



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

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA
SÍNTESIS DE BETALAÍNAS EN CÉLULAS EN
SUSPENSIÓN DE *Stenocereus queretaroensis*

Tesis que presenta
JORGE LUIS ARAUJO SÁNCHEZ

En opción al título de
MAESTRO EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2021

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Jorge Luis Araujo Sánchez titulado **Análisis de la expresión génica de la síntesis de betalainas en células en suspensión de *Stenocereus queretaroensis***, fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, dentro de la línea de Metabolismo Secundario e Ingeniería Metabólica, del laboratorio BMP08 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Miranda Ham, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

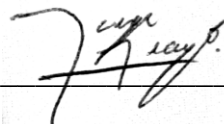


Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 22 de abril de 2021

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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



Ing. Jorge Luis Araujo Sánchez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado "Análisis bioquímico y molecular de la biosíntesis de betalaínas en, una cactácea mexicana" (CONACYT, proyecto 286730) bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Miranda Ham.

Agradecimientos

Agradezco al CONACYT por la beca no. 735690 y de igual manera, al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), la oportunidad que me brindó para realizar mi posgrado en sus instalaciones, especialmente a la unidad de bioquímica y biología molecular de plantas (UBBMP) donde realicé mi proyecto.

Agradezco gratamente a la Dra. María de Lourdes Miranda Ham, por el tiempo, las herramientas, los conocimientos y la confianza brindada durante toda mi estancia en su laboratorio.

A la m. En c. Lizbeth a. Castro concha, por su gran apoyo y confianza durante las dificultades técnicas del trabajo y por su entusiasmo y motivación para seguir generando nuevos conocimientos con base en ellos.

Al Dr. Felipe Vázquez Flota, por su compromiso de inicio a fin para culminar exitosamente con el trabajo.

A la Dra. Elisa Valenzuela Soto, por sus valiosos consejos durante la conclusión de mi trabajo.

Un especial agradecimiento al Dr. Javier A. Morales Morales por guiarme a pasos gigantes en las etapas clave del proyecto, por exhortarme a hacer las cosas bien hasta conseguir buenos resultados.

A mis amigos y compañeros dentro del posgrado y fuera del mismo, que hicieron que el camino fuera más tranquilo en épocas complicadas.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

Artículo

Araujo J.L., L.A. Castro-Concha, J.A. Morales-Morales y M.L. Miranda-Ham, *Stenocereus queretaroensis*, UNA ALTERNATIVA A LOS COLORANTES SINTÉTICOS, Desde el Herbario 11: 235-239, (2019).

| ÍNDICE | PÁGINA |
|--|---------------|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| CAPÍTULO I..... | 3 |
| ANTECEDENTES..... | 3 |
| 1.1 PIGMENTOS EN LA NATURALEZA..... | 3 |
| 1.2 BETALAÍNAS..... | 4 |
| 1.2.1 BIOSÍNTESIS DE LAS BETALAÍNAS | 7 |
| 1.2.1.1 L-TIROSINA..... | 10 |
| 1.2.1.2 AROGENATO DESHIDROGENASA (TyrAa)..... | 11 |
| 1.2.1.3 POLIFENOL OXIDASA (PPO) | 12 |
| 1.2.1.4 4,5-EXTRADIOL DIOXIGENASA (DODA)..... | 13 |
| 1.2.2 FUENTES DE BETALAÍNAS | 14 |
| 1.3 FAMILIA CACTACEAE | 15 |
| 1.3.1 <i>Stenocereus</i> (A. Berger) Riccob..... | 15 |
| 1.3.2 <i>Stenocereus queretaroensis</i> | 17 |
| 1.4 RECAPITULACIÓN | 17 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 19 |

| | |
|---|----|
| HIPÓTESIS | 20 |
| OBJETIVO GENERAL | 20 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 20 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL..... | 21 |
| | |
| CAPÍTULO II..... | 23 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 24 |
| 2.1 MATERIAL BIOLÓGICO | 24 |
| 2.2 MÉTODOS..... | 25 |
| 2.2.1 DETERMINACIÓN DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO | 25 |
| 2.2.2 CUANTIFICACIÓN DE LAS BETALAÍNAS | 25 |
| 2.2.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>tyrAa</i> , <i>ppo</i> y <i>doda</i> | 26 |
| 2.2.3.1 EXTRACCIÓN DE RNA..... | 26 |
| 2.2.3.2 DISEÑO DE CEBADORES | 28 |
| 2.2.3.3 SÍNTESIS DE cDNA | 30 |
| 2.2.3.4 PCR DE PUNTO FINAL..... | 31 |
| | |
| CAPÍTULO III..... | 33 |
| RESULTADOS | 33 |
| 3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS EN SUSPENSIÓN SqY1 y SqR1 | 33 |

| | |
|---|----|
| 3.2 CUANTIFICACIÓN DE BETALAÍNAS EN LAS LÍNEAS SqY1 y SqR1..... | 34 |
| 3.3 EXTRACCIÓN DE ARN DE CÉLULAS DE <i>Stenocereus queretaroensis</i> | 36 |
| 3.4 EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>tyrAa</i> , <i>ppo</i> y <i>doda</i> EVALUADOS MEDIANTE PCR.... | 40 |
| | |
| CAPÍTULO IV | 43 |
| DISCUSIÓN GENERAL..... | 44 |
| | |
| CAPÍTULO V | 48 |
| CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS..... | 49 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 50 |

LISTADO DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 Estructuras químicas de las betalaínas..... | 5 |
| Figura 1.2 Betabel (<i>Beta vulgaris</i> L.) y nopal (<i>Opuntia ficus indica</i> L. Mill.). Estructuras químicas de las betalaínas..... | 6 |
| Figura 1.3 Ruta biosintética de las betalaínas..... | 8 |
| Figura 1.4 Planta y pitaya de <i>Stenocereus queretaroensis</i> | 16 |
| Figura 1.5 Estrategia experimental planteada..... | 22 |
| Figura 2.1 Líneas celulares empleadas para la cuantificación de betalaínas y de ácidos nucleicos. A la izquierda, se muestra la línea SqY1 y a la derecha, la línea SqR1..... | 23 |
| Figura 3.1 Curva de crecimiento de la línea celular SqY1..... | 31 |
| Figura 3.2 Curva de crecimiento de la línea celular SqR1..... | 32 |
| Figura 3.3 Betalaínas en la línea SqY1 de <i>S. queretaroensis</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)..... | 33 |
| Figura 3.4 Betalaínas en la línea SqR1 de <i>S. queretaroensis</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)..... | 34 |
| Figura 3.5 Ensayos iniciales de extracción de ARN..... | 35 |
| Figura 3.6 Ensayos posteriores de extracción de ARN con modificaciones en el protocolo..... | 36 |
| Figura 3.7 Resultados finales con el protocolo estandarizado..... | 37 |
| Figura 3.8 Extracción de RNA de muestras obtenidas de la curva de crecimiento de la línea celular SqY1..... | 37 |
| Figura 3.9 Expresión de la arogenato deshidrogenasa (<i>TyrAa</i>) en células durante el ciclo de cultivo de la línea SqY1 de <i>Stenocereus queretaroensis</i> | 38 |
| Figura 3.10 Expresión de la polifenol oxidasa (<i>PPO</i>) en células durante el ciclo de crecimiento de <i>Stenocereus queretaroensis</i> | 39 |

Figura 3.11. Expresión de la 4,5-extradiol doxigenasa (*DODA*) en células durante el ciclo de crecimiento de *Stenocereus queretaroensis*.....40

Figura 3.12. Expresión del factor de elongación - 1 α (*EF-1 α*) en células durante el ciclo de crecimiento de *Stenocereus queretaroensis*.....40

LISTA DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 2.1 Cebadores diseñados a partir de secuencias codificantes de <i>Beta vulgaris</i> | 28 |
| Cuadro 2.2 Cebadores específicos diseñados a partir de secuencias codificantes obtenidos a partir del transcriptoma de <i>S. queretaroensis</i> | 29 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|---|
| ACT | Actina |
| ACT7 | Actina 7 |
| ArDH | Arogenato deshidrogenasa |
| BTUB | Beta tubulina |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| CB | Contenido de betalaínas |
| CFR | Código de Regulaciones Federales |
| CM | Corismato mutasa |
| CYP450 | Citocromo P450 |
| CYP76AD | Tirosina hidroxilasa |
| DEPC | Dietil pirocarbonato |
| DODA | 4,5-extradiol dioxigenasa |
| DOPA | L-5,6-dihidroxifenilalanina |
| FD | Factor de dilución |
| dNTP | Desoxinucleósido trifosfato |
| DTT | Ditiotreitol |
| EEUU | Estados Unidos |
| EF-1 α | Factor de elongación 1 alfa |
| GC | Guanina citocina |
| His | Histidina |
| HPP | Hidroxifenilpiruvato |
| L | Longitud |
| NAD(P) ⁺ | Nicotín adenín dinucleótido fosfato oxidado |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| pb | Pares de bases |
| PF | Peso fresco |
| p/v | Peso/volumen |
| P | Peso |
| Phe | Fenilalanina |
| PM | Masa molecular |

| | |
|----------------|-------------------------------------|
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PDH | Prefenato deshidrogenasa |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| PheH | Fenilalanina hidroxilasa |
| PPO | Polifenol oxidasa |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RT | Retrotranscriptasa |
| TA | Temperatura ambiente |
| T _m | Temperatura media de fusión |
| Trp | Triptófano |
| TUB | Tubulina |
| Tyr | Tirosina |
| TyrAa | Arogenato deshidrogenasa |
| TyrAp | Prefenato deshidrogenasa |
| TyrA(p) | Ciclohexadienil deshidrogenasa |
| UBC | Ubiquitina C |
| UBQ | Ubiquitina |
| UV | Ultravioleta |
| µg | Microgramos |
| µL | Microlitros |
| µM | Micromolar |

RESUMEN

Las betalaínas son pigmentos sintetizados exclusivamente por plantas del orden Caryophyllales, responsables de las coloraciones amarillas y violetas en flores, frutos y otros tejidos especializados. Su síntesis consta de cuatro pasos enzimáticos desde el paso final de la obtención del aminoácido L-tirosina como sustrato inicial hasta la formación final de pigmentos estables. El conocimiento de la regulación de estas etapas de síntesis coadyuvaría en un avance sustancial en la ingeniería metabólica de esta vía en modelos potenciales. Las pitayas son frutos producidos por *Stenocereus queretaroensis* (Cactaceae) que acumulan cantidades significativas de pigmentos en su pulpa. Por lo tanto, en este trabajo se analizaron tanto la acumulación de betalaínas como la expresión de genes involucrados en las etapas decisivas de su biosíntesis en una línea celular en suspensión de *S. queretaroensis*, con el fin de poder determinar si existe una relación entre estos eventos.

Los resultados muestran que la producción de betalaínas en la línea celular SqY1 de *S. queretaroensis* se mantiene más o menos constante de inicio a fin del ciclo de cultivo; sin embargo, han de mencionarse dos picos de acumulación en los días 8 y 20. No obstante, los cambios en la expresión de los genes analizados no coincidieron con estos incrementos, sobre todo el que se dio durante la fase de adaptación. Los patrones de bandas obtenidos indicaron la presencia de transcritos correspondientes al gen arogenato deshidrogenasa (*TyrAa*) sin cambios aparentes durante todo el ciclo de crecimiento establecido, mientras que los transcritos de los genes polifenol oxidasa (*PPO*) y 4,5-extradiol dioxigenasa (*DODA*) son detectables después del primer pico de acumulación de pigmentos y siendo mucho más notables hacia el fin del ciclo, coincidiendo con el segundo pico de acumulación de pigmentos.

ABSTRACT

Betalains are synthesized exclusively by members of the Caryophyllales order, and are responsible for colors yellow and violet in flowers, fruits and other specialized tissues. Only four enzymatic steps are necessary for their synthesis, from the final reaction to obtain L-tyrosine as an initial substrate to the reaction leading to stable pigments. Knowledge of the regulation of these synthetic reactions would translate into a substantial progress towards metabolic engineering in suitable models. "Pitayas" are the fruits from *Stenocereus queretaroensis* (Cactaceae) that accumulate significant amounts of betalains in their pulp. Hence, in this work, we have analyzed both, betalain accumulation and the expression of genes involved in decisive steps of their biosynthesis in a cell line from *S. queretaroensis*, aimed to try to determine if there is a relationship between these events.

Results show that betalain accumulation in SqY1 cell line from *S. queretaroensis* is fairly constant from the beginning until the end of the culture cycle; nevertheless, it must be mentioned that there are two peaks of accumulation on days 8 and 20. Changes in the expression of the analyzed genes did not coincide with the pigment increments, more pointedly in the one that occurred during the adaptive phase. The band patterns that were obtained indicated no apparent variations in the presence of *TyrAa* transcripts, corresponding to arogenate dehydrogenase gene, along the culture cycle. In contrast, transcripts corresponding to polyphenol oxidase (*PPO*) and 4,5 - extradiol dioxygenase (*DODA*) could be detected after the first peak of pigment accumulation and were very conspicuous towards the end of the cycle, coinciding with the second peak of pigment accumulation.

INTRODUCCIÓN

El color siempre será un aspecto a considerar en casi cualquier entidad con la que interactuemos, ya sean objetos, vestimentas, alimentos o bebidas. La elección de estos insumos se verá influenciada principalmente por este aspecto tan notable. A partir de la década de los sesentas y hasta el día de hoy, prevalece una creciente demanda por productos con colores brillantes, lo cual ha llevado a la inclusión de aditivos y colorantes de origen sintético, debido a su estabilidad y bajos costos de producción. Sin embargo, con el tiempo, su uso se ha venido restringiendo, a tal grado de sólo contar con un espectro específico de colores, avalados por organismos internacionales, debido a la creciente evidencia de su influencia nociva sobre la salud humana.

En la búsqueda de favorecer la conservación de la salud, se han desarrollado una gran variedad de estudios, con el fin de obtener compuestos de origen natural como los pigmentos, partiendo de modelos altamente potenciales que puedan satisfacer las diferentes necesidades para su utilización en diversos productos consumibles.

Los pigmentos vegetales, o bien llamados biocromos, son compuestos sintetizados por las plantas para dar color a la naturaleza, además de cumplir con una infinidad de otras funciones. De acuerdo a su predominancia, los pigmentos se concentran en tres grandes grupos: los carotenoides, las antocianinas y las betalaínas. Los primeros dos se utilizan para dar color a un número limitado de productos y alimentos de vida corta, dado que su inclusión en las formulaciones se ve restringida por su baja estabilidad ante condiciones, como el pH o las altas temperaturas durante el procesamiento. Las betalaínas, en su caso, logran superar estas restricciones de manera significativa, lo que ha favorecido su posible inclusión en un amplio grupo de insumos procesados.

Recientemente, se ha considerado que la incorporación de pigmentos vegetales a diversos productos podría tener efectos positivos sobre la salud humana, generando aún más interés de las diferentes industrias para su aplicación.

No obstante, su explotación como pigmentos que proviene de una fuente natural se ve todavía limitada, debido a la poca cantidad de modelos promisorios para su obtención. Actualmente, el empleo de herramientas biotecnológicas, como el cultivo de tejidos y la

ingeniería metabólica, han proporcionado los medios necesarios para el estudio de su biosíntesis, así como de la optimización de plataformas potenciales para su producción.

Algunas especies de cactus del género *Stenocereus* han demostrado ser excelentes candidatos para la obtención de betalaínas, a partir de sus frutos, llamados tradicionalmente “pitayas”; no obstante, el número de estudios enfocados en la biosíntesis de estos pigmentos es todavía limitado.

El objetivo de este trabajo es analizar la expresión de algunos genes involucrados en la síntesis de betalaínas durante las diferentes etapas del ciclo celular de una línea de células en suspensión de *Stenocereus queretaroensis*, con el fin de comprender los eventos de regulación del metabolismo de estos pigmentos en la especie.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 PIGMENTOS EN LA NATURALEZA

Los pigmentos son compuestos que proporcionan efectos colorantes específicos en las hojas, las flores, los frutos, los tallos y las raíces de las plantas (Gomes Corrêa *et al.*, 2019; Upadhyay, 2018). Los pigmentos deben su color a que absorben la luz en el rango de longitud de onda de la región visible. El color producido obedece a una estructura específica de la molécula (cromóforo), la cual captura la energía produciendo la excitación de un electrón desde un orbital externo a un orbital superior. La energía no absorbida se refleja y/o refracta para ser capturada por el ojo y los impulsos neuronales generados se transmiten al cerebro donde podrían interpretarse como un color (Paliwal *et al.*, 2016).

Tres grupos principales de pigmentos: las betalaínas, los carotenoides y las antocianinas, son responsables de la atractiva exhibición de los colores presentes en la naturaleza (Grotewold, 2006). Estas tres familias de pigmentos se consideran de gran importancia en la ecología de las plantas y en su capacidad para atraer polinizadores y organismos dispersores de semillas (Kevan y Baker, 1983).

Las antocianinas son aquellos pigmentos responsables de los colores rojo a púrpura y azul en muchas frutas, verduras, flores y cereales (Wrolstad, 2004). Su aplicación a nivel industrial es todavía limitada, debido a su relativa inestabilidad y fácil oxidación, además de su alta sensibilidad a factores, como el pH, la temperatura y la radiación UV, los cuales impactan dramáticamente en su estabilidad, color y propiedades nutricionales (Wrolstad *et al.*, 2005; Rivas-Gonzalo, 2003).

Los carotenoides, por su parte, representan el grupo más amplio de pigmentos hasta ahora identificados en sistemas fotosintéticos y no fotosintéticos de plantas superiores, algas, hongos, bacterias, y al menos, en una especie de cada forma de vida animal (Britton y Homero-Mendez, 1994). Esta clase de pigmentos son responsables de muchos de los brillantes colores rojo, naranja y amarillo en plantas, hongos y también de pájaros, insectos, crustáceos y truchas (Gordon *et al.*, 1983). Desafortunadamente, su inclusión en

alimentos se ha reducido, debido a su inevitable alteración ante las diferentes condiciones al momento del procesamiento, las cuales incluyen la exposición al calor, pH, luz u oxígeno (Schieber y Weber, 2016).

Las betalaínas son pigmentos rojos, violetas y amarillos, restringidos de manera importante a plantas del orden de las Caryophyllales (Polturak y Aharoni, 2018). Esta familia de pigmentos es bastante estable en un rango de pH entre 3 y 7, así como a altas temperaturas, lo que los hace adecuados para alimentos que pasan por distintas condiciones de procesamiento, donde la coloración con otros pigmentos vegetales generalmente falla (Khan, 2016; Stintzing y Carle, 2004; Altamirano *et al.*, 1993).

En años recientes, los pigmentos vegetales han recibido mucho más atención de la industria alimentaria, la cual los ha considerado como fuentes naturales como sustitutos ideales de los colorantes sintéticos empleados, debido al impacto negativo en la salud humana que conlleva su consumo. Es importante destacar el creciente interés en los pigmentos rojos naturales, debido a sus efectos preventivos sobre las enfermedades crónicas (Leong *et al.*, 2018).

1.2 BETALAÍNAS

Las betalaínas son pigmentos con estructuras nitrogenadas e hidrosolubles, sintetizados en el citoplasma y luego, transportados y almacenados en las vacuolas. Están presentes en flores, frutos y ocasionalmente, en tejidos vegetativos de plantas pertenecientes a la mayoría de las familias del orden de las Caryophyllales, como Achatocarpaceae, Aizoaceae, Amaranthaceae, Basellaceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Didiereaceae, Halophytaceae, Hectorellaceae, Nyctaginaceae, Phytolaccaceae, Portulacaceae y Stegnospermataceae, donde curiosamente las familias Caryophyllaceae y Molluginaceae producen antocianinas (Hussain *et al.*, 2018; Mabry, 2001).

Las betalaínas se sintetizan a partir de una serie de reacciones que involucran al ácido betalámico de manera central, dando lugar a dos tipos de pigmentos: los rojos denominados betacianinas y los amarillos denominados betaxantinas respectivamente (Figura 1.1).

Tradicionalmente, las betacianinas se han determinado como productos de la condensación del ácido betalámico con *ciclo*-DOPA (Piattelli, 1981), en donde el compuesto condensado resultante puede derivar hacia otros tipos de betacianinas, generalmente a partir de hidroxilaciones o glucosilaciones (Strack *et al.*, 2003). El más simple y mejor conocido es la betanina (betanidin-5-O- β -glucósido) que tiene unido un grupo hidroxilo al C₆ y un glucósido al C₅ (Piattelli, 1981; Slimen *et al.*, 2017). Otros como la gomferina poseen grupos posicionados de manera invertida en relación a la betanina; por otro lado, las amarantinas tienen un grupo glucuronil-glucosilo unido al carbono C₅ y las vugambilinas que poseen un diglucósido o derivados unidos en el C₅ o C₆ de betacianinas carboxiladas o descarboxiladas (Slimen *et al.*, 2017).

En el caso de las betaxantinas, su clasificación es dependiente del resultado de la condensación del cromóforo con aminas o aminoácidos (Gandía-Herrero *et al.*, 2010).

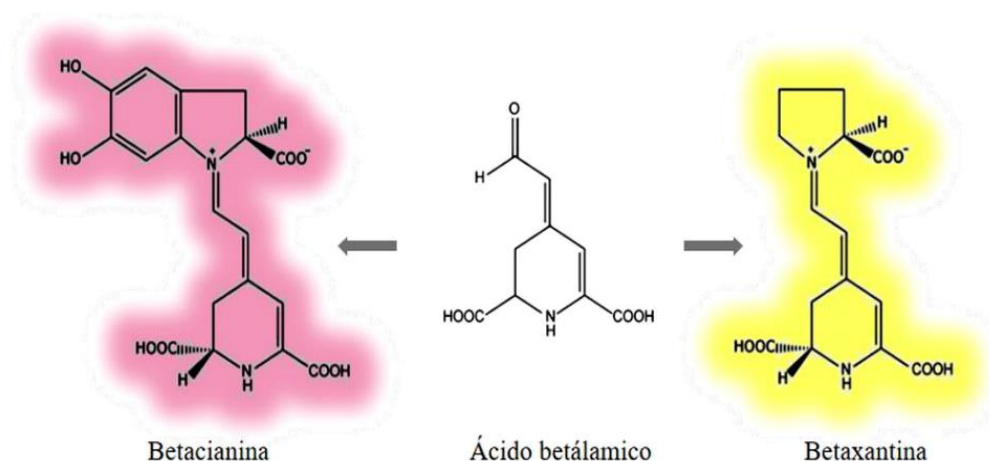


Figura 1.1 Estructuras químicas de las betalaínas.

Fue a mediados de los años cincuenta, cuando las betalaínas fueron extraídas e identificadas por primera vez a partir de betabel (*Beta vulgaris*) y nopal (*Opuntia* spp.) (Piattelli y Minale, 1964; Wyler *et al.*, 1963) (Figura 1.2). Sin embargo, no fue hasta 1966 que el término “betalaína” fue introducido de manera oficial para describir estos pigmentos derivados del ácido betalámico, pues entonces eran erróneamente llamados flavocianinas (betaxantinas, del griego: xanthos = amarillo) y antocianinas nitrogenadas (betacianinas, del griego: kyaneos = azul) (Mabry y Deidring, 1968).



Figura 1.2 Betabel (*Beta vulgaris* L.) y nopal (*Opuntia ficus indica* L. Mill.).

Hasta el día de hoy, se han identificado estructuralmente 75 betalaínas en plantas en cerca de 17 de las 34 familias del orden de las Caryophyllales (Khan y Giridhar, 2015), concentradas en dos grandes clases: betacianinas y betaxantinas.

En la naturaleza, las betalaínas están involucradas en diversos procesos efectuados por las plantas, con el fin de subsistir atrayendo algunos polinizadores y agentes dispersores de semillas, así como en la foto-protección de los tejidos tras la exposición a un exceso de luz o radiación UV o bien, ante condiciones de sequía y estrés salino (Jain y Gould, 2015; Jain *et al.*, 2015; Nakashima *et al.*, 2011; Hayakawa y Agarie, 2010; Ibdah *et al.*, 2002; Vogt *et al.*, 1999; Kishima *et al.*, 1995). La acumulación es muy notable en familias particularmente adaptadas a condiciones áridas o salinas como Aizoaceae, Portulacaceae y Cactaceae.

El actual interés por estos pigmentos para su utilización en la industria alimentaria, radica en que pueden ser aplicados a un amplio grupo de productos comestibles ácidos o neutros, dada su estabilidad en un amplio rango de pH (Gandía-Herrero *et al.*, 2016) y la significativa ausencia de sabores u olores intrínsecos (Neelwarne y Halagur, 2013).

Además, sus propiedades químicas y farmacológicas constituyen actualmente otra de las razones principales de los estudios sobre sus actividades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (Sreekanth *et al.*, 2007).

1.2.1 BIOSÍNTESIS DE LAS BETALAÍNAS

A diferencia de las rutas biosintéticas de las antocianinas o los carotenoides, la formación de betalaínas es relativamente simple debido a que involucra tan sólo cuatro pasos enzimáticos, partiendo de la formación del aminoácido L-tirosina hasta la estructuración de los pigmentos estables: betaxantinas y betacianinas (Figura 1.3; Sheehan *et al.*, 2020).

Siguiendo el modelo básico de síntesis de betalaínas (Figura 1.3), ésta comienza por la mediación de una arogenato deshidrogenasa (TyrAa) sobre el arogenato que da lugar a la acumulación del aminoácido L-tirosina (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002), que inicialmente es hidroxilada por acción de una polifenol oxidasa (PPO), que resulta en la formación bimolecular de L-5,6-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (Khan y Giridhar, 2015; Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002).

El L-DOPA puede dar lugar a otros productos a través de rutas alternas. En primera instancia, se pueden producir reacciones de escisión y apertura en el anillo de L-DOPA entre los carbonos 4 y 5 (Esatbeyoglu *et al.*, 2015) por la actividad de escisión del anillo aromático extradiol (Sakuta, 2014) de la enzima 4,5-DOPA-extradiol dioxigenasa (DODA), produciendo 4,5-seco-DOPA que sirve como intermediario. Posteriormente, 4,5-seco-DOPA se reajusta espontáneamente, mediante una condensación intramolecular de una amina y un grupo aldehído, dando lugar así al cromóforo central ácido betalámico (Esatbeyoglu *et al.*, 2015; Khan y Giridhar, 2015).

El cromóforo obtenido (ácido betalámico) puede sufrir una reacción de condensación con el grupo imino de *ciclo*-DOPA para sintetizar los pigmentos rojos (betacianinas), o bien, puede condensarse con la porción amino o imino de aminoácidos para producir pigmentos amarillos (betaxantinas), respectivamente (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

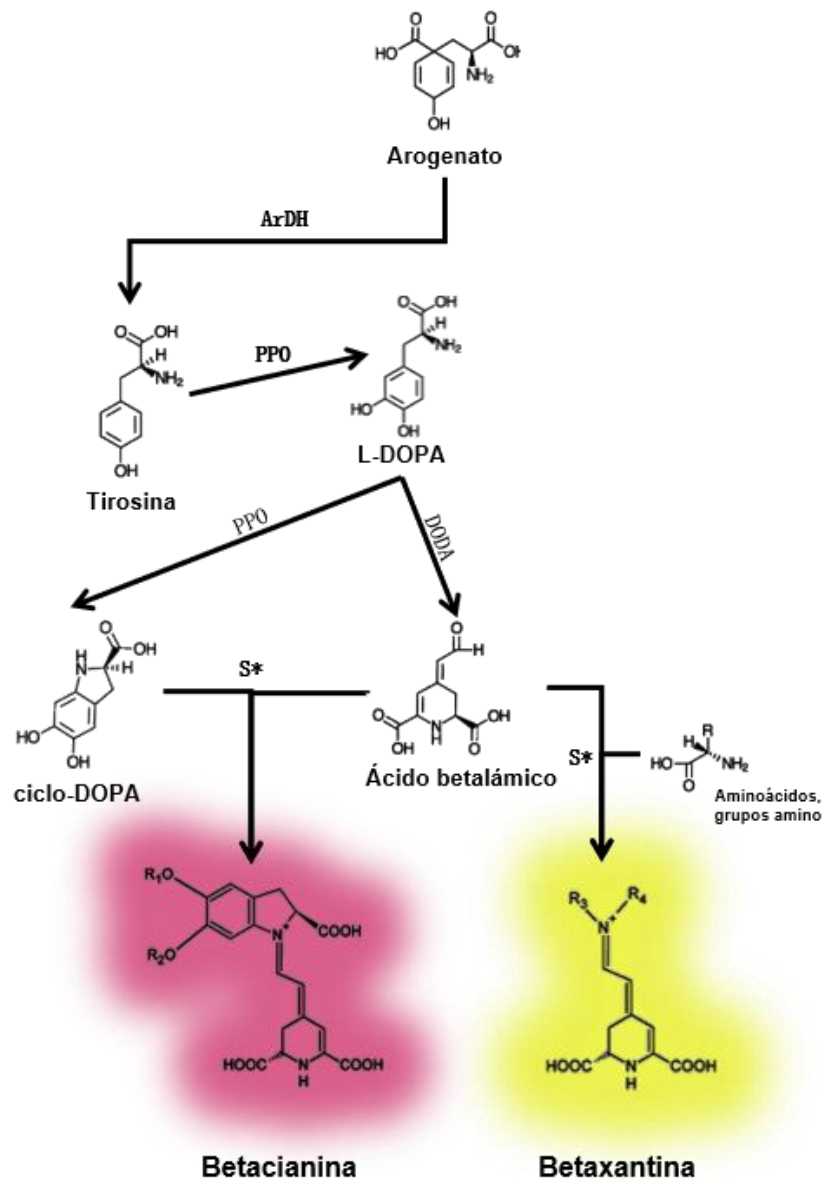


Figura 1.3 Ruta biosintética de las betalainas.

Hasta hoy día, se han identificado varias posibles vías de aprovechamiento del ácido betalámico para la formación de betacianinas y betaxantinas. En la primera, la formación de pigmentos amarillos (betaxantinas) implica una reacción de condensación espontánea entre un aminoácido o una amina y el grupo aldehído del ácido betalámico, dando como

resultado la formación de una imina (base Schiff) entre ambos compuestos (Zrýd y Christinet, 2003). Relativo a la formación de las betaxantinas, los pigmentos violeta (betacianinas) se producen cuando el ácido betalámico se condensa con el grupo imino de *ciclo*-DOPA, conduciendo a la formación de betanidina o isobetamidina, estructuras básicas de las betacianinas (Strack *et al.*, 2003; Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Ambas moléculas difieren únicamente en la configuración absoluta de su centro quiral C-15 (Wilcox *et al.*, 1965). En otra vía, se conduce a la formación directa de betanina a partir de la condensación del ácido betalámico con *ciclo*-DOPA glucósido (Sasaki *et al.*, 2004). Por otro lado, el ácido betalámico puede condensarse con tirosina, sustrato inicial de la ruta, dirigiendo la formación de tirosina-betaxantina directamente (Gandía-Herrero *et al.*, 2005).

Se ha propuesto una vía alterna de síntesis de betalaínas a partir de tiramina/dopamina, en donde el 2-descarboxiciclo-DOPA, resultado de la oxidación de dopamina, se conjuga con el ácido betalámico dando como resultado la formación de 2-descarboxil-betandina (Gandía-Herrero *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2001).

La modificación estructural de las betacianinas y betaxantinas a partir de reacciones de glucosilación y acilación llevan a la formación de una amplia variedad de betalaínas (Strack *et al.*, 2003).

Existen algunos reportes sobre la arogenato deshidrogenasa en plantas (Connelly y Conn, 1986; Gaines *et al.*, 1982; Byng *et al.*, 1981), que indican que su actividad enzimática se localiza en el compartimento cloroplástico. La arogenato deshidrogenasa (TyrAa) cataliza el paso más importante de la ruta de biosíntesis de las betalaínas, la cual parte desde L-tirosina, evento que impacta directamente en la regulación de la síntesis de este aminoácido. La disponibilidad de L-tirosina en plantas suele estar muy regulada a nivel de esta enzima (TyrAa) (López-Nieves *et al.*, 2018), ya que ésta controla el flujo de carbono entre las dos vías competitivas de la tirosina y la fenilalanina (Rippert y Matringe, 2002; Gaines *et al.*, 1982).

De modo que sí este evento catalítico pudiera ser modulado, el control de la arogenato deshidrogenasa (TyrAa) abriría una puerta de enlace prospectiva para la posible sobreproducción de metabolitos derivados de tirosina en plantas (Schenck *et al.*, 2015). Un paso necesario en la sobreproducción de metabolitos especializados derivados de la

tirosina en las plantas, es la manipulación del metabolismo primario para mejorar la disponibilidad de la tirosina (Timoneda *et al.*, 2018).

Hasta la fecha, todos los métodos aplicados para sintetizar químicamente betalaínas han sido deficientes, debido a la complejidad en los pasos involucrados en la síntesis de ácido betalámico y por consiguiente, la obtención de rendimientos muy bajos (Gandía-Herrero *et al.*, 2016; Schliemann *et al.*, 1999).

El betabel ha sido el modelo de estudio principal para la producción *in vitro* de betalaínas, a partir de sistemas de cultivo de células y raíces transformadas (Pavlov *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2002; Leathers *et al.*, 1992). Sin embargo, debido a su alta concentración en nitratos y un sabor terroso desfavorable ocasionado por la presencia de geosminas y otras pirazinas (Stintzing y Carle, 2007; Lu *et al.*, 2003), se han considerado otras fuentes de pigmentos betalámicos.

1.2.1.1 L-TIROSINA

La L-tirosina (Tyr) es un aminoácido aromático, que es indispensable para la síntesis de proteínas en todos los organismos; sin embargo, sólo es sintetizado *de novo* en plantas y microorganismos. En las plantas, la tirosina también sirve como precursor de una gran variedad de metabolitos especializados que tienen diversos roles fisiológicos, como portadores de electrones, antioxidantes, atrayentes y compuestos de defensa (Schenck y Maeda, 2018).

En animales, la tirosina necesita ser obtenida a través de la alimentación o a partir de la hidroxilación de fenilalanina (Phe) por la enzima fenilalanina hidroxilasa (PheH) (Privat *et al.*, 2010). La tirosina es sintetizada río abajo en la ruta del shikimato, la cual también provee precursores para los otros aminoácidos aromáticos: fenilalanina (Phe) y triptófano (Trp) (Boerjan *et al.*, 2003).

La síntesis de este aminoácido inicia a partir del prefenato, resultado del producto final de la ruta del shikimato, el corismato (Tzin y Galili, 2010), en donde, el corismato es primero convertido en prefenato por la intervención de una corismato mutasa (CM), la cual cataliza el paso comprometido para la continuación de la biosíntesis de tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe). A diferencia de las bacterias y hongos, el prefenato es descarboxilado

oxidativamente a 4-hidroxifenilpiruvato (HPP) por una prefenato deshidrogenasa (PDH), el cual es transaminado a tirosina (Bentley y Haslam, 1990), en plantas ocurre primero la transaminación del prefenato a arogenato y subsecuentemente, es descarboxilado para producir tirosina por una arogenato deshidrogenasa (TyrAa) (Rippert *et al.*, 2009; Rippert y Matringe, 2002), ambos eventos ocurren en los plástidos.

La vía de síntesis de tirosina está con frecuencia altamente regulada por la prefenato deshidrogenasa (PDH) en bacterias o la arogenato deshidrogenasa (ArDH) en plantas. Ambas enzimas homólogas son fuertemente inhibidas por la propia tirosina y controlan el flujo de carbón entre las dos rutas competentes: tirosina y fenilalanina (Rippert y Matringe, 2002; Gaines *et al.*, 1982).

1.2.1.2 AROGENATO DESHIDROGENASA (TyrAa)

A diferencia de los microorganismos, que generalmente utilizan la vía del hidroxifenilpiruvato (HPP) para producir tirosina (Christendat *et al.*, 1998; Bentley, 1990), en las plantas, la síntesis ocurre a través de la vía del arogenato (Tzin y Galili, 2010; Siehl, 1999).

Un paso clave en la regulación de la síntesis de tirosina en plantas está mediada por una reacción de descarboxilación oxidativa irreversible, catalizada por la arogenato deshidrogenasa (TyrAa), una enzima oxido-reductasa, perteneciente a la familia de proteínas TyrA, en la que también se incluye la prefenato deshidrogenasa (TyrAp) y la ciclohexadienil deshidrogenasa (TyrA(p)) (Bonner *et al.*, 2004).

La conversión del arogenato a tirosina por la arogenato deshidrogenasa sucede a partir de dos procesos químicos: en el primero, el grupo carboxilo del anillo sale para formar CO₂, que es posteriormente liberado y segundo, una His catalítica promueve la transferencia de un hidruro del sustrato al C4 del anillo de NAD(P)⁺ (Sun *et al.*, 2006; Christendat *et al.*, 1998; Hermes *et al.*, 1984).

La arogenato deshidrogenasa (TyrAa) es crítica en la regulación de la síntesis de tirosina. Ésta, junto a su homóloga la prefenato deshidrogenasa (TyrAp), se inhibe fuertemente por retroalimentación de tirosina y controla el flujo directo de carbono hacia la síntesis de

tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe) (Rippert y Matringe, 2002; Bentley, 1990; Gaines *et al.*, 1982).

1.2.1.3 POLIFENOL OXIDASA (PPO)

Hasta hace poco, no había evidencia directa de la identificación de los genes y enzimas responsables de catalizar los primeros pasos en la vía biosintética de las betalainas: la hidroxilación de L-tirosina a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y la subsecuente oxidación de L-DOPA para formar ciclo-DOPA.

Algunos autores han propuesto que ambos eventos son realizados por una polifenol oxidasa bifuncional (PPO) (Gandía-Herrero *et al.*, 2004; Strack *et al.*, 2003; Strack y Schliemann, 2001; Steiner *et al.*, 1999), la cual cataliza dos reacciones distintas y continuas en presencia de oxígeno molecular: la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles (EC 1.14.18.1; actividad de tirosina hidroxilasa o actividad de monofenolasa) y su posterior oxidación a las o-quinonas correspondientes (EC 1.10.3.1; actividad difenolasa) (Hatlestad *et al.*, 2012). Se han purificado PPOs con actividad tanto bifuncional como monofuncional, a partir de ensayos *in vitro* en *Portulacca grandiflora* y *Beta vulgaris* (Gandía-Herrero *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2001; Steiner *et al.*, 1999); sin embargo, no hay evidencia sólida de su papel en la biosíntesis de betalainas *in vivo* (Nakatsuka *et al.*, 2013).

Recientemente, se ha identificado el linaje CYP76AD, perteneciente a las citocromo P450 (CYP450), como responsable de la catálisis de estos dos pasos. A partir de análisis filogenéticos, se determinó que CYP76AD se concentra en tres clados, debido a una duplicación de genes a lo largo del orden de las Caryophyllales: CYP76AD alfa (α), CYP76AD beta (β) y CYP76AD gamma (γ) (Brockington *et al.*, 2015).

CYP76AD1 y CYP76AD3, pertenecientes a CYP76AD α , catalizan la formación de L-DOPA y posteriormente, ciclo-DOPA; mientras que CYP76AD5, CYP76AD6 y CYP76AD15, del clado CYP76AD β , catalizan únicamente la formación de L-DOPA (Polturak *et al.*, 2016; Sunnadeniya *et al.*, 2016; Hatlestad *et al.*, 2012). En cuanto al clado CYP76AD γ , todavía no se ha identificado ninguna función en ninguno de los homólogos pertenecientes a éste.

El descubrimiento de los nuevos genes involucrados en los primeros eventos de síntesis ha permitido el avance en el control de la actividad con el objetivo de acceder a toda la paleta de colores de betalaínas observadas en las plantas (Timoneda *et al.*, 2019).

1.2.1.4 4,5-EXTRADIOL DIOXIGENASA (DODA)

El paso siguiente en la vía biosintética de las betalaínas a partir de la formación del ácido betalámico, cromóforo central común, es catalizado por la enzima 4,5-extradiol-dioxigenasa (DODA). El mecanismo de acción de DODA comienza con la apertura del anillo cíclico de L-DOPA entre los carbonos 4 y 5, produciendo así un 4,5-seco-DOPA inestable, que posteriormente se tautomeriza de forma no enzimática, a partir de una transferencia de protones y la liberación de agua, derivando en formación del ácido betalámico (Contreras-Llano *et al.*, 2019; Christinet *et al.*, 2004).

La 4,5-extradiol-dioxigenasa está codificada por el gen *doda*, miembro de la familia de genes *LigB* (Christinet *et al.*, 2004). Algunos reportes recientes proveen evidencia sobre dos clados de *Doda* en plantas productoras de betalaínas, resultado de un evento de duplicación génica en el linaje de genes *Ligb/Doda*, ocurrida durante la evolución del orden Caryophyllales, dando lugar a los clados *Doda α* y *Doda β* (Brockington *et al.*, 2015).

Al día de hoy, se han caracterizado enzimas con actividad DODA en especies no productoras de betalaínas; sin embargo, estos productos génicos no parecen ser capaces de realizar la escisión 4,5-extradiol de la estructura del anillo aromático de L-DOPA, por lo que se sugiere que éstas tienen un papel en el metabolismo de compuestos aromáticos, debido a las propiedades estructurales conservadas en sus sitios catalíticos (Bean, 2017; Bahramnejad *et al.*, 2010; Christinet *et al.*, 2004).

Recientemente, se han caracterizado pares de parálogos de *doda* en dos especies productoras de betalaínas: *Beta vulgaris* (*BvDoda1* y *BvDoda2*) y *Mirabilis jalapa* (*MjDoda1* y *MjDoda2*), los cuales demostraron que los ortólogos *Doda1* son funcionales en la vía de las betalaínas, mientras que los *Doda2*, no (Bean, 2017).

1.2.2 FUENTES DE BETALAÍNAS

Las betalaínas se presentan en la mayoría de plantas de la familias del orden de las Caryophyllales y en algunos hongos de orden superior, como en *Amanita muscaria* y en algunos géneros de basidiomicetos. Las principales fuentes comestibles de betalaínas son el betabel (*Beta vulgaris* L.) y las acelgas, los frutos de los cacti como las tunas (*Opuntia* Mill.), las pitayas (*Stenocereus* (A. Berger) Riccob) y pitahayas (*Hylocereus* (A. Berger) Britton & Rose), además de algunas variedades de amaranto (*Amaranthus* L.). (Azeredo, 2009; Stintzing *et al.*, 2003; Moßhammer *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 1998).

El betabel ha servido como una fuente primordial en el procesamiento de colorantes naturales para uso en productos alimenticios, según lo aprobado por la Unión Europea (E162) y las regulaciones alimentarias de EEUU (Título 21 del Código de Regulaciones Federales, 21 CFR 73.40) (Castellar *et al.*, 2003). No obstante, su empleo en altas concentraciones puede afectar de manera negativa las características sensoriales del producto, proporcionando un sabor desagradable, debido a la presencia de geosminas y derivados de pirazina (Bach *et al.*, 2015; Georgiev *et al.*, 2010).

En los últimos años, se ha explorado la viabilidad técnica y comercial de los sistemas *in vitro* para producir betalaínas biotecnológicamente. La mayoría de las actividades de investigación han incluido evaluaciones de enfoques novedosos para el cultivo de cultivos de células o tejidos vegetales, y el uso de diversos sistemas para incrementar los niveles de producción de metabolitos secundarios (Georgiev *et al.*, 2008).

Los recientes avances en genética molecular, bioinformática y diseño de proteínas han abierto la oportunidad de realizar ingeniería metabólica partiendo de rutas y enzimas existentes (Erb *et al.*, 2017). La reciente caracterización de la hidroxilación de tirosina a L-DOPA, primer paso comprometido de la ruta biosintética, ha permitido los primeros trabajos como la producción de betalaínas en sistemas heterólogos (Guerrero-Rubio *et al.*, 2019; Grewal *et al.*, 2018; Polturak *et al.*, 2016; Sunnadeniya *et al.*, 2016) ampliando las perspectivas sobre el progreso de la ingeniería metabólica de estos pigmentos.

1.3 FAMILIA CACTACEAE

Las plantas de la familia Cactaceae han desarrollado características anatómicas, morfológicas y fisiológicas para sobrevivir en ambientes áridos o semiáridos, donde el agua es el principal factor limitante para las especies vegetales (Nazareno, 2014; Gibson y Nobel, 1986).

Uno de los ejemplos más significativos de esta adaptación es su notable actividad biológica ante el ataque de especies reactivas de oxígeno a partir de la producción compuestos fitoquímicos que, a su vez pueden desempeñar un papel protector o curativo contra el cáncer, la diabetes, enfermedades neurodegenerativas y otros padecimientos agudos y crónicos (Harlev *et al.*, 2013).

Varias especies de cactus producen frutos con un alto valor nutricional, así como una gran cantidad de metabolitos que son de interés para las industrias farmacéutica, alimenticia y cosmética, entre los que se encuentran las betalainas (Noé *et al.*, 2019) presentes en frutos producidos por algunos géneros como *Opuntia*, *Stenocereus*, *Hylocereus* y algunas otras cactáceas medianamente conocidas.

1.3.1 *Stenocereus* (A. Berger) Riccob

Stenocereus (A. Berger) Riccob es un género perteneciente a la familia Cactaceae. Los cactus de este género producen frutos comestibles, tradicionalmente denominados “pitayas”, los cuales han adquirido valor comercial como frutos exóticos. Este género comprende aproximadamente 24 especies, productoras de frutos altamente comestibles, con una distribución geográfica que va desde el límite sur de los Estados Unidos hasta Venezuela (Rebollar *et al.*, 1997).

En México, *Stenocereus* (A. Berger) Riccob agrupa de 19 a 20 especies distribuidas casi en todo el territorio (Sánchez-Mejorada, 1973), y de éstas, las más cultivadas son: *S. thurberi* (Elgem.) Buxb., *S. griseus* (Haw.) Buxb., *S. stellatus* (Pfeiff.) Riccob., *S. fricci* Sánchez-Mej. y *S. queretaroensis* (Weber.) Buxbaum, siendo ésta última la que más se aprovecha, debido a la disponibilidad de variedades y su productividad (Cruz-Arriaga *et al.*, 2015; Arreola-Nava. 2006).

Stenocereus queretaroensis (Weber) Buxbaum es una cactácea columnar arborescente, con tronco bien definido que puede llegar a medir hasta ocho metros de altura (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978). Sus ramas son cilíndricas y poseen ocho costillas prominentes. Sus flores se diferencian en las aréolas de la mitad superior de las ramas. La forma de su fruto puede variar y su maduración se da durante la primavera (Figura 1.4) (Salcedo y Arreola, 1991).



Figura 1.4 Planta y pitaya de *Stenocereus queretaroensis*. (Fotografías: Dante Figueroa)

Las pitayas de *S. queretaroensis* son frutos que pesan entre 100 y 200 g, su forma es ovoide o globosa, cubiertos por una cáscara generalmente suave, que tienen areolas con espinas, las cuales se pierden durante la maduración (Pimienta-Barrios *et al.*, 1997). La pulpa de las pitayas es jugosa y muy dulce, y contiene semillas generalmente muy pequeñas, piriformes, de color negro. Las betacianinas y betaxantinas presentes en el fruto proporcionan un color intenso y atractivo, el cual se puede considerar como un indicador importante para la clasificación de sus variedades, las cuales pueden tener coloraciones que van desde el rojo púrpura al amarillo y rara vez, verdosos. Las variedades hasta ahora identificadas poseen pulpa blanca, amarilla, morada, solferina, roja, guinda y mamey (Sáenz, 1995).

1.3.2 *Stenocereus queretaroensis*

Stenocereus queretaroensis parece ser un modelo prometedor para la obtención de betalaínas, a partir de sus frutos, los cuales acumulan cantidades significativas de betalaínas (Miranda-Ham *et al.*, 1999). A pesar de ello, el lento ciclo de desarrollo y naturaleza estacional de esta cactácea limitan ampliamente la posibilidad de obtener estos pigmentos a partir de sus frutos. Por lo que el desarrollo de tecnologías, como el cultivo de tejidos vegetales, coadyuvaría a subsanar en gran medida el posible desabasto de materia prima, abriendo nuevas posibilidades, tanto para el estudio de su biosíntesis, como para la optimización de su obtención.

El empleo de pigmentos extraídos de las pitayas presenta algunas ventajas en contraste con los extraídos de betabel, puesto a que se pueden aplicar en gran variedad de alimentos sin afectar el sabor del mismo (Azeredo, 2009). Además, el espectro de coloración de las betalaínas extraídas de cactáceas va desde el amarillo hasta el naranja y del rojo a violeta, en comparación con pigmentos obtenidos de otras fuentes.

Con fundamento en ciertos atributos como la insipidez, el amplio espectro de color, la hidrosolubilidad y las varias propiedades bioactivas de las betalaínas extraídas de las pitayas, éstas ofrecen una ventana prometedora para su explotación a gran escala.

En años recientes, se ha conseguido producir metabolitos derivados de tirosina en algunos hospederos microbianos, lográndose un progreso considerable en la manipulación de la regulación metabólica (Rodríguez *et al.*, 2014). Sin embargo, por lo que sabemos, aún no se han demostrado los mecanismos para intervenir en la regulación metabólica de tirosina y productos siguientes en plataformas de plantas acopladas a la sobreproducción de metabolitos derivados de tirosina (Timoneda *et al.*, 2018).

1.4 Recapitulación

El uso de pigmentos de origen vegetal se remonta desde los primeros días de humanidad, estando presentes en productos como telas, comidas y bebidas; sin embargo, a través del tiempo fueron reemplazados por compuestos artificiales muchos más baratos y fáciles de obtener. No obstante, la evidencia de los efectos nocivos sobre la salud humana de los colorantes sintéticos ha reenfocado la búsqueda, extracción y aplicación de pigmentos de

origen vegetal para los productos de consumo habitual. Las betalaínas son un grupo de pigmentos amarillos y violetas presentes en algunas familias vegetales, los cuales han demostrado una gran versatilidad en la industria alimentaria, dado a su estabilidad ante un amplio rango de pH y temperatura que posibilitan su aplicación en un amplio grupo de productos, además de las recientemente evidencias de sus actividades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas.

En la naturaleza, la síntesis de estos pigmentos implica una serie de reacciones de descarboxilación, hidroxilación y condensación mediadas por enzimas claves que hasta hoy no ha sido posible replicar mediante la síntesis química. El conocimiento de las vías metabólicas en algunas especies productoras de betalaínas ha posibilitado el progreso de la obtención de estos pigmentos a partir de la ingeniería metabólica.

De acuerdo a lo anteriormente planteado, este trabajo propone analizar la expresión de algunos genes que se encuentran involucrados en la síntesis de betalaínas en diferentes etapas del ciclo celular de una línea de células en suspensión de *Stenocereus queretaroensis*, con el propósito de comprender los eventos de regulación del metabolismo de estos pigmentos en la especie.

JUSTIFICACIÓN

El avance logrado en relación al conocimiento sobre las vías de síntesis y regulación para la obtención de metabolitos especializados, como las betalainas, es hasta ahora moderado, por lo que todavía quedan muchas incógnitas por resolver.

La acumulación de estos metabolitos se ve directamente influenciada por procesos altamente regulados que se dan durante las primeras fases de la vía de síntesis. La poca relevancia que se ha dado a los eventos de regulación de la síntesis de tirosina ha abierto una opción para mejorar la producción de este metabolito. La intervención de algunas enzimas dentro de la vía de biosíntesis podría ser clave y tener efectos altamente positivos en cuanto a la obtención de betalainas. Con base en este hecho, estrategias de identificación enzimática, así como el estudio de su regulación, serían de gran impacto para coadyuvar en el conocimiento de la síntesis de estos pigmentos.

Algunas especies del orden de las Caryophyllales han mostrado ser candidatos ideales para la ingeniería metabólica por su capacidad de sintetizar betalainas; no obstante, algunos inconvenientes se hacen presentes durante su estudio. *S. queretaroensis*, una cactácea mexicana perteneciente a este orden, produce frutos denominados pitayas, los cuales acumulan cantidades significativas de betalainas, característica que le permite ser considerada un modelo idóneo en la producción de estos pigmentos.

A pesar de las enormes ventajas que presenta esta cactácea como especie potencial, su lento ciclo de desarrollo y su naturaleza estacional limitan la posibilidad de obtener estos pigmentos de manera continua, directamente de sus frutos. Por lo que, el manejo de tecnologías, como el cultivo de tejidos *in vitro*, se ha propuesto como una alternativa que podría coadyuvar a remediar en gran medida el posible desabasto de materia prima, abriendo amplias posibilidades, tanto como el estudio de la biosíntesis de sus pigmentos, así como para su optimización como una plataforma de producción alternativa de metabolitos.

HIPÓTESIS

La expresión de los genes involucrados en ciertas etapas biosintéticas de las betalaínas cambia de acuerdo al ciclo de crecimiento de las células de *S. queretaroensis*. Estos cambios en la expresión se verían reflejados en la acumulación de estos pigmentos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de los genes: arogenato deshidrogenasa (*tyrAa*), polifenol oxidasa (*ppo*) y 4,5-extradiol dioxigenasa (*doda*), involucradas en etapas decisivas de la biosíntesis de betalaínas en células en suspensión de *S. queretaroensis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cuantificar la acumulación de las betalaínas en etapas específicas del ciclo de cultivo.

Analizar la presencia de transcritos de los genes de interés en la línea celular de *Stenocereus queretaroensis*.

Establecer si existe una relación entre la acumulación de betalaínas y la expresión de los genes de interés.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En este trabajo, se utilizaron como modelo experimental células en suspensión de *S. queretaroensis* establecidas a partir un fruto inmaduro traído de Querétaro. Se cuenta con dos líneas de células que producen betalainas: *SqR1* produce pigmentos rojo-violetas (betacianinas) y *SqY1* produce pigmentos amarillos (betaxantinas). De acuerdo a los objetivos planteados, se propuso la siguiente estrategia experimental (Figura 1.5):

Se realizaron curvas de cultivo para ambas líneas celulares de *S. queretaroensis*, en las que además de determinar los parámetros de crecimiento, se llevó a cabo la cuantificación de betalainas totales, así como de betaxantinas y betacianinas.

Se estandarizó un protocolo de extracción de ARN a partir de las células de ambas líneas, que facilite la obtención de un ARN íntegro y puro.

Con base en los datos obtenidos de los experimentos anteriores, se determinaron aquellas etapas (o días) de muestreo para determinar los niveles de expresión de los genes elegidos por ensayos de PCR punto final.

Posteriormente, se utilizaron las bases de datos transcriptómicas de *S. queretaroensis* para elegir secuencias de genes de interés (*tyrAa*, *ppo* y *doda*) y algunos genes constitutivos. Las secuencias seleccionadas fueron consideradas para el diseño de cebadores específicos a partir de plataformas de uso libre, en donde se asignaron por lo menos dos pares de cebadores para cada secuencia. Se confirmó la amplificación de los productos a partir de los cebadores diseñados, mediante ensayos de retrotranscripción.

Finalmente, se trató de relacionar los datos de acumulación de betalainas y los de niveles de expresión de los genes en estudio.

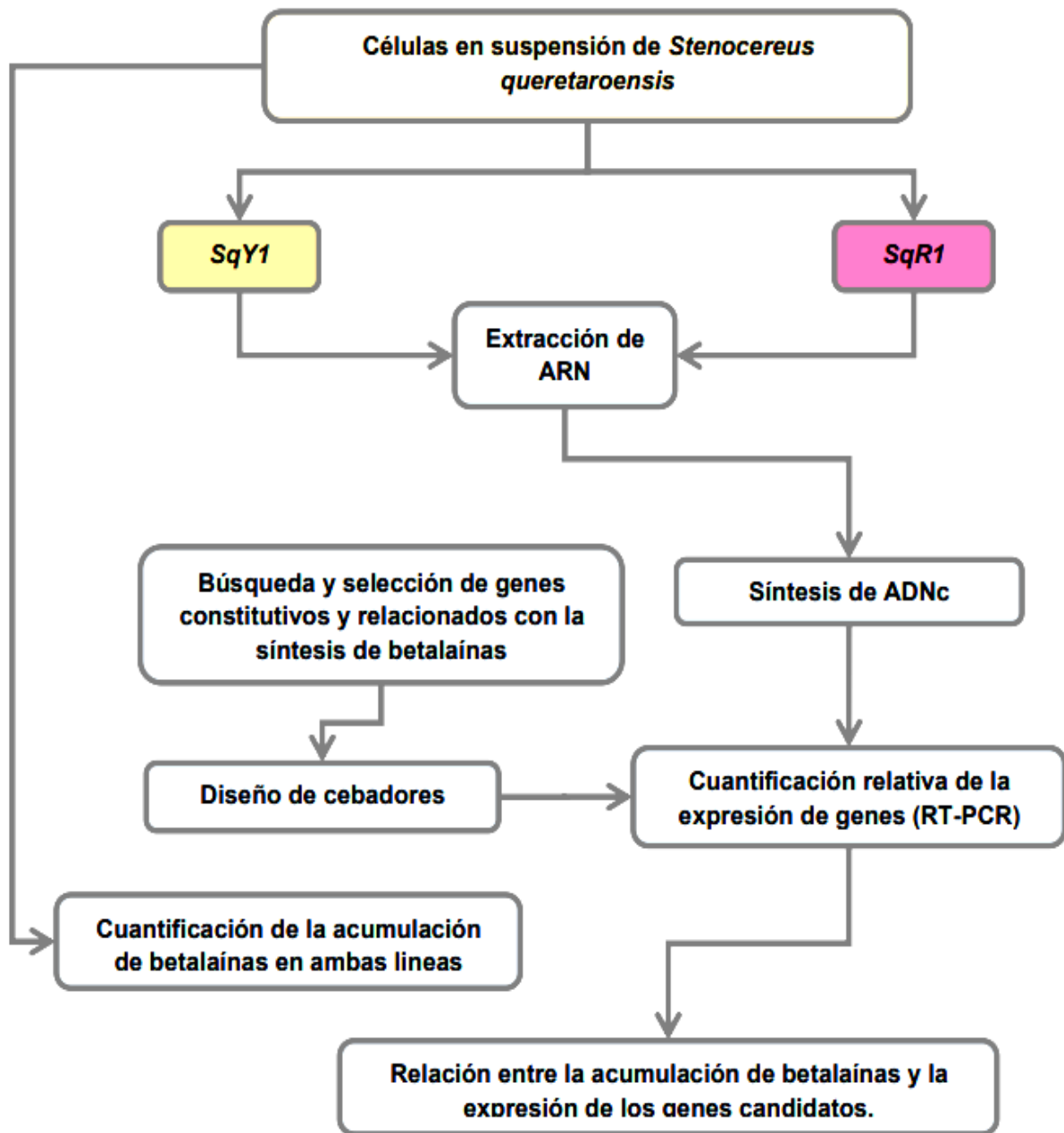


Figura 1.5 Estrategia experimental planteada.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico empleado para este estudio fue en principio, dos líneas de células en suspensión de *S. queretaroensis* (Weber) Buxbaum, previamente establecidas a partir de un fruto inmaduro de pitaya, traído de Querétaro (Miranda-Ham *et al.*, 1999). Ambas líneas se han mantenido en un medio Murashige y Skoog adaptado para cactáceas, basado en sales inorgánicas del MS (Sigma M5524), con una concentración total de calcio de 4.4 μM y que omite la adición posterior tanto el ácido nicotínico como la glicina entre los constituyentes orgánicos del mismo medio. Así mismo, contiene sacarosa al 3% (p/v) como fuente de carbono y como fitorreguladores: ácido 1-naftalenacético (5.3 μM), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (4.5 μM) y cinetina (4.6 μM). El pH del medio está ajustado a 5.8 ± 0.02 .

Cada línea produce mayoritariamente una clase de betalaínas en particular: la línea SqR1 produce pigmentos rojo-violetas (betacianinas) y la línea SqY1, pigmentos amarillos (betaxantinas) (Figura 2.1).



Figura 2.1 Líneas celulares empleadas para la cuantificación de betalaínas y de ácidos nucleicos. A la izquierda, se muestra la línea SqY1 y a la derecha, la línea SqR1.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 DETERMINACIÓN DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO

De acuerdo con los datos documentados sobre el crecimiento de ambas líneas, la fase de adaptación se presenta hasta día 8 de haber iniciado el ciclo, luego, entran a la fase exponencial hasta el día 22 y finalmente, se concluye con las fases estacionarias y de decaimiento celular. A partir de esto, se determinaron curvas de crecimiento para ambas líneas, con el fin de definir las etapas de máxima acumulación de betalaínas en cada línea y establecer los períodos específicos para la realización de la cuantificación de los transcritos de los genes candidatos.

Para realizar el ciclo de cultivo, se preparó una suspensión madre inicial, incorporando 15 matraces con células en suspensión de cada línea a un matraz Erlenmeyer de un litro (en condiciones asépticas). Una vez homogenizada la suspensión madre, se transfirieron 10 mL de la suspensión, equivalentes a 1.8 ± 0.2 g de peso fresco, a cada uno de los matraces Erlenmeyer de 250 mL con 40 mL del medio de cultivo MS modificado para cactáceas, previamente esterilizados. Al finalizar la inoculación, los matraces fueron transferidos al cuarto de cultivo bajo luz continua, a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 125 rpm tomándose dos matraces en los tiempos previamente determinados.

Se muestrearon ambas líneas al comienzo de la curva (día 0) y después, cada cuatro días (4, 8, 12, 16, 20 y 24). Las muestras fueron colectadas por filtración al vacío. Las células se colocaron en papel aluminio, formando paquetes de 0.5 g, los cuales fueron congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -80°C en el ultracongelador hasta la realización de los análisis.

2.2.2 CUANTIFICACIÓN DE LAS BETALAÍNAS

El contenido de betalaínas correspondiente a cada línea fue determinado, empleando el método espectrofotométrico reportado por Stintzing y colaboradores (Stintzing *et al.*, 2003). En corto, se extrajeron los pigmentos correspondientes a cada día de muestreo, moliendo las células en un mortero de porcelana frío hasta obtener un polvo fino. El pulverizado final se transfirió a un tubo de ensayo y se añadió etanol grado reactivo en una proporción 1:5 (p/v). Con ayuda del politrón, la muestra se homogeneizó durante 2

minutos, con el fin de romper las paredes celulares y luego, se centrifugó a 13000 rpm durante 20 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de ensayo nuevo, el cual se empleó para llevar a cabo la cuantificación de los pigmentos, utilizando la siguiente fórmula:

$$CB \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{A(PM)V(FD)}{\epsilon LP}$$

Donde CB es el contenido de betalaínas en mg g⁻¹ PF; V es el volumen en mL del extracto obtenido; FD, el factor de dilución; L, la longitud del paso óptico en cm y P, el peso de la muestra en gramos. A es la absorbancia medida a 538 nm y a 480 nm para betacianinas y betaxantinas, respectivamente; PM es la masa molecular, para betanina (550 g/mol) e indicaxantina (308 g/mol);, la absortividad molar, para betanina (60000 L/mol x cm) e indicaxantina (48000 L /mol x cm).

Los resultados obtenidos en la cuantificación se analizaron, obteniéndose los promedios finales de las tres repeticiones por cada experimento.

2.2.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *tyrAa*, *ppo* y *doda*

El análisis de la expresión de los genes *tyrAa*, *ppo* y *doda* se realizó por PCR de punto final, asimismo se utilizó el gen constitutivo factor de elongación (EF-1 α) como control de las reacciones de PCR. Se. Para ello, se obtuvo el RNA de las células de *S. queretaroensis* en las etapas de crecimiento celular establecidas y se emplearan cebadores específicos para el transcrito a analizar.

2.2.3.1 EXTRACCIÓN DE RNA

Células de cada línea fueron colectadas en etapas específicas del ciclo de crecimiento, con base en la cuantificación de betalaínas. La colecta de las muestras se realizó mediante filtración al vacío, en donde 0.1 g de células fueron depositadas en criotubos de 20 μ L (CRYOKING®) y finalmente, almacenadas a -80 °C hasta su uso.

Para la extracción de RNA total, se utilizó el protocolo de Chomczynski y Sacchi (1987), con ligeras modificaciones. Inicialmente, se usaron 0.1 g por muestra de células almacenadas a -80 °C de cada línea y día, homogeneizadas individualmente en tubos Eppendorf de 1.5 mL, en 750 µL del reactivo Trizol (Life Technologies™) con perlas de vidrio y agitadas en el vórtex.

El tejido se homogeneizó manualmente con 300 µL de cloroformo y se incubó en hielo durante 3 min. Posteriormente, las fases se separaron centrifugando a 12,000 x g durante 15 min a 4°C, la fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo al que se le añadieron 500 µL de isopropanol, se agitó e incubó a temperatura ambiente durante 10 min, la mezcla se centrifugó a 12,000 x g durante 15 min a 4°C, desechándose cuidadosamente el sobrenadante.

Se lavó la pastilla de RNA en 1000 µL de etanol al 70%, se agitó en vórtex y se centrifugó a 7,500 x g durante 5 min. Se realizaron tres lavados consecutivos de la pastilla, añadiendo 100 µL de etanol al 70% y centrifugando a 8,000 x g durante 5 min a 4°C cada vez. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 30 µL de agua con dietilpirocarbonato (DEPC) y se almacenó a -22°C hasta su uso.

Alternativamente, se extrajo RNA utilizando el paquete de extracción PureLink™ RNA Mini Kit (invitrogen®), en donde se utilizó la misma cantidad de muestra (0.1 g) y los mismos primeros pasos del protocolo estándar (Chomczynski y Sacchi, 1987) hasta obtener la mezcla de isopropanol, de la cual se transfirieron 700 µL a un cartucho nuevo (PureLink™ RNA Mini Kit) y se centrifugó a 12,000 x g durante 15 seg, se desechó cuidadosamente el sobrenadante de la parte inferior del tubo, y se repitió este proceso hasta completar toda la mezcla. Se añadieron 700 µL del amortiguador de lavado I y se centrifugó a 12,000 x g durante 15 seg, descartándose el precipitado.

Se transfirió el cartucho a un tubo de colección nuevo y se añadieron 500 µL del amortiguador de lavado II, centrifugando a 12,000 x g durante 15 seg, se descartó el precipitado y se repitió el proceso. Se centrifugó el tubo con el cartucho a 12,000 x g durante 1-2 min para secar la membrana con el RNA y se descartó el tubo de colección.

Se reinsertó el cartucho en un tubo de recuperación nuevo y se añadieron cuidadosamente 50 µL de agua libre de RNAsas en el centro del cartucho, se incubó a TA durante 1 min y se centrifugó durante 2 min. Finalmente, se colectó el eluato en un tubo Eppendorff y se almacenó a -22°C.

La concentración y pureza del RNA obtenido en cada método de extracción se confirmó por espectrofotometría ($A_{260}/A_{280} = 2.0$, una proporción de 2.0 asegura una extracción pura) en un NanoDrop-1000 (ThermoScientific®). La integridad y calidad del RNA total se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR® Gold nucleic acid gel stain (Invitrogene®).

2.2.3.2 DISEÑO DE CEBADORES

En el principio, cuando todavía no se contaba con el transcriptoma de *S. queretaroensis* para el diseño de los cebadores, éstos se obtuvieron a partir de las secuencias codificantes reportadas en algunas especies del orden de las Caryophyllales, en específico de *Beta vulgaris* (betabel), debido a que era la información disponible sobre la especie más cercana a nuestro modelo de estudio.

Con base en las secuencias obtenidas del betabel, se diseñaron oligonucleótidos para el gen de arogenato deshidrogenasa (*arDH*) y los genes de referencia de actina (*act*), tubulina (*tub*) y ubiquitina (*ubq*), utilizando programas de alineamiento y análisis de las secuencias, como nBLAST y MEGA 10 (Cuadro 2.1). El diseño de los cebadores se realizó empleando Primer3. Los parámetros que se consideraron para su diseño fueron: Tm de 60°C, contenido de GC de 45±55%, longitud del cebador de entre 18 y 22 bases y un producto amplificado de máximo 150 bases de longitud.

| Cebador | Bases | Secuencia | Tm | %GC | Amplicón |
|---------|-------|------------------------|-------|------|----------|
| ADHF1 | 21 | TGGTGGATAATACGTCTGAAGG | 59.83 | 47.6 | 104 |
| ADHR1 | 20 | CTCAAACGCCCAATCTAACC | 58.57 | 50 | |
| ADHF2 | 20 | ACGCCGATTAATACGAAAGG | 59.1 | 45 | 142 |
| ADHR2 | 20 | CAAACGCCCAATCTAACCTC | 59.57 | 50 | |
| ACTF1 | 20 | GAATCAGAGACCGCCAAGAG | 59.95 | 55 | 142 |
| ACTR1 | 20 | CAGCGGACTCCATACCAACT | 60.13 | 55 | |
| ACTF2 | 20 | TGCTCAGTGGTGGTTCAACT | 59.31 | 50 | 138 |
| ACTR2 | 20 | ACCCTCCAATCCAGACACTG | 59.96 | 55 | |
| TUB-BF1 | 20 | GAGTTCACCGAGGCTGAGAG | 60.1 | 60 | 103 |
| TUB-BR1 | 21 | CCTCTTCCTCGTCTCGTACT | 59.9 | 57.1 | |
| TUB-BF2 | 20 | CATTGGTACACTGGGGAAGG | 60.2 | 55 | 136 |
| TUB-BR2 | 21 | CCTCTTCCTCGTCTCGTACT | 59.9 | 57 | |
| UBQF1 | 20 | GAGGAACCGCACACTGGTAT | 60 | 55 | 131 |
| UBQR1 | 20 | GGCATTCCCTTGGACTTCTGA | 60.2 | 50 | |
| UBQF2 | 20 | TTGATGTGGATGGTGAGGAA | 59.9 | 45 | 149 |
| UBQR2 | 20 | TTCTGGCATTCCCTTGGACTT | 59.7 | 45 | |

Cuadro 2.1 Cebadores diseñados a partir de secuencias codificantes de *Beta vulgaris*.

Una vez que se contó con el transcriptoma secuenciado del modelo de estudio fue posible diseñar cebadores específicos a partir de algunos genes de interés, como arogenato deshidrogenasa (*tyrAa*), polifenol oxidasa (*ppo*) y 4,5-extradiol dioxigenasa (*doda*), además del diseño de los cebadores específicos de los genes de referencia: actina 7 (*act7*), beta tubulina (*btub*), ubiquitina c (*ubc*) y el factor de elongación 1 alfa (*ef1*). El diseño de estos cebadores se realizó considerando los mismos parámetros del primer conjunto de cebadores diseñados con anterioridad (Cuadro 2.2).

| Cebador | Bases | Secuencia | Tm | %GC | Amplicón |
|-------------------|-------|--------------------------|---------|------|----------|
| <i>AroDHa-FW1</i> | 20 | ACAACCTCACTGGGCATCTTC | 62.1 °C | 50 | 136 pb |
| <i>AroDHa-RV1</i> | 22 | CTCTGGGAGCATAAGTTTCCTG | 62.3 °C | 50 | |
| <i>AroDHa-FW2</i> | 18 | GCCGAGCACGATAAGCAT | 64.5 °C | 55.6 | 139 pb |
| <i>AroDHa-RV2</i> | 22 | CTGTGTTGTCCACTAAGTTCCT | 64.1 °C | 45.1 | |
| <i>PPO-FW1</i> | 21 | ACCACCAACCTCCAACAATAG | 62.2 °C | 47.6 | 148 pb |
| <i>PPO-RV1</i> | 20 | TGCCCTAGAAATAGCCTTGC | 62 °C | 50 | |
| <i>PPO-FW2</i> | 22 | GACAGGCTCCTCATCAAGA | 62.7 °C | 52.6 | 111 pb |
| <i>PPO-RV2</i> | 21 | TCCTCGTCTCCTTCTCT | 62.5 °C | 55.6 | |
| <i>ACT7-FW1</i> | 19 | AACCGCCAAGAGTAGTTCT | 62.5 °C | 47.4 | 130 pb |
| <i>ACT7-RV1</i> | 22 | TGCTTCCATACCAATGAATGAG | 62.5 °C | 47.4 | |
| <i>ACT7-FW2</i> | 21 | ATTCCAGGTGCTTCCATACC | 61.2 °C | 47.6 | 149 pb |
| <i>ACT7-RV2</i> | 20 | TGCTTCCATACCAATGAATGAG | 61.8 °C | 50 | |
| <i>BTUB-FW1</i> | 20 | GCAACTCCACATCCATTCAG | 60.9 °C | 50 | 129 pb |
| <i>BTUB-RV1</i> | 20 | CTGCCTCTGTGAACTCCATC | 62 °C | 55 | |
| <i>BTUB-FW2</i> | 23 | CAGGAGGGTAAGTGAGCAATTTA | 62 °C | 43 | 133 pb |
| <i>BTUB-RV2</i> | 22 | GTACTCAGCCACCAGATCATTCC | 62 °C | 50 | |
| <i>UBC3-FW1</i> | 21 | AGGTAGCATTGAGGACAAAGG | 62 °C | 47.6 | 134 pb |
| <i>UBC3-RV1</i> | 22 | CAGGAGTGAGCAGATAGAAAGC | 62.2 °C | 50 | |
| <i>UBC3-FW2</i> | 20 | TGATGGAGAGGAGGCTTACA | 62 °C | 50 | 133 pb |
| <i>UBC3-RV2</i> | 21 | AACTTGGACATCACCCAGAAG | 62 °C | 47.6 | |
| <i>EF1-FW1</i> | 21 | CCAGAAACTACAGTCCCAAC | 62 °C | 52.4 | 137 pb |
| <i>EF1-RV1</i> | 21 | CCTCTCATGTTCTTTCAGCC | 62 °C | 52.4 | |
| <i>EF1-FW2</i> | 20 | AAAGCAAGAGACAGTGGAGG | 62.2 °C | 50 | 133 pb |
| <i>EF1-RV2</i> | 20 | ACTTCATAGCACGGATTGGG | 62 °C | 50 | |
| <i>DODA-FW1</i> | 21 | CAAACCTGGAACTGGCACATC | 61.9 °C | 47.6 | 109 pb |
| <i>DODA-RV1</i> | 23 | TCCCAACTACGATGAATAAGCTC | 61.9 °C | 43.5 | |
| <i>DODA-FW2</i> | 23 | AAGATAGAAAGTCATGCTTCAGC | 61.1 °C | 39.1 | 106 pb |
| <i>DODA-RV2</i> | 23 | CCTACTTCTCTGTCTGTCAACAAG | 61.8 °C | 47.8 | |

Cuadro 2.2 Cebadores específicos diseñados a partir de secuencias codificantes obtenidos a partir del transcriptoma de *S. queretaroensis*.

2.2.3.3 SÍNTESIS DE cDNA

Para la síntesis de cDNA, se utilizó el paquete SuperScript™ III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Se tomó 1 µg del RNA total previamente extraído y tratado con DNAsas y se depositó en una mezcla que contenía 1 µL de oligo (dT), 1 µL de dNTP mix (10 mM) llevado a un volumen de 10 µL con agua DEPC e incubado a 65 °C durante 5 min. Para la síntesis de la cadena complementaria, se añadió la mezcla de síntesis de cDNA, compuesta por 2 µL del amortiguador RT (10X), 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de DTT (0.1 M), 1 µL de RNaseOUT™ y 1 µL de SuperScript® III RT (200 U/µL) y se incubó inicialmente a 50 °C durante 50 min y se finalizó calentando a 85°C durante 5 min. Finalmente, cada reacción fue tratada con 1 µL de RNase H por tubo y se incubó a 37°C durante 20 min.

2.2.3.4 PCR DE PUNTO FINAL

Se tomó 1 µg de cDNA y se incubó en la mezcla de PCR que contenía 25 µL de DreamTaq Green PCR Master Mix (2X), 10 µM de cebadores específicos (Cuadro 2.2), llevado a un volumen total de 50 µL con agua libre de nucleasas. El programa consistió en una desnaturalización inicial 2 min a 95°C. Se emplearon 40 ciclos de 30 s a 95°C para la desnaturalización. La temperatura del alineamiento de los cebadores fue de 50 - 55°C durante 30 s. La condición de elongación fue por 1 min a 72°C y la elongación final fue por 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 2% y se visualizaron en un sistema de transiluminación.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS EN SUSPENSIÓN SqY1 y SqR1

Se realizaron las curvas de crecimiento de las dos líneas de células en suspensión de *S. queretaroensis* iniciando el día 0 y concluyó el día 24. El muestreo se realizó cada cuatro días, en donde por filtración al vacío, se colectaron tres paquetes de células de 0.5 g por día considerados como repeticiones y se almacenaron a -80°C hasta la realización de los análisis de cuantificación.

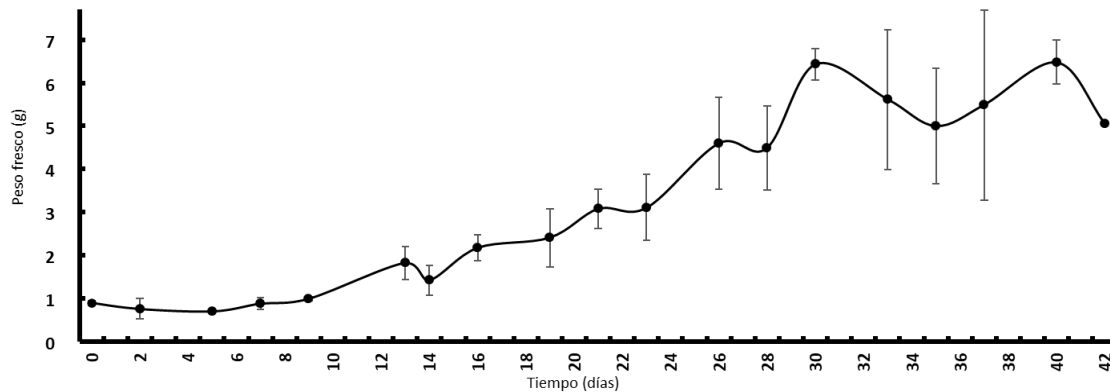


Figura 3.1 Curva de crecimiento (peso fresco) de la línea celular SqY1. Promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

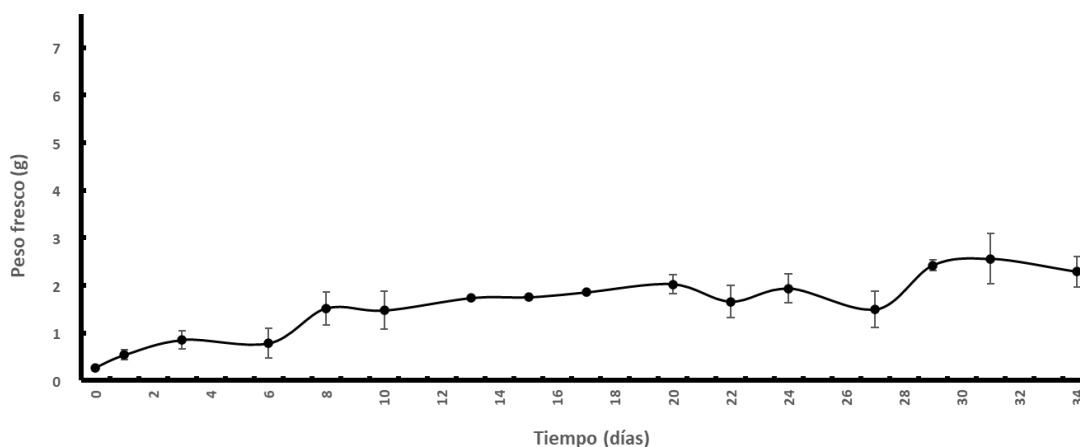


Figura 3.2 Curva de crecimiento (peso fresco) de la línea celular SqR1. Promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

En las figuras 3.1 y 3.2, se muestran las curvas de crecimiento de las líneas SqY1 y SqR1, con base en la ganancia de peso fresco. En ambos casos, se puede observar una curva sigmoide, típica del crecimiento de células vegetales, en donde es posible identificar las siguientes fases: 1) lag, entre el día 0 y 8, y 2) exponencial, que va del día 9 al 24. De trabajos anteriores, se sabe que la fase de desaceleración progresiva empieza a partir del día 25, para luego dar paso a la fase de decaimiento alrededor del día 30.

3.2 CUANTIFICACIÓN DE BETALAÍNAS EN LAS LÍNEAS SqY1 y SqR1

En la siguiente figura, se puede observar la relación del contenido de pigmentos (betaxantinas y betacianinas) a lo largo de la curva de crecimiento presentes en la línea SqY1. La cantidad de pigmentos amarillos (betaxantinas) se mantuvo estable durante los primeros días, alcanzando el punto máximo el día 8 ($18.41 \mu\text{g g}^{-1}$ PF) y con un leve descenso que se mantuvo hasta el día 20, para después aumentar hasta los mismos niveles del día 0. En el caso de las betacianinas, su comportamiento fue similar al de las betaxantinas, teniendo su punto máximo el día 24 ($4.69 \mu\text{g g}^{-1}$ PF) (Figura 3.3).

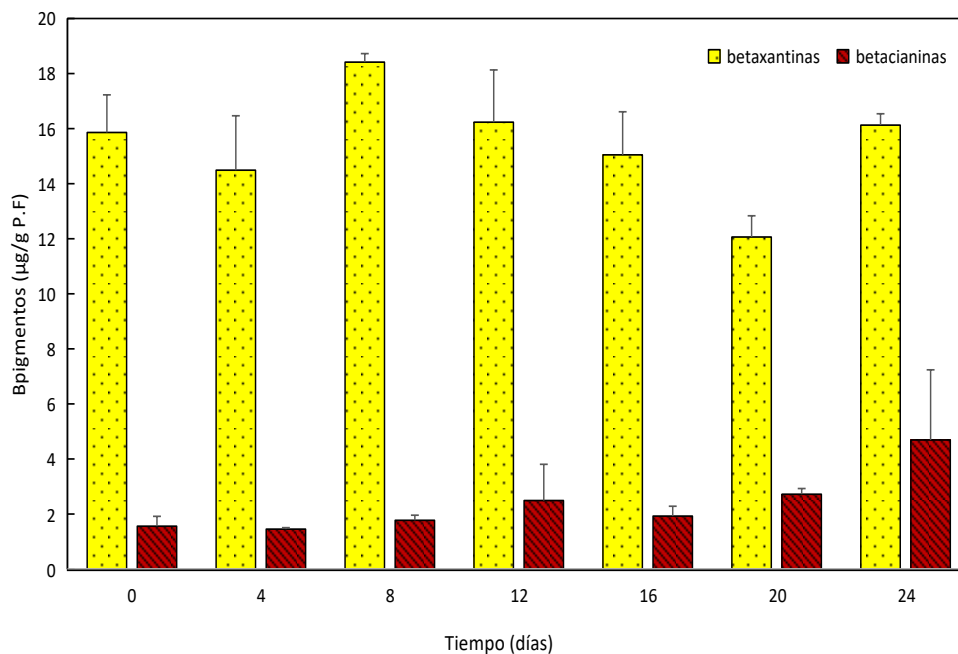


Figura 3.3 Contenido de betalaínas en la línea SqY1 de *S. queretaroensis* ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) a lo largo de un ciclo de cultivo de 24 días. Promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

En lo que respecta a la cuantificación de betalaínas en la línea *SqR1*, alcanzó un punto máximo el día 8 respecto a pigmentos rojos (betacianinas) ($82.77 \mu\text{g g}^{-1}$ PF) y en el día 16, en los pigmentos amarillos (betaxantinas) ($78.76 \mu\text{g g}^{-1}$ PF). Cabe decir que la cuantificación de los pigmentos para la línea roja se detuvo el día 20, pues no se pudo seguir muestreando por la contingencia (Figura 3.4).

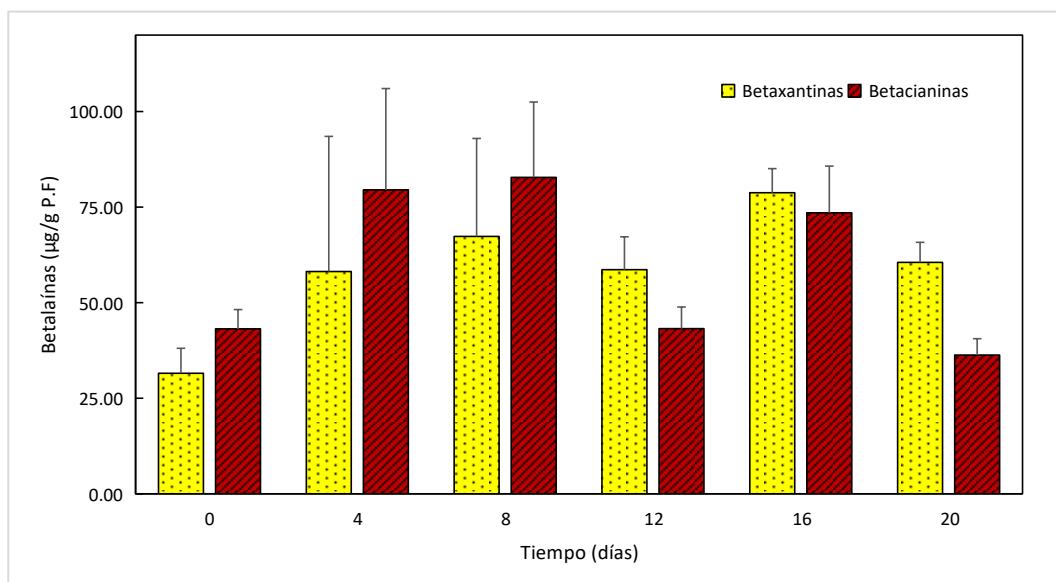


Figura 3.4 Contenido de betalaínas (barras amarillas) y de betacianinas (barras rojas) en la línea SqR1 de *S. queretaroensis* ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) a lo largo de un ciclo de cultivo de 24 días. Promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

De los resultados obtenidos, se determinó que los ensayos de medición de la expresión génica en la línea SqY1 se realizaran solamente en días 4, 8, 12, 16, 20 y 24 de cultivo.

3.3 EXTRACCIÓN DE ARN DE CÉLULAS DE *Stenocereus queretaroensis*

Se estandarizó el método de extracción de RNA total para las líneas de *S. queretaroensis*, realizando algunas modificaciones en los parámetros de las distintas etapas del protocolo estándar de extracción de ácidos nucleicos (ver Materiales y Métodos).

Inicialmente, de todos los métodos probados para el lisado celular, las perlas de vidrio fueron las que proporcionaron una mejor integridad del RNA en la extracción (Figura 3.5). Por otro lado, el incremento de los reactivos Trizol y cloroformo favoreció notablemente la extracción de los ácidos nucleicos y la inhibición de enzimas degradativas del RNA, ya que se pudo obtener uno de mayor integridad.

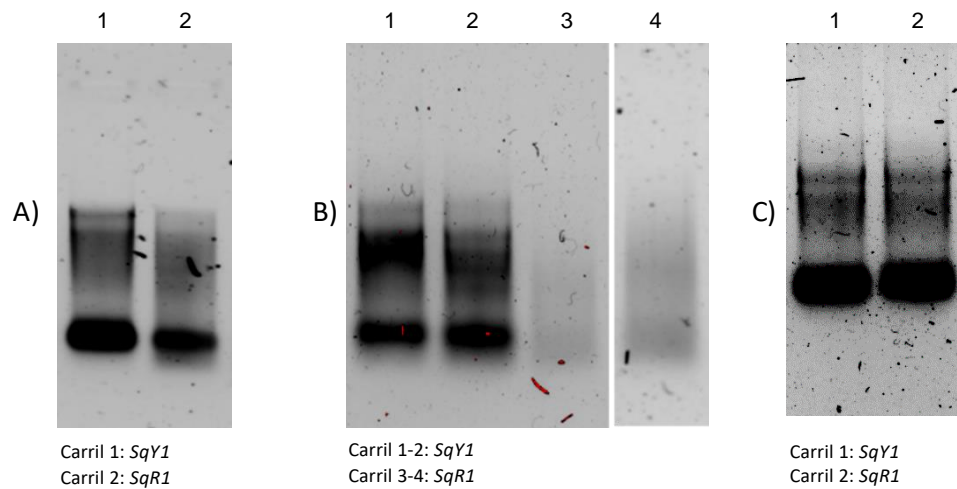


Figura 3.5 Ensayos iniciales de extracción de RNA. Inicialmente, se utilizaron un micropistilo de plástico (A) y un homogeneizador manual (B) para el lisado de las células; sin embargo, no se logró obtener buen rendimiento, ni la calidad de RNA esperado (considerando los parámetros de pureza), por lo que se procedió a utilizar perlas de vidrio (C), las cuales mejoraron notablemente la integridad del material extraído. En cada pocillo del gel, se cargó 1 μg de RNA total de la muestra extraída.

A pesar de las modificaciones aplicadas, la presencia de sales en los pocillos del gel todavía era notoria, por lo que se procedió a probar de 2 a 3 lavados consecutivos, lo que disminuyó en buena proporción la presencia de sales en la extracción (Figura 3.6).

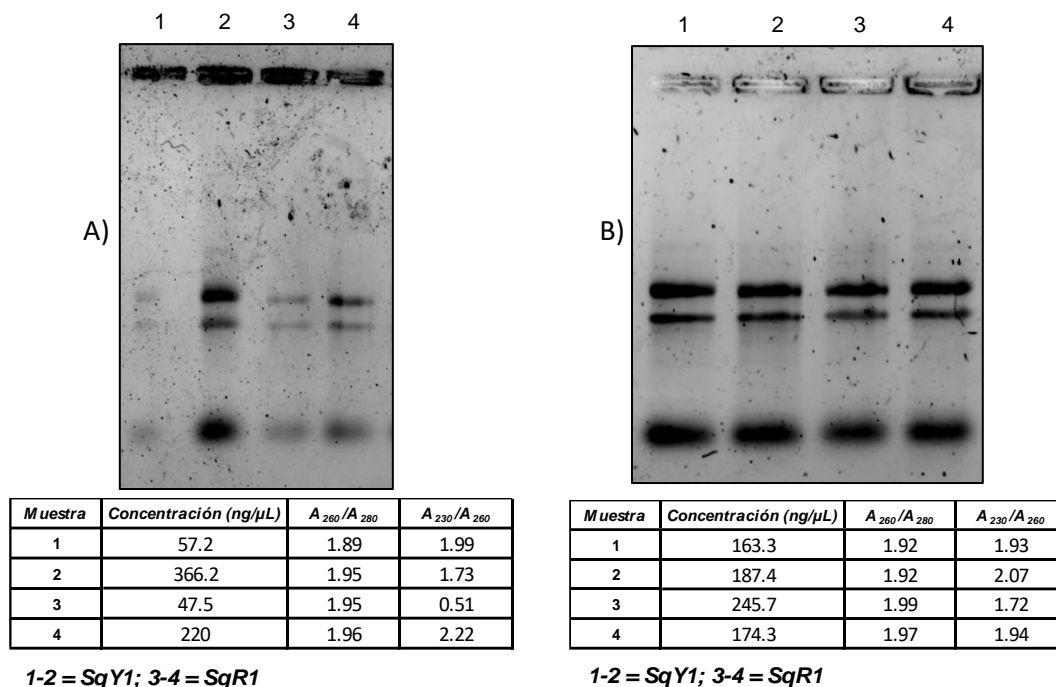


Figura 3.6 Ensayos posteriores de extracción de ARN con modificaciones en el protocolo. En el primer gel (A) se pueden observar las bandas ribosomales 28S y 18S un poco más uniformes; sin embargo, las manchas negras en los pocillos indican la presencia de sales en los mismos que fue todavía muy conspicua. En el segundo gel (B), se pueden observar las bandas ribosomales 28S y 18S mucho más claras, indicativo de una buena extracción de los ácidos nucleicos, así como en la eliminación de sales y otros compuestos presentes en los ensayos anteriores.

Finalmente, se probó el protocolo con todas las modificaciones realizadas, de igual manera se mejoró en el pipeteado obteniendo así, un RNA mucho más íntegro y puro, de acuerdo a los parámetros requeridos para los análisis subsiguientes. En las siguientes (Figuras 3.7 y 3.8), se muestran los geles de agarosa al 1% del RNA extraído a lo largo de la estandarización del protocolo, detallando los resultados de los cambios realizados en cada etapa del protocolo modificado. De igual manera, se presenta la información correspondiente a los valores de densidad óptica registrados en el análisis de absorbancia.

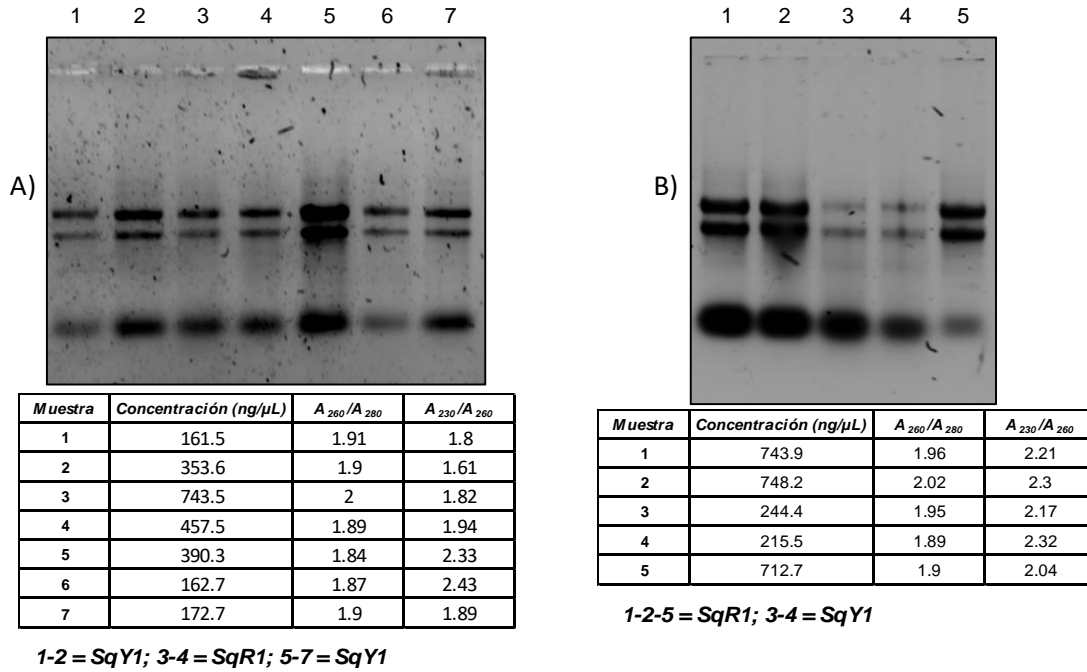


Figura 3.7 Resultados finales con el protocolo estandarizado. Se pueden ver bandas uniformes y ausencia de degradación en cada muestra.

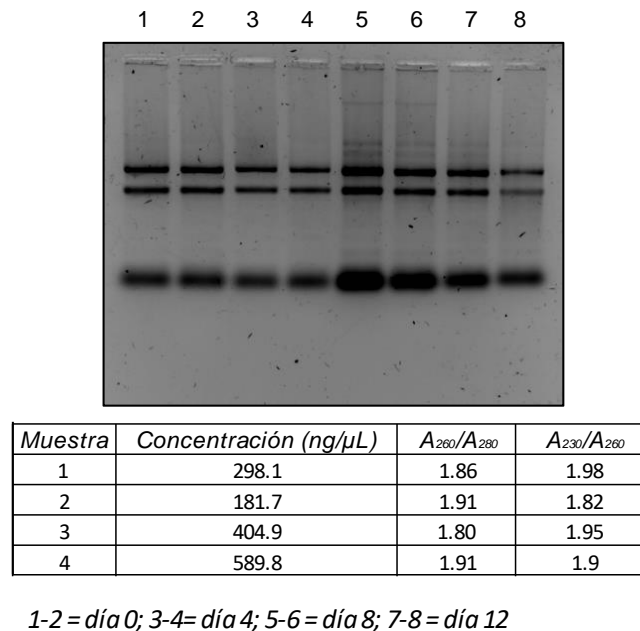


Figura 3.8 Extracción de RNA de muestras obtenidas de la curva de crecimiento de la línea celular SqY1. En el gel es posible observar las bandas ribosomales 28S y 18S. Las concentraciones depositadas en cada carril fueron las mismas.

3.4 EXPRESIÓN DE LOS GENES *tyrAa*, *ppo* y *doda* EVALUADOS MEDIANTE PCR

Para los análisis moleculares, se emplearon muestras a lo largo del ciclo de cultivo (días 4, 8, 12, 16, 20 y 24) de la línea SqY1. Los genes propuestos para este estudio corresponden a *tyrAa*, *ppo* y *doda*, como genes claves en la ruta biosintética de las betalainas.

Los transcritos del gen *tyrAa* están presentes en todos los días evaluados (Figura 3.9). Es de notarse que aparentemente en los días 20 y 24, las bandas son un poco más intensas. Estos resultados sugieren que las células mantienen un nivel constante de transcritos a lo largo del ciclo, para que se encuentren disponibles en caso de necesitar ser traducidos para la producción de L-tirosina.

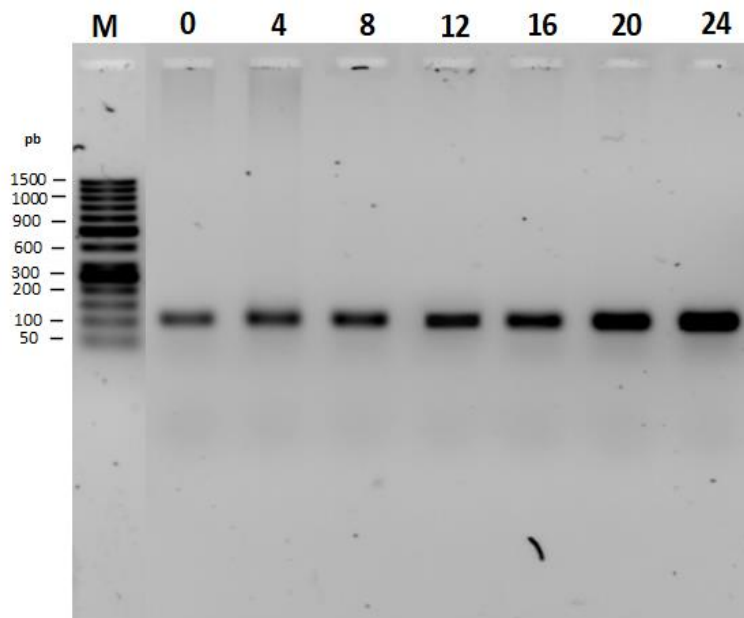


Figura 3.9 Expresión de la arogenato deshidrogenasa (*tyrAa*) en células durante el ciclo de cultivo de la línea SqY1 de *S. queretaroensis*.

Por otro lado, se pudieron visualizar bandas correspondientes para los transcritos del gen *ppo* a lo largo del ciclo de cultivo. En los días 4 y 8, su presencia es casi imperceptible. Esta expresión aumenta de manera importante el día 12, para luego disminuir casi a la mitad durante los días 16 y 20 (Figura 3.10). La banda es mucho más notoria el día 24, cuando iniciaría la fase estacionaria.

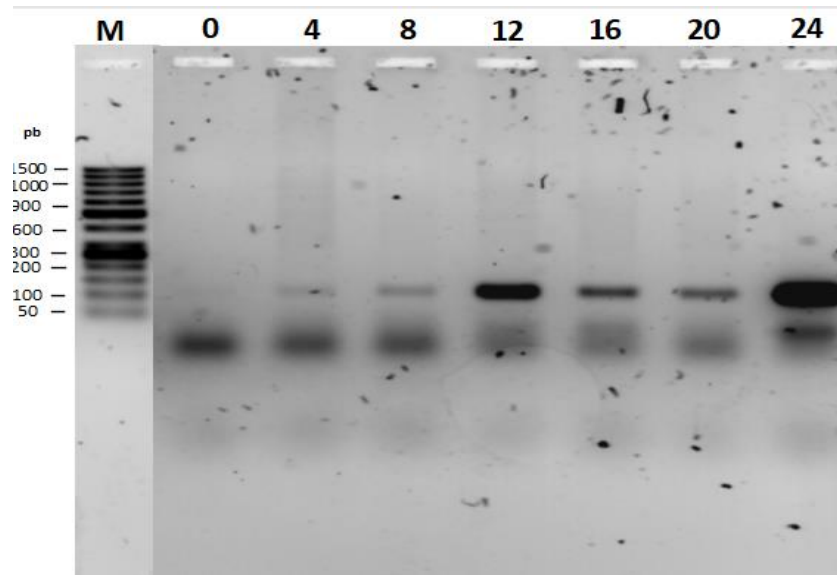


Figura 3.10 Expresión de la polifenol oxidasa (*ppo*) en células durante el ciclo de crecimiento de *S. queretaroensis*.

Finalmente, para el gen *doda*, su expresión se detectó con mayor intensidad en los días 20 y 24 del ciclo (Figura 3.11), aunque podría decirse que la banda empieza a notarse a partir del día 12 del ciclo. Estos resultados contribuyen a proponer que la presencia de transcritos de *ppo* daría por resultado una mayor disponibilidad de L-DOPA, que es utilizada por DODA para producir el ácido betalámico.

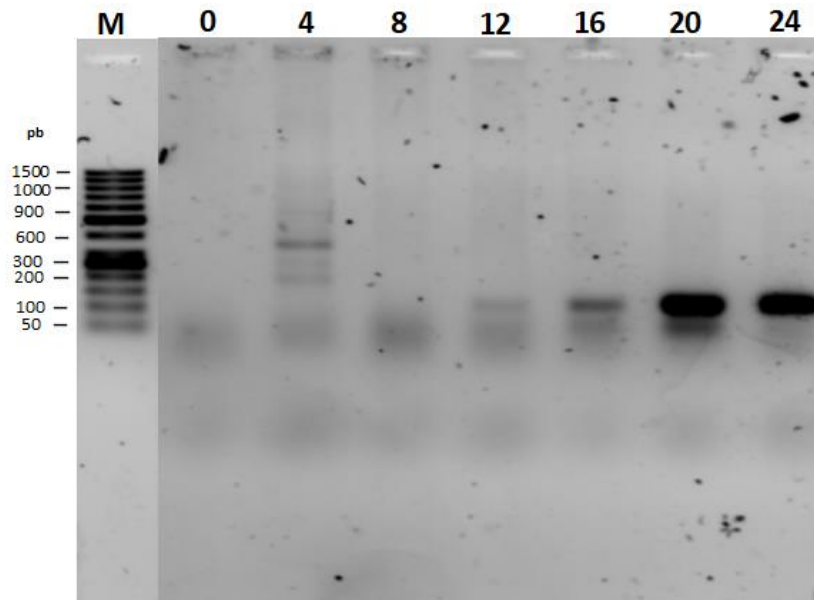


Figura 3.11 Expresión de la 4,5-extradiol doxygenasa (DODA) en células durante el ciclo de crecimiento de *S. queretaroensis*.

Adicionalmente se amplificó factor de elongación (EF-1 α) con gen control empleando las mismas cantidades de cDNA que en las demás reacciones (Figura 3.12). Su expresión se mantiene constante y sin cambios aparentes durante todo el ciclo establecido.

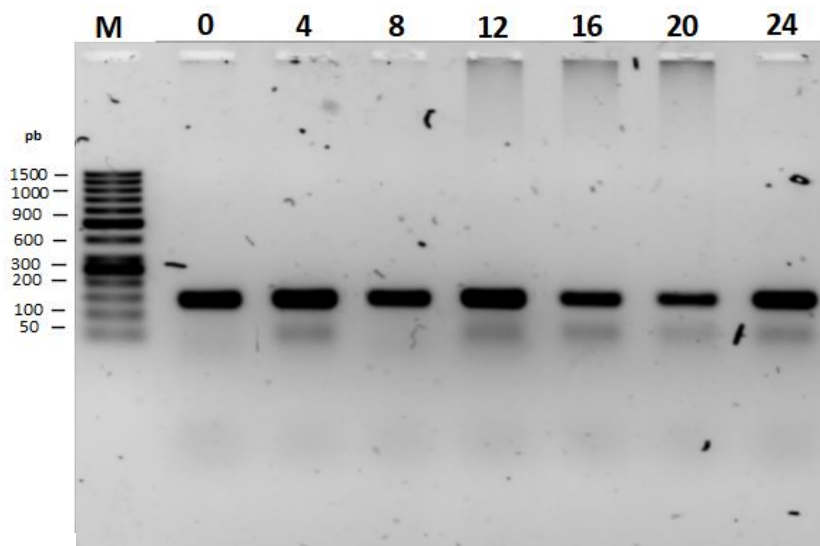


Figura 3.12 Expresión del factor de elongación - 1 α (EF-1 α) en células durante el ciclo de crecimiento de *S. queretaroensis*.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

En los últimos años, las betalaínas han sido objeto de estudio debido a sus características físico-químicas y como compuestos bioactivos; sin embargo, la mayoría de estos estudios no han conseguido realizarse en modelos más viables que puedan satisfacer a un mercado más amplio. Entre las características más importantes de las betalaínas para su utilización en la industria, se encuentra su alta estabilidad a rangos amplios de temperatura y pH. Además, su versatilidad como metabolitos bioactivos en la prevención de algunas enfermedades ha generado un gran interés en estos pigmentos.

Los frutos de *S. queretaroensis* representan una alternativa como modelo de estudio con relación a los pigmentos mencionados, debido a la gran cantidad de betalaínas que se producen en la pulpa de éstos. Este trabajo fue realizado con la finalidad de entender una de las características más importante de la línea celular de *S. queretaroensis*: la acumulación de betalaínas, con base en la regulación de algunos genes claves involucrados en su biosíntesis.

La biosíntesis y acumulación de metabolitos especializados en las plantas son inducidas en respuesta a diversos factores, como el estrés abiótico o el ataque de patógenos. Por otro lado, la maquinaria celular de las plantas regula estos aspectos en las diferentes etapas del crecimiento, de acuerdo a las necesidades. Dicha regulación requiere de la expresión de múltiples genes que dan lugar a enzimas y reguladores que actúan de manera coordinada en momentos específicos.

Para este estudio, se consideraron dos de las fases de crecimiento celular de la línea: la fase de adaptación o lag y la exponencial, en un ciclo de 24 días (Figura 3.1). Para el día 8 del ciclo, la cantidad de pigmentos amarillos (betaxantinas) alcanza su punto máximo, para después descender levemente hasta el día 20, donde vuelve a aumentar similares a los registrados en el día 0 (Figura 3.3).

Para la realización de los experimentos que implican el uso de ácidos nucleicos, se tuvo que afinar una metodología de extracción, a partir de las células en suspensión de la línea SqY1, que implicaba una manera diferente de romperlas, pues se utilizaron perlas de vidrio (Figura 3.5). Este hecho implica que las células de *S. queretaroensis* poseen una

pared celular bastante resistente, que pudiera compararse con la de *Saccharomyces cereviceae*, el único otro modelo que ha requerido de este sistema de ruptura en el laboratorio.

Así mismo, hubo que afinar detalles de uso de reactivos y tiempos para lograr que el RNA obtenido estuviera en la cantidad y la calidad necesarias para poder determinar la expresión de los genes involucrados en la síntesis de la tirosina y las betalainas.

Es de mencionarse que, al principio del trabajo, la única otra referencia cercana de los genes a estudiar era en *Beta vulgaris*, especie que ha sido ampliamente estudiada con respecto a la síntesis de betalainas, pero que no está cercana filogenéticamente hablando a nuestro modelo experimental. Es por esto que se hizo necesario al mismo tiempo, realizar la obtención del transcriptoma de *S. queretaroensis*. Después de hacer los análisis bioinformáticos pertinentes, se pudo contar con varias opciones para la búsqueda de los genes de interés. Una vez elegidas las secuencias codificantes, se pudo realizar el diseño de cebadores específicos de los genes *tyrAa*, *ppo* y *doda*.

Con base en los resultados obtenidos a partir de los ensayos moleculares, no se encontró una relación consistente entre el nivel de la expresión génica y la acumulación de betalainas. Sin embargo, la expresión de *tyrAa*, que es detectable en todos los días evaluados, coincide con otros estudios que evalúan este mismo gen en la síntesis de L-tirosina (Figura 3.9), un aminoácido esencial en la mayoría de procesos vitales para la planta. Es probable que las células necesiten un nivel basal de transcritos listos para ser traducidos a lo largo de la curva de crecimiento, pues se sabe que los aminoácidos aromáticos, en general, no se acumulan, sino que son utilizados inmediatamente.

Por otro lado, se ha propuesto que la PPO realiza la hidroxilación de L-tirosina a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), así como su subsecuente oxidación para formar ciclo-DOPA. Algunos autores han propuesto que ambos eventos son realizados por una polifenol oxidasa bifuncional (Gandía-Herrero *et al.*, 2004; Strack *et al.*, 2003; Strack y Schliemann, 2001; Steiner *et al.*, 1999).

Se pudo detectar una expresión baja de *ppo* durante los días 4 y 8, para luego aumentar notablemente el día 12. Entre los días 13 y 23, la expresión disminuye aproximadamente a una quinta parte de la del día 12, para luego volver a subir en el día 24, previo al

segundo pico de acumulación de pigmentos evaluados. Sin embargo, no hay aumento en la aparición de los transcritos durante el primer pico de acumulación (Figura 3.10).

Finalmente, *doda* se empieza a expresar el día 12, más los máximos de su nivel se encuentran entre los días 20 y 24, correspondiendo con la formación del ácido betalámico, (Figura 3.11) cromóforo central de las betalínas, a partir de la apertura del anillo cíclico de L-DOPA entre los carbonos 4 y 5, produciendo así un 4,5-seco-DOPA inestable, que posteriormente se tautomeriza de forma no enzimática, a partir de una transferencia de protones y la liberación de agua (Contreras-Llano *et al.*, 2019; Christinet *et al.*, 2004). Este aumento en el nivel de los transcritos de *ppo* y *doda* en el día 24 parece coincidir con el segundo pico de acumulación de betalínas en las células de *S. queretaroensis*. Sin embargo, queda la interrogante de qué está pasando durante el primer pico, a lo que se podría sugerir que habría que determinar cuantitativamente la cantidad de transcritos necesarios para poder llevar a cabo la exitosa traducción que daría lugar a las enzimas necesarias para el proceso.

Sería interesante saber qué ocurre después del día 24 con estos genes, así como considerar la búsqueda de otras isoformas, que puedan estar involucradas en otras partes de la ruta metabólica de estos pigmentos.

Con base en los resultados obtenidos, no podemos descartar por completo la hipótesis planteada en el proyecto, pues hay datos que apuntan a que un aumento en la expresión de *ppo* y *doda* podrían estar relacionadas con el incremento en la acumulación de betalínas en la fase tardía del ciclo de cultivo de la línea SqY1 de *S. queretaroensis*. Empero, no se pudo determinar algo similar para el primer pico de acumulación de pigmentos durante el día 8.

Esto podría indicar que el control de la síntesis de betalínas en estas células no es puramente a nivel transcripcional, sino que también deberían considerarse eventos posteriores, desde la traducción, la compartimentalización de las enzimas y la disponibilidad de sustratos, entre otras.

También podrían sugerirse otros eventos suscitados previos al primer pico de acumulación de pigmentos, como la regulación mediada por otras enzimas o a través de rutas alternas que están parcialmente identificadas en otros modelos; así mismo, no se descarta la posibilidad de que existan transcritos en días previos al día 0 o inclusive en

días no analizados del ciclo, que finalmente dan lugar a las enzimas que actúan en la producción de pigmentos para el día 8.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se logró cuantificar con éxito la acumulación de pigmentos en los periodos establecidos del ciclo de crecimiento de la línea, lo que permitió la evaluación de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de betalaínas.

La expresión de *tyrAa* se presenta durante todos los días evaluados del experimento, apuntando a su papel en la síntesis de L-tirosina, aminoácido esencial para la mayoría de procesos metabólicos. En cuanto a los otros genes evaluados, *ppo* tiene su mayor expresión los días 12 y 24, mientras que *doda* comienza a expresarse en mayores niveles hasta el día 20.

El trabajo realizado en este proyecto contribuye a comprender la biosíntesis de las betalaínas en *S. queretaroensis*. Los resultados hasta ahora nos indican los eventos puntuales suscitados en el desarrollo de la línea celular, con respecto a la producción de estos pigmentos.

Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo presentan evidencias que permiten sugerir que la hipótesis propuesta inicialmente puede no ser totalmente válida, debido a la ausencia de los patrones claros de expresión génica en etapas esperadas. Será necesario analizar la abundancia relativa de los transcritos de interés. Sin embargo, lo realizado sugiere que estos genes juegan papel en la síntesis y regulación de estos pigmentos. Es pertinente realizar estudios más integrales del modelo, como la obtención de transcriptomas en más puntos del ciclo de cultivo y el análisis cuantitativo por RT-PCR de los transcritos en base a ellos. Un conocimiento más profundo de las vías de síntesis de las betalaínas permitirá aplicar ingeniería genética en modelos de alto rendimiento para producir pigmentos que puedan satisfacer a las diferentes industrias.

BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano, R.C., Drdák, M., Simon, P., Rajniaková, A., Karovicová, J., Preclík, L. (1993). Thermal degradation of betanine in various water alcohol model systems. *Food Chemistry*, 46, 73-75.
- Arreola Nava, H.J. (2006). Sistemática filogenética del género *Stenocereus* (Cactaceae). Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.
- Azeredo, H.M.C. (2009). Betalains: Properties, sources, applications, and stability - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2365-2376.
- Bach, V., Mikkelsen, L., Kidmose, U., Edelenbos, M. (2015). Culinary preparation of beetroot (*Beta vulgaris* L.): The impact on sensory quality and appropriateness. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 1852-1859.
- Bahramnejad, B., Erickson, L.R., Goodwin, P.H. (2010). Induction of expression and increased susceptibility due to silencing a 4,5-DOPA dioxygenase extradiol-like gene of *Nicotiana benthamiana* in the interaction with the hemibiotrophic pathogens, *Colletotrichum destructivum*, *Colletotrichum orbiculare* or *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Plant Science*, 178(2), 147-157.
- Bean, A.J. (2017). Defining steps of the betalain pigment pathway. Tesis de Doctorado. University of Texas at Austin.
- Bentley, R., Haslam, E. (1990). The shikimate pathway - A metabolic tree with many branches. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 25, 307-384.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519-546.

- Bonner, C.A., Jensen, R.A., Gander, J.E., Keyhani, N.O. (2004). A core catalytic domain of the TyrA protein family: arogenate dehydrogenase from *Synechocystis*. *Biochemical Journal*, 382(1), 279-291.
- Bravo-Hollis, H., Sánchez Mejorada, R. (1978). Las Cactáceas de México. 2ª ed. Instituto de Biología. UNAM. México.
- Britton, G. y Homero-Mendez, D. (1994). Carotenoids and colour in fruit and vegetables, en: *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. Tomas-Barberan F.A., Robins, R.J. (Eds.). Clarendon Press, Oxford, pp. 11-27.
- Brockington, S.F., Yang, Y., Gandía-Herrero, F., Covshoff, S., Hibberd, J.M., Sage, R.F., Wong, G.K.S., Moore, M.J., Smith, S.A. (2015). Lineage-specific gene radiations underlie the evolution of novel betalain pigmentation in Caryophyllales. *New Phytologist*, 207, 1170-1180.
- Byng, G.S., Whitaker, R., Flick, C., Jensen, R.A. (1981). Enzymology of L-tyrosine biosynthesis in corn (*Zea mays*). *Phytochemistry*, 20, 1289-1292.
- Castellar, R., Obón, J.M., Alacid, M., Fernández-López, J.A. (2003). Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2772-2776.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
- Christendat, D., Saridakis, V., Turnbull, J. (1998). Use of site-directed mutagenesis to identify residues specific for each reaction catalyzed by chorismate mutase-

prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 37, 15703-15712.

Christinet, L., Burdet, F.X., Zaiko, M., Hinz, U., Zryd, J.P. (2004). Characterization and functional identification of a novel plant 4,5-extradiol dioxygenase involved in betalain pigment biosynthesis in *Portulacca grandiflora*. *Plant Physiology*, 134, 265-274.

Connelly, J.A., Conn, E.E. (1986). Tyrosine biosynthesis in *Sorghum bicolor*: isolation and regulatory properties of arogenate dehydrogenase. *Zeitschrift für Naturforschung*, 41, 69-78.

Contreras-Llano, L.E., Guerrero-Rubio, M.A., Lozada-Ramírez, J.D., García-Carmona, F., Gandía-Herrero F. (2019). First betalain-producing bacteria break the exclusive presence of the pigments in the plant kingdom. *mBio*, 10(2), e00345-19. DOI: 10.1128/mBio.00345-19

Cruz-Arriaga, J.M., Acero, J., Jiménez, C., López, D., Rodríguez, E. (2015). La pitaya silvestre (*Stenocereus queretaroensis*), una alternativa alimenticia, nutricional y socioeconómica, Memorias: XII encuentro participación de la mujer en la ciencia [online]. Centro de investigaciones en Óptica, A.C. [Fecha de acceso: abril 2018] Disponible en: http://congresos.cio.mxx/memorias_congreso_mujer/archivos/extensos/sesion1/S1-BCA07.pdf

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A.R., Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173-289.

- Delgado-Vargas, F., Paredes-Lopez, O. (2002). Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses. CRC Press, Boca Ratón.
- Erb, T.J., Jones, P.R., Bar-Even, A. (2017). Synthetic metabolism: metabolic engineering meets enzyme design. *Current Opinion in Chemical Biology*, 37, 56-62.
- Esatbeyoglu, T., Wagner, A.E., Schini-Kerth, V.B., Rimbach, G. (2015). Betanin - A food colorant with biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(1), 36-47.
- Gaines, C.G., Byng, G.S., Whitaker, R.J., Jensen, R.A. (1982). L-tyrosine regulation and biosynthesis via aroenate dehydrogenase in suspension-cultured cells of *Nicotiana glauca* (Speg. et Comes). *Planta*, 156, 233-240.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. (2005). Betaxanthins as substrates for tyrosinase. An approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. *Plant Physiology*, 138, 421-432.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. (2010). Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta*, 232, 449-460.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. (2016). Biological activities of plant pigments betalains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(6), 937-945.
- Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., Escribano, J. (2004). Purification and characterization of a latent polyphenol oxidase from beet root (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 609-615.

- Georgiev, V., Ilieva, M., Bley, T., Pavlov, A. (2008). Betalain production in plant *in vitro* systems. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5), 581-593.
- Georgiev, V., Weber, J., Kneschke, E.M., Denev, P.N., Bley, T., Pavlov, A.I. (2010). Antioxidant activity and phenolic content of betalain extracts from intact plants and hairy root cultures of the red beetroot *Beta vulgaris* cv. Detroit Dark Red. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 105-111.
- Gibson, A.C., Nobel, P.S. (1986). *The Cactus Primer*. Harvard University Press, Cambridge.
- Gomes Corrêa, R.C., Andrade García, J.A., Gesser Correa, V., Vieira, T.F., Bracht, A., Peralta, R.M. (2019). Pigments and vitamins from plants as functional ingredients: Current trends and perspectives. *Advances in Food and Nutrition Research*, 90, 259-303.
- Gordon, H.T., Bauernfeind, J.C., Furia, T.E. 1983. Carotenoids as food colorants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18, 59-97.
- Grewal, P.S., Modavi, C., Russ, Z.N., Harris, N.C., Dueber, J.E. (2018). Bioproduction of a betalain color palette in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 45, 180-188.
- Grotewold, E. (2006). The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 761-780.
- Guerrero-Rubio, M.A., López-Llorca, R., Henarejos-Escudero, P., García-Carmona, F., Gandía-Herrero, F. (2019). Scaled-up biotechnological production of individual betalains in a microbial system. *Microbial Biotechnology*, 12(5), 993-1002.

- Harlev, E., Nevo, E., Solowey, E., Bishayee, A. (2013). Cancer preventive and curative attributes of plants of the Cactaceae family: A review. *Planta Medica*, 79, 713-722.
- Hatlestad, G.J., Sunnadeniya, R.M., Akhavan, N.A., Gonzalez, A., Goldmand, I.L., McGrath, J.M., Lloyd, A.M. (2012). The beet R Locus encodes a new cytochrome P450 required for red betalain production. *Nature Genetics*, 44, 816-820.
- Hayakawa, K., Agarie, S. (2010). Physiological roles of betacyanin in a halophyte, *Suaeda japonica* Makino. *Plant Production Science*, 13, 351-359.
- Hermes, J.D., Tipton, P.A., Fisher, M.A., O'Leary, M.H., Morrison, J.F., Cleland, W.W. (1984). Mechanisms of enzymatic and acid-catalyzed decarboxylation of prephenate. *Biochemistry*, 23, 6263-6275.
- Hussain, E.A., Sadiq, Z., Zia-Ul-Haq, M. (2018). *Betalains: Biomolecular Aspects*. Springer, Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-95624-4>
- Ibdah, M., Krins, A., Seidlitz, H.K., Heller, W., Strack, D., Vogt, T. (2002). Spectral dependence of flavonol and betacyanin accumulation in *Mesembryanthemum crystallinum* under enhanced ultraviolet radiation. *Plant Cell and Environment*, 25, 1145-1154.
- Jain, G., Gould, K.S. (2015). Are betalain pigments the functional homologues of anthocyanins in plants? *Environmental and Experimental Botany*, 119, 48-53.
- Jain, G., Schwinn, K.E., Gould, K.S. (2015). Betalain induction by L-DOPA application confers photoprotection to saline-exposed leaves of *Disphyma australe*. *New Phytologist*, 207, 1075-1083.

- Kevan, P.G., Baker, H.G. (1983). Insects as flower visitors and pollinators. *Annual Review of Entomology*, 28(1), 407-453.
- Khan, M.I. (2016). Plant betalains: Safety, antioxidant activity, clinical efficacy and bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 316-330.
- Khan, M.I., Giridhar, P. (2015). Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochemistry*, 117, 267–295.
- Kishima, Y., Shimaya, A., Adachi, T. (1995). Evidence that blue light induces betalain pigmentation in *Portulacca* callus. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 43, 67-70.
- Kobayashi, N., Schmidt, J., Wray, V., Schliemann, W. (2001). Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins. *Phytochemistry*, 56, 429-436.
- Leathers, R.R., Davin, C., Zryd, J.P. (1992). Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L. var. Bikores monogerm (red beet). *In Vitro Cell and Developmental Biology*, 28P, 39-45.
- Leong, H.Y., Show, P.L., Lim, M.H., Ooi, C.W., Ling, T.C. (2018). Natural red pigments from plants and their health benefits: A review. *Food Reviews International*, 34(5), 463-482.
- López-Nieves, S., Yang, Y., Timoneda, A., Wang, M., Feng, T. Smith, S.A., Brockington, S.F., Maeda H.A. (2018). Relaxation of tyrosine pathway regulation underlies the evolution of betalain pigmentation in Caryophyllales. *New Phytologist*, 217, 896-908.

- Lu, G., Edwards, C.G., Fellman, J.K., Mattinson, D.S., Navazio, J. (2003). Biosynthetic origin of geosmin in red beets (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 1026-1029.
- Mabry, T.J. (2001) Selected topics from forty years of natural products research: betalains to flavonoids, antiviral proteins, and neurotoxic nonprotein amino acids. *Journal of Natural Products*, 64, 1596-1604.
- Mabry, T.J., Dreiding, A.S. (1968). The betalains, en: Recent Advances in Phytochemistry. Mabry, T.J., Alston, R., Runeckles, V. (Eds.). Appleton Century Crofts, New York, pp. 145-160.
- Miranda-Ham, M.L., López-Gómez, R., Castro-Concha, L., Chrispeels, A., Hernández, H., Loyola-Vargas, V.M. (1999). Betalain production in cell line of *Stenocereus queretaroensis* (Cactaceae) from immature fruits. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 65, 27-33.
- Nakashima, T., Araki, T., Ueno, O. (2011). Phosphoprotective function of betacyanin in leaves of *Amaranthus cruentus* L. under water stress. *Photosynthetica*, 49, 497-506.
- Nakatsuka, T., Yamada, E., Takahashi, H., Imamura, T., Suzuki, M., Ozeki, Y., Tsujimura, I., Saito, M., Sakamoto, Y., Sasaki, N., Nishihara, M. (2013). Genetic engineering of yellow betalain pigments beyond the species barrier. *Scientific Reports*, 3, 1970. <https://doi.org/10.1038/srep01970>.
- Nazareno, M.A. (2014). Phytochemicals of nutraceutical importance from cactus and their role in human health, en: Phytochemicals of Nutraceutical Importance. Prakash, D., Sharma, G. (Eds.). CAB International, Wallingford, pp. 103-115.

- Neelwarne, B., Halagur, S.B. (2013). Red beet: an overview, en: Red Beet Biotechnology. Food and Pharmaceutical Applications. Neelwarne, B. (Ed.). Springer, Boston, pp. 1-43.
- Paliwal, H. S., Goyal, S., Singla, S., Daksh, S. (2016). Pigments from natural sources: An overview. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(3), 1-12.
- Pavlov, A., Georgiev, V., Kovatcheva, P. (2003). Relationship between type and age of the inoculum cultures and betalains biosynthesis by *Beta vulgaris* hairy root culture. *Biotechnology Letters*, 25, 307-309
- Piattelli, M. (1981). The betalains: structure, biosynthesis, and chemical taxonomy, en: The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise. Stumpf, P.K., Conn, E.E. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 557-575.
- Piattelli, M., Minale, L. (1964). Pigments of Centrospermae—II. Distribution of betacyanins. *Phytochemistry*, 3, 547-557.
- Pimienta-Barrios, E., Nobel, P.S., Robles-Murguía, C., Mendez-Moran, L., Pimienta-Barrios, E., Yopez-Gonzalez, E. (1997). Ethnobotany, productivity, and ecophysiology of pitaya (*Stenocereus queretaroensis*). *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 2, 29-47.
- Polturak, G., Aharoni, A. (2018). “La Vie En Rose”: biosynthesis, sources, and applications of betalain pigments. *Molecular Plant*, 11(1), 7-22.
- Polturak, G., Breitel, D., Grossman, N., Sarrion-Perdigones, A., Weithorn, E., Pliner, M., Orzaez, D., Granell, A., Rogachev, I., Aharoni, A. (2016). Elucidation of the first

committed step in betalain biosynthesis enables the heterologous engineering of betalain pigments in plants. *New Phytologist*, 210, 269-283.

Privat, A., Noiriél, A., Morse, A.M., Davis, J.M., Fouquet, R., Loizeau, K., Ravanel, S., Frank, W., Haas, R., Reski, R., Bedair, M., Sumner, L.W., Hanson A.D. (2010). Nonflowering plants possess a unique folate-dependent phenylalanine hydroxylase that is localized in chloroplasts. *Plant Cell*, 22, 3410-3422.

Rebollar, A. A., J. Romero P., Cruz, H., Zepeda, C. (1997). El cultivo de pitaya (*Stenocereus* spp.), una alternativa para el trópico seco del estado de Michoacán. pp. 57-59.

Rippert, P., Matringe, M. (2002). Purification and kinetic analysis of the two recombinant arogenate dehydrogenase isoforms of *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry*, 269, 4753-4761.

Rippert, P., Puyaubert, J., Grisollet, D., Derrier, L., Matringe, M. (2009). Tyrosine and phenylalanine are synthesized within the plastids in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149, 1251-1260.

Rivas-Gonzalo, J.C. (2003). Analysis of anthocyanins, en: Methods in Polyphenol Analysis, Santos-Buelga, C., Williamson, G. (Eds.). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 338-358.

Rodriguez, A., Martnez, J. A., Flores, N., Escalante, A., Gosset, G., Bolivar, F. (2014). Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. *Microbial Cell Factories*, 13, 126.

- Saenz, H.C. 1995. Food manufacture and by-products, en: Agro-ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear. Barbera, G., Inglese, P., Pimienta-Barrios, E. (Eds.). FAO Plant Production and Protection Paper 132, Rome, pp. 137-143.
- Sakuta, M. (2014). Diversity in plant red pigments: Anthocyanins and betacyanins. *Plant Biotechnology Reports*, 8(1), 37-48.
- Salcedo E., Arreola J. (1991). El cultivo del pitayo en Techaluta, Jalisco. *Sociedad Mexicana de Cactología*, 36, 84-91.
- Sanchez-Mejorada, H. (1973). Nuevas cactáceas de la Nueva Galicia. *Revista de la Sociedad Mexicana de Cactología*, 18, 87-95.
- Sasaki, N., Adachi, T., Koda, T., Ozeki, Y. (2004). Detection of UDP-glucose:cyclo-DOPA 5-O-glucosyltransferase activity in four o'clocks (*Mirabilis jalapa* L.). *FEBS Letters*, 568(1-3), 159-162.
- Schenck, C.A., Chen, S., Siehl, D.L., Maeda, H.A. (2015). Non-plastidic, tyrosine-insensitive prephenate dehydrogenases from legumes. *Nature Chemical Biology*, 11, 52-57.
- Schenck, C.A., Maeda, H.A. (2018). Tyrosine biosynthesis, metabolism, and catabolism in plants. *Phytochemistry*, 149, 82-102.
- Schieber, A., Weber, F. (2016). Carotenoids, en: Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color. Reinhold, C., Schweiggert, R. (Eds.). Woodhead Publishing, Duxford, pp.101-124.
- Schliemann, W., Kobayashi, N., Strack, D. (1999). The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. *Plant Physiology*, 119, 1217-1232.

- Sheehan, H., Feng, T., Walker-Hale, N., Lopez-Nieves, S., Pucker, B., Guo, R., Yim, W.C., Badgami, R., Timoneda, A., Zhao, L., Tiley, H., Copetti, D., Sanderson, M.J., Cushman, J.C., Moore, M.J., Smith, S.A., Brockington, S.F. (2020). Evolution of L-DOPA 4,5-dioxygenase activity allows for recurrent specialization to betalain pigmentation in Caryophyllales. *New Phytologist*, 227, 914-929.
- Shin, K.S., Murthy, H.N., Ko, J.Y., Paek, K.Y. (2002). Growth and betacyanin production by hairy roots of *Beta vulgaris* in airlift bioreactors. *Biotechnology Letters*, 24, 2067-2069.
- Siehl, D. (1999) en: Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology, Singh, B. (Ed.). CRC Press, New York, pp. 171-204.
- Slimen, I.B., Najar, T., Abderrabba, M. (2017). Chemical and antioxidant properties of betalains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(4), 675-689.
- Sreekanth, D., Arunasree, M.K., Roy, K.R., Reddy, T.C., Reddy, G.V., Reddanna, P. (2007). Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Phytomedicine*, 14, 739-746.
- Steiner, U., Schliemann, W., Böhm, H., Strack, D., (1999). Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta*, 208, 114-124.
- Stintzing, F.C., Carle R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 19-38.
- Stintzing, F.C., Carle, R. (2007). Betalains—emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science and Technology*, 18(10), 514-525.

- Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R. (2003). Evaluation of color properties and chemical quality parameters of cactus juices. *European Food Research and Technology*, 216, 303-311.
- Strack, D., Schliemann, W. (2001). Bifunctional polyphenol oxidases: Novel functions in plant pigment biosynthesis. *Angewandte Chemie*, 40, 3791-3794.
- Strack, D., Vogt, T., Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62, 247-269.
- Sun, W., Singh, S. Zhang, R., Turnbull, J., Christendat, D. (2006). Crystal structure of prephenate dehydrogenase from *Aquifex aelicus* insights into the catalytic mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 12919-12928.
- Sunnadeniya, R., Bean, A., Brown, M., Akhavan, N., Hatlestad, G., Gonzalez, A., Symonds, V., Lloyd, A. (2016). Tyrosine hydroxylation in betalain pigment biosynthesis is performed by cytochrome P450 enzymes in beets (*Beta vulgaris*). *PLoS ONE*, 11(2), e0149417.
- Timoneda, A., Feng, T., Sheehan, H., Walker-Hale, N., Pucker, B., Lopez-Nieves, S., Guo, R., Brockington, S. (2019). The evolution of betalain biosynthesis in Caryophyllales. *New Phytologist*, 224, 71-85.
- Timoneda, A., Sheehan, H., Feng, T., Lopez-Nieves, S., Maeda, H.A., Brockington, S. (2018). Redirecting primary metabolism to boost production of tyrosine-derived specialised metabolites *in planta*. *Scientific Reports*, 8, 17256 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33742-y>
- Tzin, V., Galili, G. (2010). New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular Plant*, 3, 956-972.

- Upadhyay, R.K. (2018). Plant pigments as dietary anticancer agents. *International Journal of Green Pharmacy*, 12(01), S93-S107.
- Vogt, T., Ibdah, M., Schmidt, J., Wray, V., Nimtz, M., Strack, D. (1999). Light-induced betacyanin and flavonol accumulation in bladder cells of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Phytochemistry*, 52, 583-592.
- Wilcox, M.E., Wyler, H., Dreiding, A.S. (1965). Stereochemie von Betanidin und Isobetanidin. 8. Mitteilung. Zur Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin. *Helvetica Chimica Acta*, 48(5), 1134-1147.
- Wrolstad, R. E. (2004). Anthocyanin pigments - Bioactivity and coloring properties. *Journal of Food Science*, 69(5), C419-C425.
- Wrolstad, R.E., Durst, R.W., Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology*, 16(9), 423-428.
- Wyler, H., Mabry, T.J., Dreiding, A.S., 1963. Über die Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin: Zur Struktur des Betanidins. *Helvetica Chimica Acta*, 46, 1745-1748.
- Yamamoto, K.I., Kobayashi, N., Yoshitama, K., Teramoto, S., Komamine, A. (2001) Isolation and purification of tyrosine hydroxylase from callus cultures of *Portulacca grandiflora*. *Plant and Cell Physiology*, 42, 969-975.
- Zrýd, J.P., Christinet, L. (2003). Betalain pigments. Université de Lausanne, pp. 111.