por lo tanto, en los  $20 \mu\text{L}$  totales se obtuvieron  $2,694 \text{ ng}$  de ARN total obtenido de cada tejido, con una relación de absorbancia  $^{260}/_{280}$  de 1.96, la cual indica que el ARN estaba puro. En la corrida electroforética se cargaron  $0.5 \mu\text{g}$  de ARN total por lo que se tomaron  $3.7 \mu\text{L}$  de los  $20 \mu\text{L}$  totales de ARN. En la figura 7 se observan las bandas del ARNr lo cual es indicativo de un ARN integro, y no se observó barrido que es indicativo de ARN degradado.

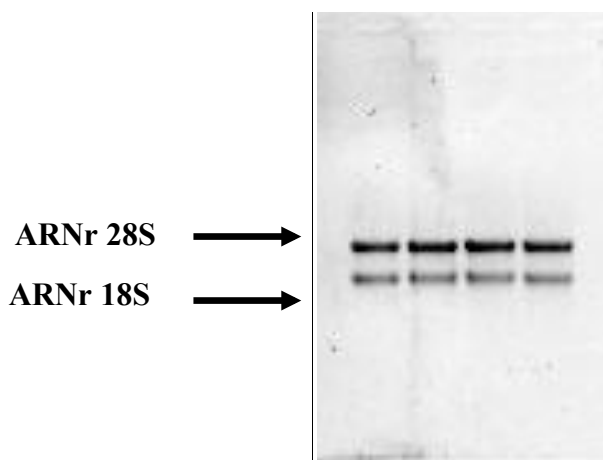


Figura 7. Electroforesis en gel agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes para ARN total de *Mangifera indica*. Se observan las dos bandas características del ARN ribosomal correspondientes a las subunidades 28S y 18S.

## VII.2. Purificación y Análisis de ARN Total

Se realizaron reacciones de PCR utilizando el ARN en lugar de ADN como molde, utilizando 100 ng de la muestra de ARN total como templado. Además, se utilizaron iniciadores que amplifican un fragmento de 550 pb para amplificación a partir de ADN genómico, utilizados como reacciones control establecidos en el laboratorio. Se utilizó un programa con una temperatura de hibridación de 50°C. El resultado fue satisfactorio ya que no se observó producto de amplificación en las reacciones donde el ARN era el molde (carril 3) (Figura 8). Lo anterior es una prueba de que la muestra de ARN no estaba contaminada con ADN genómico. En las reacciones de PCR control donde el templado fue ADN genómico si hubo amplificación (carril 2), mientras que en el control negativo no hubo amplificación (carril 4).

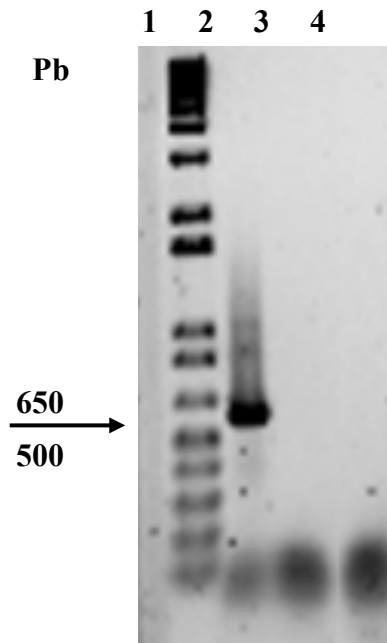


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, reacciones de PCR prueba de ADN genómico. Se observa el carril 1, estándar de peso molecular; carril 2, amplificación de 550 pb con ADN genómico como molde (control positivo); carril 3, amplificación con ARN total como molde y carril 4, amplificación sin molde (control negativo).



### VII.3. Síntesis de ADNc

El ADNc se utilizó en reacciones de PCR, y se diluyó 1:10, 1:100 y 1:1000; la primera fue realizada con iniciadores estandarizados para una amplificación de un producto de 150 pb, mientras que las demás fueron iniciadores para amplificar un producto de 250 pb. El resultado fue positivo, ya que se logró la amplificación en los tamaños esperados, por lo que se puede decir que la síntesis de ADNc fue eficiente (Figura 9). El ADNc obtenido (aproximadamente 50 ng, a partir de 1000 ng de ARN total) fue suficiente para amplificar el ADN de prueba aún cuando se diluyó 1:1000. Los ADNc sintetizados se utilizaron posteriormente como ADN molde en la clonación de ANS. Lo anterior habla de la buena calidad del ARN total obtenido, la cuál es un factor muy importante cuando se sintetiza ADNc.

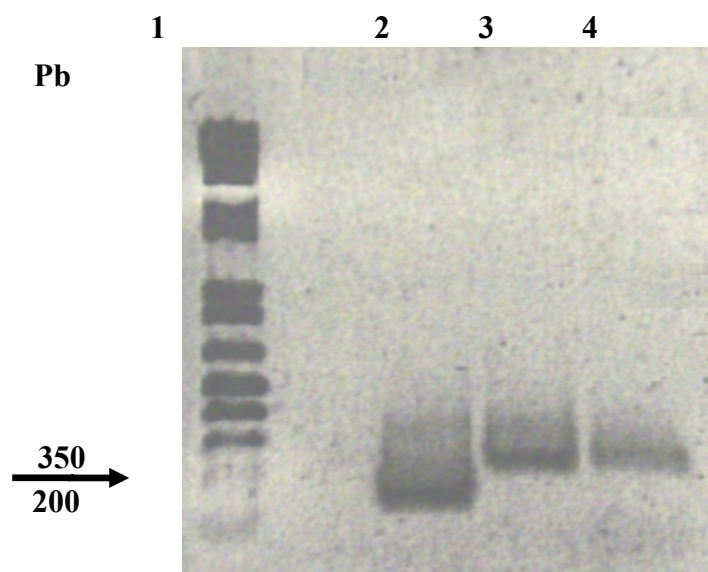


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, de los productos amplificados de ADNc. Carril: marcador de peso molecular, carril 2: amplificación de 150 pb para la concentración 1:10 de ADNc de hoja; carril 3 y amplificación de 250 pb a una concentración de ADNc de 1:100 y 1:1000, respectivamente.

#### VII.4. Clonación de Antocianidin Sintasa

Se partió de una clona parcial para ANS obtenida de una genoteca de pulpa de mango (*Mangifera indica*) en el 2006, a cargo de la Dra. María Auxiliadora Islas Osuna. La clona se encontraba en el plásmido pCR2.1 y se utilizó en la transformación de *E. coli* para obtener ADN plasmídico en cantidad suficiente, para corroborar la secuencia nucleotídica que se tenía. Una vez que se obtuvieron clonas recombinantes se seleccionaron dos para enviarse a secuenciar ambas cadenas completas por duplicado y obtener las secuencias nucleotídicas libre de ambigüedades. La concentración de los minipreps para dichas muestras fueron las siguientes  $354.6 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$  y  $399.4 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$  y con una absorbancia en  $^{260}/_{280}$  de 1.88 y 1.87, respectivamente. Al analizarse las muestras por digestión se observó que el tamaño aproximado del fragmento insertado es de aproximadamente 700 pb. (Figura 10). Se nombró la secuencia nucleotídica parcial como ANS1.

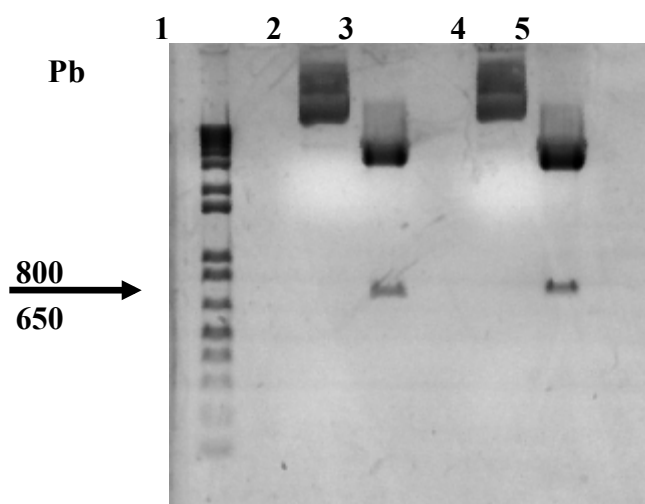


Figura 10. Análisis electroforético de la digestión de la clona parcial de ANS1 de mango (*Mangifera indica*). Carril 1: el marcador de peso molecular, carril 2 y 4: muestra de plásmido recombinante sin digerir, carril 3 y 5: plásmido digerido con el fragmento de ANS.

## VII.5. Análisis de Secuencias

Se analizaron las secuencias nucleotídicas de las dos cadenas de ANS1 (sentido y antisentido) de los dos clones seleccionados mediante el algoritmo BLAST, corroborándose su identidad con otras secuencias de ANS en otras plantas. La secuencia para ANS1 tiene un tamaño de 758 pb, de los cuáles 525 pb se traducen a 175 aa, 3 pb son el codón de terminación y 230 pb corresponde a la región no traducida 3' (3'UTR) en la que se encuentra la cola de Poli-A. Al analizar la secuencia aminoacídica (175 aa) deducida de la secuencia nucleotídica, se identificó un dominio conservado el cual es característico de la super familia 20G-FeII Oxy (pfam03171).

Al comparar la secuencia nucleotídica de ANS de mango con una secuencia de ANS de *Citrus sinensis* (AAT02642.1) de 1074 pb (357 aa) y comparar sus respectivas secuencias de aminoácidos deducidas, (la secuencia ANS1 es parcial y abarca desde el aminoácido 178 hasta el final de 351 aa), se encontró una identidad del 82% de la ANS de mango contra la ANS de naranja (*C. Sinensis*). Por lo anterior, podemos decir que al fragmento obtenido (ANS1), le hacen falta alrededor de 531 pb, codificando para 177 aminoácidos hacia el extremo 5' (amino terminal de la proteína). En la Figura 11, se puede observar la distribución de la secuencia nucleotídica de ANS1 obtenida en la comparación con la secuencia de *C. sinensis* para ANS.



Figura 11.-Distribución espacial de la secuencia de ANS1 para *Mangifera indica* en comparación con la secuencia de aminoácidos de ANS en *Citrus sinensis*.

## VII.6. Diseño de Iniciadores

El diseño de iniciadores específicos se realizó en base a la secuencia de ANS1 de mango obtenida, con el fin de avanzar hacia el extremo 5' de la región desconocida del gen. En la Tabla 2 se pueden observar los iniciadores antisentido diseñados para la amplificación hacia el extremo 5', así como sus características correspondientes, una combinación de estos con iniciadores sentido hizo posible clonar el extremo 5' del ADNc de ANS y a continuación se describe.

Tabla II. Iniciadores antisentidos para Antocianidin sintasa

Lon: Longitud, TM: Temperatura de fusión, E.S: Estructura secundaria, F.D: Formación de dímeros.

Iniciador	Iniciador antisentido 5'-3'	Lon	TM °C	%GC	E.S.	F.D.
CAAGCTTCTTCCGGAGAC	GTCTCCGGAAGAAGCTTG	18	60	55	Muy débil	No
GAAATCCTGAGCAATCGC	GCGATTGCTCAGGATTTTC	18	60.9	50	No	No
CTAAATGCCCTCAACCAG	CTGGTTGAGGGCATTTAG	18	58	50	No	No

## VII.7. Clonación hacia el Extremo 5 del ADNc de Antocianidin Sintasa

En la obtención de las secuencias nucleotídicas hacia el extremo 5' para ANS, se utilizaron ADNc de varios tejidos del fruto de mango (*Mangifera indica*), como mesocarpio, embrión y epicarpio, así como de hoja. Se probaron varias alternativas para avanzar hacia el 5'UTR, una de ellas fue la utilización de un iniciador dentro del adaptador 5'PRIMA, con la cual no se obtuvo el resultado esperado. Por lo que se utilizó el iniciador específico para ANS, diseñado en base a la secuencia de *Vitis amurensis*. El iniciador fue el siguiente 5'- ATGGTGACTTCAGTGGCTC-3', el cual tiene las siguientes características: longitud de 19 pb, una temperatura de alineamiento de 60 °C, con un porcentaje de GC de 52 y no forma estructura secundaria ni dímeros.

Se realizó un PCR con las siguientes condiciones: 95°C por 10 minutos, 95°C por 1 minuto, 50°C por 1 min (+ 0.5 por ciclo), 72°C por 1, ir al paso 2 por 19 veces, 94°C por 1 min, 57°C por 1 min, 72°C por 1 min, ir al paso 6 por 9 veces, 72°C por 1 min. 4°C tiempo indefinido. Se utilizaron los iniciadores específicos de ANS1 parcial y el iniciador específico para ANS con base en la secuencia nucleotídica de *Vitis amurensis*. Donde se obtuvo un fragmento de alrededor

de 800 pb con el iniciador antisentido 5'GCGATTGCTCAGGATTTC 3' (Figura 12); la amplificación fue ligada, transformada y dos clones recombinantes obtenidos se enviaron a secuenciar con los iniciadores M13 Fw y M13 Rv. Se obtuvo una secuencia nucleotídica que incluye el codón ATG inicial y alinea con ANS de varias especies vegetales. Lo anterior se observó al analizar las secuencias obtenidas por medio del algoritmo BLASTX, y se nombró esta secuencia parcial como ANS2.

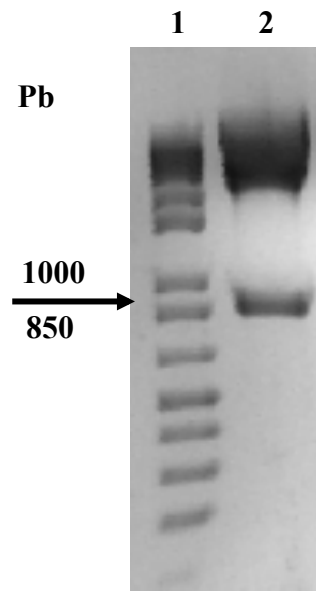


Figura 12. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión de la clona parcial ANS2. Carril: se observa el marcador de peso molecular, carril 2: el plásmido recombinante digerido con el fragmento de 800 pb liberado.

## VII.8. Ensamble de Secuencias

La secuencia ANS2 se comparó por medio de un algoritmo ClustalW con la secuencia ANS1, observándose que se alinean en una región de aproximadamente 300 pb que es idéntica entre ellas. La región de empalme se ubica al inicio de la clona ANS1 y al final de la clona ANS2, lo que significa que ambas son parte de un mismo gen, en éste caso ANS. En base a este resultado se realizó un ensamble de secuencias (Figura 13), resultando en un ADNc de 1056 pb y se nombró MiANS.

La secuencia nucleotídica MiANS fue traducida a una secuencia aminoacídica de 351 residuos y se muestra en la Figura 14. En la figura se puede identificar el codón ATG de inicio (sombreado en negritas), el codón TAA de terminación (sombreado gris), la región 3'UTR y la cola Poli-A (en negritas y subrayada).

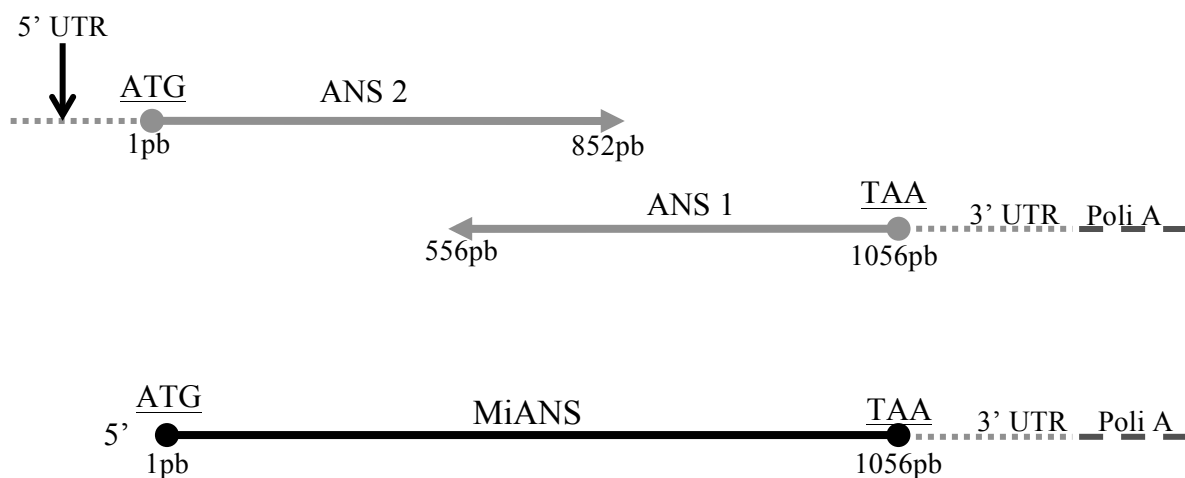


Figura 13. Esquema del ensamble de secuencias ANS1 y ANS2. Se muestran las dos secuencias parciales para ANS, obteniendo la secuencia completa de MiANS.

1 M V T S V A P R V E S L S S S G I Q A I  
1 **ATG**GTGACTTCAGTGGCTCCTCGAGTCGAGAGTTTGTCCAGCAGTGGGATTCAAGCAATC  
21 P K E Y V R P Q E E L T S I G N V F E E  
61 CCAAAGAATATGTTTCGCCACAGGAAGAGCTAACCCAGCATCGGCAACGTTTTTTGAAGAA  
41 E K K E E G P Q V P T M N L K E I D A E  
121 GAAAAGAAAGAAGAGGGCCCTCAGGTTCCCACCATGAATCTTAAGGAAATCGATGCAGAG  
61 D P V V R E K C R E Q L K K A A M D W G  
181 GACCCAGTGGTTCGTGAGAAGTGCAGGGAACAGCTAAAAAAGCTGCGATGGATTGGGGC  
81 V M H L V N H G I P D E L I E R V K K A  
241 GTGATGCACCTTGTTAACCATGGGATTCTGATGAGCTTATTGAGCGTGTGAAGAAAGCG  
101 G E A F F E L P L E E K E K Y A N D Q V  
301 GGGGAGGCGTTCTTTGAGCTTCTCTTGAGGAGAAAGAGAAATATGCAAACGACCAGGTC  
121 S G K I Q G Y G S K L A N N A S G Q L E  
361 TCTGGGAAGATTCAAGGCTATGGAAGCAAGCTAGCGAATAATGCTAGTGGGCAGCTTGAA  
141 W E D Y F F H L I F P E D K R D L S I W  
421 TGGGAGGATTATTTCTTCCATCTTATTTTCCCTGAAGATAAGAGGGATTTGTCAATTTGG  
161 P K Y P A D Y T V A T S E Y A K L L R G  
481 CCGAAGTACCCAGCTGACTACACAGTGGCGACTAGCGAATATGCAAAGCTACTTAGAGGC  
181 L A T K I M A V L S I G L G L E E G R L  
541 CTGGCTACCAAATTTATGGCAGTGTATCAATTGGGTTGGGATTGGAAGAGGGAAGGTTG  
201 E K E V G G I E E L L L Q M K I N Y Y P  
601 GAAAAGAAGTTGGAGGAATTGAAGAAGCTTCTCCTTCAAATGAAGATCAACTACTATCCT  
221 K C P Q P E L A L G V E A H T D V S A L  
661 AAATGCCCTCAACCAGAAGCTGGCTCTTGGTGTGGAGGCTCACACAGACGTTAGTGCTCTC  
241 T F I L H N M V P G L Q L F Y E E K W V  
721 ACCTTCATCCTCCACAACATGGTTCCCGGCTGCAACTCTTCTATGAAGAGAAGTGGGTC  
261 T A K C V P N S I I M H I G D T I E I L  
781 ACTGCAAAGTGTGTTCCAAATTCTATCATCATGCACATTGGTGACACCATTGAAATCCTG  
281 S N R K Y K S V L H R G L V N K E K V R  
841 AGCAATCGCAAGTACAAGAGTGTCTTACAGGGGACTCGTTAACAAGGAGAAAGTCAGG  
301 I S W A V F C E P P K E K I V L K P L P  
901 ATTTTCGTGGGCTGTTTTCTGTGAGCCTCCGAAGGAAAAGATTGTCTCAAGCCTCTTCCG  
321 E T V S E T E P P L F P P R T F Q Q H I  
961 GAGACTGTGTCGGAGACAGAGCCTCCACTGTTCCCTCCTCGCACCTTTCAGCAGCATATT  
341 E H K L F R K A Q E S -  
1021 GAGCACAAGCTGTTTAGGAAGGCTCAAGAAAGTT**TAA**TGCGTGGTGGTTCATATGCTGTT  
1081 ATTTTATATGTTTTATGTTAAGATGTTTATAAGCACGGTGTCCGTGTGAATGCTTTAAC  
1141 TGTGGCAGGTAGAGACCATAGTGTATGATTGCTTTCTTGAATAATAAGTCTCATTATATT  
1201 GTTCTTTACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 14. Secuencia nucleotídica y secuencia aminoacídica deducida de MiANS. Producto del ensamble de las secuencias parciales ANS1 y ANS2. Iniciando con la metionina inicial, identificando el codón de terminación, la región 3'UTR y la cola poli A.

## VII.9. Análisis Comparativo de Secuencias Aminoacídica de Antocianidin Sintasa

Se realizó un alineamiento comparativo de la ANS de *Mangifera indica* (MiANS) con ANS de diferentes frutos: *Vitis vinifera* (ABV82967.1), *Citrus sinensis* (AAT02642.1), *Dimocarpus longan* (ACK76231.1), *Theobroma cacao* (ADD51356.1), *Garcinia mangostana* (ACM62747.1). En este alineamiento se observó que MiANS presenta un porcentaje de identidad de 87% con *D.longan* y *V. vinifera*, seguido por *T. cacao* con 86%, posteriormente *C. sinensis* y *G. mangostana* con 85% y 81%, respectivamente.

<i>M. indica</i>	1	MVTSVAPRVESSLSSSGIQAIIPKEYVRPEELTSSIGNVFEEKKKEEGPQVPTIDLKEIDAE
<i>T. cacao</i>	1	MVTSMAPRVESSLASSGIQSIIPKEYIRPEELTSSIGNVFEEKKKEEGPQVPTIDLKEIDSE
<i>C. sinensis</i>	1	MVTPTARRVESLARSGIQAIIPKEYVRPEELMGIGNVFEEKKKEEGPQVPTIDLKEIDSE
<i>D. longan</i>	1	MVTSVAPRVESSLSSSGIQSIIPKEYVRPEELTSSIGNVFEEKKRDEGPQVPTIDLKEIDSE
<i>V. vinifera</i>	1	MVTSVAPRVESSLSSSGIQSIIPKEYIRPEELTSSIGNVFEEKKKEEGPQVPTIDLKDIPESE
<i>G. mangostana</i>	1	MVTSVAPRVESSLASSGIQCIIPKEYIRPEELTNLGNIFEQEKKEEGPQVPTIDLEGIVSE
<i>M. indica</i>	61	DPVREKCRRELKKAAMWGVMLVNHGTPDELIERVKKAGEAFFELPTEEKEKYANDQV
<i>T. cacao</i>	61	DREVRECRQELKRAATEWGVMLVNHGTSDELMEVKKAGQKFFELSVEEKEKYANDQT
<i>C. sinensis</i>	61	DRVEREKCREELKKAAMWGVMLVNHGTSDELTERVKKRAGQAFFDQPVVEEKEKYANQQA
<i>D. longan</i>	61	DQVREKCRRELKQAAMWGVMLVNHGTSDELMDKVRGAGQAFFNLPVEEKEKYANDQA
<i>V. vinifera</i>	61	DEVREKCRRELKKAAMWGVMLVNHGTSDELINRVKVAGETFFNLPVEEKEKYANDQA
<i>G. mangostana</i>	60	DKEVRDKCDELKKAAMWGVMLVNHGTSNELTEKVKIAGEAFFQLPTEEKEKYANDQG
<i>M. indica</i>	121	SGKIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHLIHPEDKRDLSIWPKYPADYVAITSEYAKLLRG
<i>T. cacao</i>	121	LGKIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHLVYPEDKRDLSIWPKTPSDYTEVTSEYARQLRV
<i>C. sinensis</i>	121	SGKIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHLIYPEDKRDMSIWPKTPSDYTEATSEYARQLRS
<i>D. longan</i>	121	SGNVQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHLIYPEDKRDLSIWPKTPKDYIEVTSEYARQLRS
<i>V. vinifera</i>	121	SGKIAGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHLIHPEDKRDMSIWPKTPSDYVPAITSEYSVKLRS
<i>G. mangostana</i>	120	SGMIQGYGSKLANNASGRLEWEDYFFHLVPEPKRDLSIWPKTPSDYIEVTSEYARQLRA
<i>M. indica</i>	181	LATKIMAVLSLGLGLEEGRLEKEVGGIEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSAL
<i>T. cacao</i>	181	LASKIISALSICLGLLEEGRLEKEVGGIEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSAL
<i>C. sinensis</i>	181	LATKIIVAVLSLGLGLEEGRLEKEVGGIEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSAL
<i>D. longan</i>	181	LATKIIVAVLSLGLGLEEGRLEKEVGGIEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSAL
<i>V. vinifera</i>	181	LATKIIVAVLSLGLGLEEGRLEKEVGGIEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSAL
<i>G. mangostana</i>	180	LATKIIVAVLSLGLGLEEGRLEKEVGGIEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSAL
<i>M. indica</i>	241	TFILHNMVPGQLQFYEGKVVTAACVPSNIIMHIGDTIEILSNRKYKSVLHRGLVNKEKVR
<i>T. cacao</i>	241	TFILHNMVPGQLQFYEGKVVTAACVPSNIIMHIGDTVEILSNGKYKSVLHRGLVNKEKVR
<i>C. sinensis</i>	241	TFILHNMVPGQLQFYKDKVVTAACVPSNIIMHIGDTIEILSNGEYKSVLHRGLVNKEKVR
<i>D. longan</i>	241	TFILHNMVPGQLQFYEGKVVTAACVPSNIIMHIGDTIGILSNGKYKSVLHRGLVNKEKVR
<i>V. vinifera</i>	241	TFILHNMVPGQLQFYEGKVVTAACVPSNIIMHIGDAIEILSNGKYKSVLHRGLVNKEKVR
<i>G. mangostana</i>	240	TFILHNMVPGQLQFYEGKVVTAACVPSNIIMHIGDTIEILSNGKLSILHRGLVNKEKVR
<i>M. indica</i>	301	ISWAVFCEPPKDKIILKPLPETVSETEPPIFPFRFTFQQHIEHKLFRKQAQ-----S
<i>T. cacao</i>	301	ISWAVFCEPPKDKIILKPLPETVSETEPPIFPFRFTAQHIHKLFRKTAQGL----SN
<i>C. sinensis</i>	301	ISWAVFCEPPKDKIILKPLPETVSETEPPIFPFRFTFQQHIEHKLFRRTQDAIILS-DEE
<i>D. longan</i>	301	ISWAVFCEPPKDKIILKPLPETVSETEPPIFPFRFTFQQHIEHKLFRKTAQDAIILN-QQS
<i>V. vinifera</i>	301	ISWAVFCEPPKDKIILKPLPETVSETEPPIFPFRFTFSQHIHKLFRKTAQDAIILS---K
<i>G. mangostana</i>	300	ISWAVFCEPPKDKIILKPLPELVSETEPPIFPFRFTFSQHIHKLFRKTAQDAIILS---PN

Figura 15. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de ANS de diferentes especies con MiANS por medio del algoritmo ClustalW. En negro se marcan los aminoácidos idénticos y en gris los aminoácidos del mismo tipo químico.



Se realizó un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de ANS de las especies *Vitis vinifera*, *Citrus sinensis*, *Dimocarpus longan*, *Theobroma cacao*, *Garcinia mangostán*, *Arabidopsis thaliana* y *Mangifera indica*, por medio de ClustalW. Las secciones conservadas se tomaron con base en los estudios de Wilmouth et al., (2002) sobre ANS de *A. thaliana*. Dentro de la ANS de *Mangifera indica* y de las ANS de las otras especies del alineamiento, se observan las regiones conservadas en la estructura primaria de la antocianidin sintasa reportadas para la ANS de *A. thaliana*. Se propone que éstas regiones están involucradas en la formación de la interacción electrostática entre el C5 de las 2 oxoglutarato dioxigenasa dependiendo de Fe II, la cual se define por un residuo conservado de Arginina (residuo 300, según la secuencia *A. thaliana*). Además se observa un lazo largo desde el aminoácido 310 al 322, respecto a la numeración de ANS de *A. thaliana* (Figura 16) observándose subrayado en zigzag y sombreado. Por otra parte, Wilmouth et al. (2002) mencionan que existe un complejo del átomo Fe (II); 20G;DHQ que demuestra que el hierro está ligado en una geometría casi octaédrica por la cadena lateral de His (234), His (290) y Asp (237). Además poseen los residuos conservados, los que intervienen en la catálisis de la enzima.

```

T.cacao      LASKI LSALS LCLGLEEGRLEKEVGGLEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSAL 240
G.mangostana LATAK VLSALS LCLGLEEGRLEKEVGGIEELALQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSAL 239
M.indica     LATKIMAVLS IGLGLEEGRLEKEVGGIEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSAL 240
V.vinifera  LATKILSVLS LGLGLEEGRLEKEVGGMEELLQKKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSAL 240
D.longan    LATKILSVLS LGLGLEEGRLEKEVGGLEELLQMKINYYHPKCPQPELALGVEAHTDVSAL 240
C.sinensis  LATKILAVLS LGLGLEEGRLEKEVGGLEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSAL 240
A.thaliana  LATKVFKALS IGLGLEPDRLEKEVGGLEELLQMKINYYPKYQPELALGVEAHTDVSAL 238
**:*:: .**: **** .*****:*** ** *****:* *******■□*

T.cacao      TFI LHMV PGLQLFYEGKWI TAKCV P NSIIMHIGDTVEILSNGKYKSI LHRGLVNKEKVR 300
G.mangostana TFI LHMV PGLQLFYEGEWV TAKCV P NSIIMHIGDTLEILSNGKLSI LHRGVVNKEKVR 299
M.indica     TFI LHMV PGLQLFYEEKWV TAKCV P NSIIMHIGDTLEILSNRKYKSV LHRGLVNKEKVR 300
V.vinifera  TFI LHMV PGLQLFYEGKWW TAKCV P NSIIMHIGDAIEILSNGKYKSI LHRGLVNKEKVR 300
D.longan    TFI LHMV PGLQLFYEGKWW TAKCV P NSIIMIIGDTIGILSNGKYKSI LHRGLVNKEKVR 300
C.sinensis  TFI LHMV PGLQLFYKDKWV TAKCV P NSIILHIGDTLEILSNGEYKSI LHRGLVNKEKVR 300
A.thaliana  TFI LHMV PGLQLFYEGKWW TAKCV P DSIVMHIGDTLEILSNGKYKSI LHRGLVNKEKVR 298
*****: .*:*****:***: ****: ***** : **:*■*:*****●

T.cacao      ISWAVFCEP PKK I I L K P L P E T V S E T E P P L F F P R T F A Q H I H H K L F R K T Q D G L S N --- 354
G.mangostana ISWAVFCEP PKDK I I L K P L P E L V S E T E P P M F F P R T F S Q H I Q H K L F R K N Q D D V G P N --- 354
M.indica     ISWAVFCEP PKK I V L K P L P E T V S E T E P P L F F P R T F Q Q H I E H K L F R K A Q E S ----- 351
V.vinifera  ISWAVFCEP PKK I I L K P L P E T V S E T E P P L F F P R T F S Q H I Q H K L F R K T Q E A L L S K --- 355
D.longan    ISWAVFCEP PKK I I L K P L P E T V S E T E P P L F F P R T F Q Q H I Q H K L F R K T Q D A L L N K Q S - 357
C.sinensis  ISWAVFCEP PKDK I I L K P L P E T V S E O K P A M F F P R T F Q Q H I E H K L F R R T Q D A L L S D E E - 357
A.thaliana  ISWAVFCEP PKDK I V L K P L P E M V S V E S P A K F F P R T F A Q H I E H K L F G K E Q E E L V S E K N D 356
*●**□*□**:*:***** ** .*. *****○ **○.***○* : *:

```

Figura 16. Alineamiento de secuencias aminoacídicas para identificación de regiones conservadas, según lo reportado para ANS de *A. thaliana*, a partir del aminoácido 180. Los residuos de unión a hierro se reportan como cuadros negros, para las uniones de 20G, DQ1, DHQ2, se reportan círculo negro, cuadro blanco y círculo blanco, respectivamente. Se encuentra subrayada la región indicada como lazo largo.

## VII.10. Modelación Estructural de la Enzima MiANS

El modelo de la estructura tridimensional de MiANS se muestra en la Figura 17. La figura posee estructuras secundarias: hojas  $\beta$  en color amarillo y  $\alpha$  hélices en color rojo. En la figura se puede observar un conjunto de hojas betas formando la cavidad hidrofóbica que da lugar al sitio activo de la enzima, estas hojas forman la estructura “jelly roll” característica de las 2OG dioxigenasa dependiente de FeII, esta la forman la  $\beta 5$ - $\beta 12$ . En esta cavidad es donde interaccionan los residuos con el ion hierro. Los residuos del sitio activo se localizaron en base al estudio de Wilmouth et al. (2002), de la ANS de *Arabidopsis thaliana*, estos residuos están en base a la secuencia MiANS His 234, His 290 y Asp 236, los cuales se mantienen conservados en dichas secuencias. Además se observan dos estructuras  $\alpha$  hélice características de las 2OG dioxigenasas dependientes de FeII, las cuales corresponden a la  $\alpha 12$  que forma el “esqueleto” de la enzima y  $\alpha 17$  que forma una especie de tapa para la cavidad hidrofóbica.

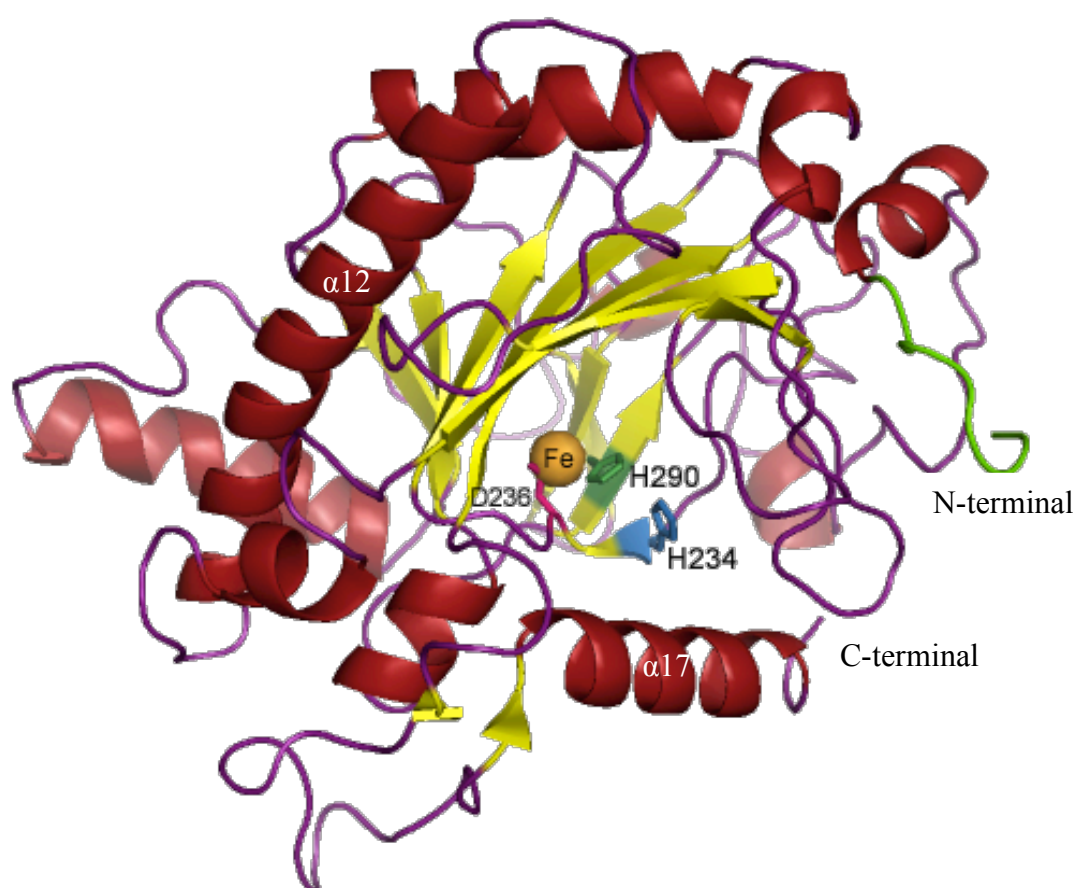


Figura 17. Modelo estructural de la MiANS de mango (*Mangifera indica*). Se señalan el amino terminal (N-terminal) y carboxilo terminal (C-terminal) de la enzima. Además de los residuos en el sitio activo.

## VII.11. Dendograma de Secuencias Aminoacídicas de Antocianidin Sintasa

Para la realización del análisis de conglomerados se obtuvo las secuencias nucleotídicas de ANS de 24 diferentes plantas y frutos. Estas secuencias fueron traducidas para obtener sus secuencias deducidas de aminoácidos y se utilizaron para la elaboración del dendograma. De las varias posibilidades dentro de los algoritmos utilizados en este estudio, el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) fue el que dió mejor resultado. En este se producen dendogramas enraizados, además de que asume que las distancias de la raíz son iguales, por lo que es el ideal para conocer la similitud entre las secuencias. El dendograma se encuentra dibujado a escala, lo que infiere que la longitud de la rama está en las mismas unidades que la distancia evolutiva. El programa utilizó el método de Possion para conocer las distancias evolutivas, en éste método la unidad de medición se basa en el número de sustituciones de aminoácido por sitio.

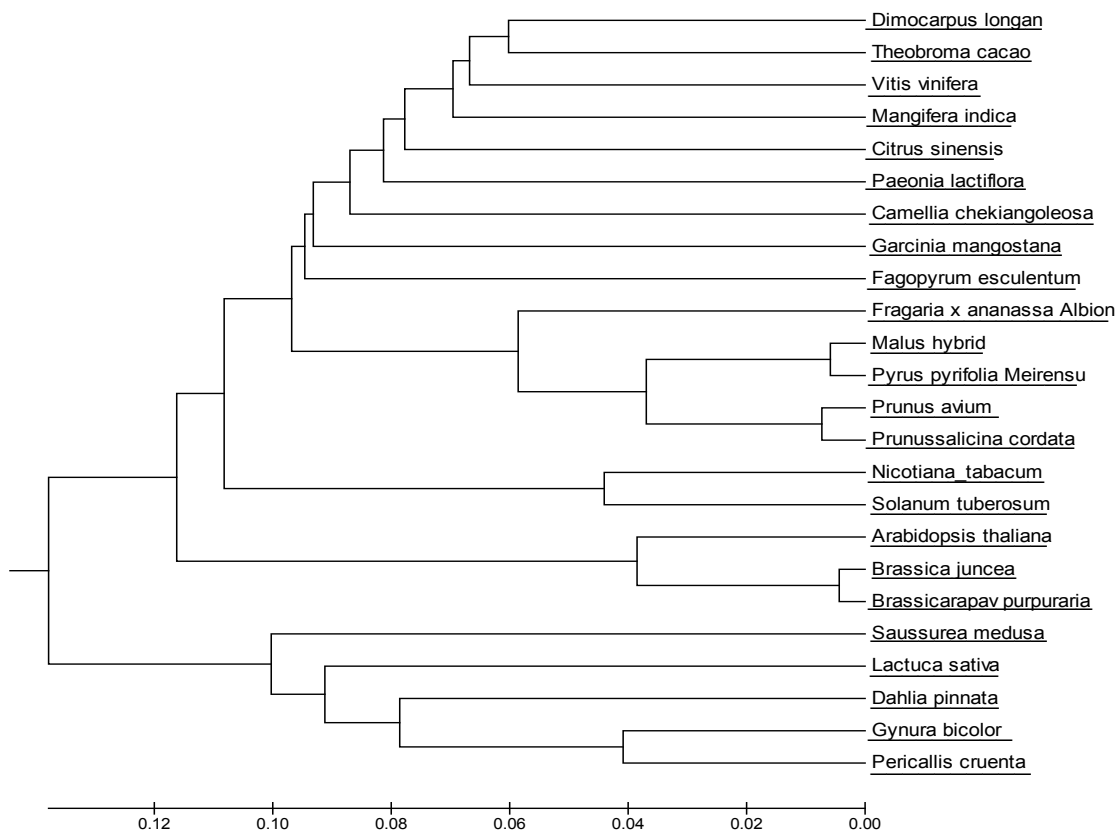


Figura 18. Dendograma comparativo de secuencias aminoacídicas de ANS de diferentes especies comparada con la secuencia de MiANS.

## VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo se obtuvo el ADNc de la antocianidin sintasa de mango nombrándola MiANS, resultando una secuencia nucleotídica de 1056 pares de bases, que codifican para 351 aminoácidos. La primera secuencia parcial (ANS1) se obtuvo del ADNc de mesocarpio de mango, mientras que la segunda secuencia parcial (ANS2) se obtuvo a partir de una mezcla de ADNc de embrión, epicarpio, mesocarpio y hojas de mango (estrategia para la obtención del amplicón). Se puede inferir que la ANS se encontraba expresada en mesocarpio, ya que al mezclar los ADNc de los diversos tejidos, el ADNc de mesocarpio estaba más concentrado en comparación con otras PCRs anteriores realizadas tratando de amplificar el segmento de ADNc que faltaba. La secuencia nucleotídica completa (MiANS) se obtuvo con base en un ensamble de secuencias, donde se obtuvo la región codificante del MiANS, junto con la región 3'UTR y la cola Poli-A. Ambas secuencias se traslaparon, lo que indicó que ambas secuencias eran parte del mismo gen; Pelletier et al. (1997), menciona la ANS es codificada por un solo gen, por lo que se puede inferir que no existe isoformas para ANS.

Comparando la secuencia aminoacídica de MiANS con las secuencias reportadas para ANS en diferentes especies de plantas, se observa que es muy similar a ellas en su tamaño. Por ejemplo, la ANS de *Arabidopsis thaliana* tiene una secuencia aminoacídica de 356 residuos (Pelletier et al, 1997), mientras que en *Ipomea batatas* tiene una secuencia de 362 aminoácidos (Xiaoqiang et al, 2010), la de *Malus crabapple* "Royalty" tiene 357 aminoácidos (Tian et al, 2010) y la de *Brassica campestris* es de 358 aminoácidos (Jiang et al., 2011). Se encontraron diferencias en la longitud de las secuencias, por lo que se puede inferir que se debe a deleciones o inserciones en las secuencias de ANS en las diferentes plantas.

El análisis de MiANS mediante el algoritmo BlastX, dio como resultado que ésta enzima de mango presenta porcentajes de identidad altos a ANS de otras especies. El porcentaje de identidad mínimo es de 77% con ANS de *Ipomea batatas* y el máximo de identidad fue 87% con ANS de *Dimocarpus longan* y *Vitis vinifera*.

En la secuencia deducida de aminoácidos de ANS de *Mangifera indica* se distinguen dos dominios conservados correspondientes a las familias DIOX-n y 2-oxoglutarato oxigenasa dependiente del Fe II, que abarca a partir del aminoácido 54 al 156 y del 206 al 305, respectivamente (Marchler-Bauer et al., 2011). Esta clase de enzimas son comunes en eucariotas y las bacterias, y catalizan una variedad de reacciones que implican típicamente la oxidación de un sustrato orgánico utilizando una molécula de dióxigeno (Aravind y Koonin, 2001). Estos dominios hacen referencia a la interacción del sitio activo de la enzima. Por lo que la

superfamilia DIOX-n (pfam: 14226) presenta un dominio muy conservado en la región N terminal de las proteínas 2-oxoglutarato oxigenasa dependiente de Fe II (pfam: 03171). En lo que respecta a la superfamilia 2-oxoglutarato oxigenasa dependiente de Fe II, incluye a todas las enzimas oxigenasas que dependen del ion Fe II, así como aquellas que reaccionan con el 2 oxoglurato. Además, esta familia incluye el C-terminal de la subunidad alfa de la prolil 4 hidroxilasa y incluye a hidrolasas lisilo, isopenicilina sintasa (IPNS) (Roach et al., 1995) y AlkB (Aravind y Koonin, 2001).

En el análisis de conglomerados se observa la relación entre *Dimocarpus longan* y *Vitis vinifera* con respecto a MiANS, también la relación con ANS de otras especies vegetales. Cabe mencionar que el algoritmo utilizado es en base a la homología de las secuencias aminoacídicas para generar el dendograma, el cual implica que es comparativo y no de origen evolutivo.

El modelo de la estructura tridimensional de la ANS es muy similar a las estructuras tridimensionales para esta enzima en *Arabidopsis thaliana* (Wilmouth et al., 2002) y al modelo de estructura de ANS de espinaca (*Spinacia oleracea*) (Sahay y Shakya, 2010). En estas estructuras se muestra al sitio activo dentro de una región hidrofóbica generada por las hojas beta  $\beta$ 5- $\beta$ 12, además de presentar “jelly roll” formado por la hélice  $\alpha$ 12 y la hélice  $\alpha$ 17 que forma una tapa en el sitio activo, además poseen un lazo largo en los residuos 309–333 según la ANS de *A. thaliana*. El jelly roll es característico de las enzimas pertenecientes a la familia 2OG oxigenasas dependientes de FeII (Aravind y Koonin, 2001). En el estudio realizado por Wilmouth et al. (2002) sobre la estructura de ANS en *A. thaliana* se encontró las posiciones de los residuos conservados para la formación del sitio activo His (232), His (288) y Asp (234), mientras que los residuos situados en *Mangifera indica* L. (MiANS) son His (234), His (290) y Asp (236). Además se tienen residuos conservados que interactúan con los sustratos: Arg-298, Phe-304 Leu-342, Phe-334, Ile-338, Val-235, en *A. thaliana*.

## IX. CONCLUSIONES

En el presente estudio se obtuvo la secuencia nucleotídica de antocianidin sintasa (ANS) de mango (*Mangifera indica*), la cual se nombró MiANS. La secuencia se amplificó a partir de los ADNc sintetizados de embrión, epicarpio, mesocarpio y hojas de mango. Se realizó un ensamble de las secuencias parciales ANS1 y ANS2, en donde se obtuvo una secuencia con una longitud de 1056 pares de bases, que codifica para 351 aminoácidos. La secuencia MiANS posee una alta identidad entre las especies reportadas para ANS, siendo las ANS de *Dimorcarpus longan* y *Vitis vinifera* a las que es más similar.

En el dendograma de similitud realizado se comprobó la identidad de las secuencias ANS de otras plantas con MiANS. En base a esto se puede inferir que la secuencia que codifica para ANS en las plantas se mantiene conservada, dada a su importancia en la síntesis de pigmentos, los cuales son importantes para ellas dentro de su desarrollo y entorno. Se logró modelar la estructura MiANS, esto toma importancia ya que solo están reportadas dos estructuras tridimensionales para la ANS una de *Arabidopsis thaliana* y la otra de *Spinacia oleracea*. A la fecha no se han reportado estructuras tridimensionales de ANS de frutos, solamente se encontraron secuencias nucleotídicas y aminoacídicas para dicha enzima de los frutos y plantas, por lo que toma importancia el haber obtenido un modelo de la estructura tridimensional de MiANS.

Este trabajo se generó información destacada para impulsar estudios futuros en donde se podrá evaluar la actividad y expresión a nivel génica de la enzima y relacionarse con la fisiología del mango, por mencionar algunos. Por lo que se sugiere seguir estudiando a ANS de mango, sobre-expresarla en un sistema heterólogo para su caracterización bioquímica. Lo anterior contribuirá al conocimiento de la ruta de síntesis y acción de las antocianinas, dada a su importancia en las plantas al producir los pigmentos.

Se recomienda obtener la región 5'UTR del ADNc de MiANS con la finalidad de obtener su región promotora para futuros estudios de la regulación de su expresión génica. Al obtener su secuencia nucleotídica se podrán identificar elementos de respuesta a los que se unan los factores de transcripción y activadores de transcripción.

## X. LITERATURA CITADA

- Almeida, J. R., E. Amico, A. Preuss, F. Carbone, C. H. de Vos, B. Deiml, F. Mourgues, G. Perrotta, T. C. Fischer, A. G. Bovy, S. Martens y C. Rosati. 2007. Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*). Archives of Biochemistry and Biophysics 465(1): 61-71.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers y D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. Journal Molecular Biology 215 (3):403-410.
- Aravind L. y E. V. Koonin. 2001. The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. Genome Biology 2(3):1-8.
- Bueno, J. M., P. Sáez-Plaza, F. Ramos-Escudero, A. M. Jiménez, R. Fett, Roseane, A. G. Asuero. 2012. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake of Anthocyanins. Critical Reviews in Analytical Chemistry 42(2): 126-151.
- Cheng, L., Y. Xu, E. Grotewold, Z. Jin, F. Wu, C. Fu, D. Zhao. 2007. Characterization of Anthocyanidin Synthase (ANS) Gene and anthocyanidin in rare medicinal plant- *Saussurea medusa*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 89: 63-73.
- Croteau R., T. Kutchan, N. Lewis. 2000. Capítulo 24, Natural Products (Secondary Metabolites), 1250-1310p. En: Buchanan, B.B., W. G. G. G. y R.L. Jones (eds), Biochemistry and Molecular Biology of Plant. Capítulo 24 American Society. Plant Physiologist. Rockville MD.
- Cuevas, M.E., A. Antezana, P. Winterhalter. 2008. Analisis y caracterizacion de antocianinas en diferentes variedades de maiz (*Zea mays*) boliviano. Memorias. Red Alfa Lagrotech. Cartagena. Comunidad Europea.
- FAO.2008. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura. FAOSTAT.27 de Noviembre 2012. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Ferrer, J. L., M. B. Austin, C. Stewart Jr., J. P. Noel. 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. Plant Physiology and Biochemistry 46(3): 356-370.
- Fourney, R. M., Miyakoshi, J., Day, R. S., and Paterson, M. C. 1988. Northern blotting: Efficient RNA staining and transfer. Focus 10, 5-7.

- García, D. E. 2004. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. Pastos y Forrajes 27(1): 1-12.
- Garzón, G. A. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revision. Acta Biológica Colombiana 13(3): 27-36.
- Jiang, M. , X. Chen, J. Li. 2011. Cloning, expression and sequence analysis of anthocyanidin synthase gene BcANS in *Brassica campestris* var . *purpurea*. Journal of Zhejiang University, Agriculture and Life Science 37(4): 393-398.
- Koes, R., W.Verweij, F.Quattrocchio. 2005. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. Trends in Plant Science 10(5): 236-242.
- Lock, S. de U. O. 1997. Capitulo 4: Antocianinas, 75-116 p . Colorantes Naturales. PUCP. Perú, Pontificia Universidad Catolica del Perú.
- Liu, X. , M. Chen, M. Li, C. Yang, Y. Fu, Q. Zhang, L. Zeng, Z. Liao. 2010. The anthocyanidin synthase gene from sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]: Cloning, characterization and tissue expression analysis. African Journal of Biotechnology 9(25): 3748-3752.
- Marchler-Baue, A., S. Lu, J. B. Anderson, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, J. H. Fong, L. Y. Geer, R. C. Geer, N.R. Gonzales, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, F. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, M. V. Omelchenko, C. L. Robertson, J. S. Song, N. Thanki, R. A. Yamashita, D. Zhang, N. Zhang, C. Zheng y S. H. Bryant. 2011. Nucleic Acids Research 39. 225–229.
- Mazza, G. 2007. Anthocyanins and heart health. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità 43(4): 369-374.
- Pelletier, M.K., J. R. Murrell, B.W. Shirley.1997.Characterization of Flavonol Synthase and Leucoanthocyanidin Dioxygenase Genes in Arabidopsis. Plant Physiology 11(3): 1431-1445.
- Piñol, M. T., J. Palazón, R.M. Cusidó. 2008. Introducción al metabolismo secundario. 323-346p. Fundamentos de Fisiología Vegetal. J. Azcon-Bietto and M. Talón. Madrid, Mc-Graw-Hill.
- Reyes, L. F., L. Cisneros-Zevallos.2007. Electron-Beam Ionizing Radiation Stress Effects on Mango Fruit (*Mangifera indica* L.) Antioxidant Constituents before and during Postharvest Storage Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(15): 6132-6139.
- Roach PL, I.J. Clifton, V. Fulop, K. Harlos, G.J. Barton GJ, J .Hajdu, I. Andersson, C.J. Schofield, J.E. Baldwin.1995. Crystal structure of isopenicillin N synthase is the first from a new structural family of enzymes. Nature 375:700-704.



- Russell, W. y G. Duthie. 2011. Plant secondary metabolites and gut health: the case for phenolic acids. *Proceedings of the Nutrition Society* 70(3): 389-396.
- Sahay, A. y M. Shakya. 2010. Structure Prediction of Dihydroflavonol 4-Reductase and Anthocyanidin Synthase from Spinach. *Bioinformation* 5.(6): 259-263 .
- Sambrook, J. y D.W. Russell. 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Volume 1, 2 y 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sergent, E. 1999. El cultivo de mango (*Mangifera indica* L.): botánica, manejo y comercialización. 72. 23-24 y 38-39p. Eduardo Sergent. Caracas: Universidad Caracas Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Colección monográficas.
- Stafford, H. A. 1994. Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Science* 101: 91-98.
- Strack, D. 1997. Phenolic Metabolism. 387-416 p. *Plant Biochemistry*. P. M. Dey and J. B. Harbone. San Diego, Academic Press Limited.
- Tamura, K, Peterson P, Strecher G, Nei M y Kumura S.( 2011), MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary distance and Maximum Parsimony Methods, *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. Metabolitos secundarios y defensa en las plantas. *Fisiología Vegetal*. Castello de la plana. Jaume, Universitat Jaume I D.L. 529-542.
- Tian, J., Shen H. Shen, J. Zhang, Y. Yao, T. Song y H. Geng. 2010. Cloning of McANS Gene in *Malus Crabapple* and Expression Analysis in Different Cultivars. *Acta Horticulturae Sinica* 6: 939-948.
- Valle Leguizamón, G. del, A. González-León, R. Baez Sañudo. 2005. Grape Anthocyanins (*Vitis vinifera* L.) and their relation to color. *Fitotecnia Mexicana* 28(4): 359-368.
- Wilmouth, R.C., J. J. Turnbull, R W.D. Welford, I. J. Clifton, A. G. Prescott y C. J. Schofield. 2002. Structure and Mechanism of Anthocyanidin Synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Structure* 10: 93–103.
- Xie, R., L. Zheng, H. Shaolan, Y. Zheng, S. Yi, y L. Deng. 2011. Anthocyanin biosynthesis in fruit tree crops: Genes and their regulation. *African Journal of Biotechnology* 10 (86):19890-19897.
- Yahia, E.M., J. O. Paz, and R.A. Flores. 2006. El Mango. 1-56p .México: Trillas.
- Zamboni, A, L. Pierantoni, P. De Franceschi. 2008. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody-plants. Department of Fruit Tree and Woody Plant Science. University of Bologna, Italy. *I Forest* 1: 122-125.