

# Aislamiento de los genes de la ruta biosintética de antocianinas en Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L)

Graciela López Guzmán<sup>1</sup>, Juan F Gómez L.<sup>2</sup>, Juan A Aguilar C.<sup>1</sup>, Pablo Rúelas H.<sup>1</sup> y Roberto Valdivia R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. <sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Jalisco.

## Introducción

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) es una planta que pertenece a las Malvaceas, cultivada en zonas tropicales, aprovechada por su fibra, con diversos usos alimenticios y medicinales, de cuyos cálices a través de infusión se obtiene una bebida, refrescante, ligeramente acidulada (Fennema, 2002), recomendada popularmente como emoliente diurético espasmolítico, antibacteriano, antihipertensivo y antiescorbútico (Márquez *et al.*, 2007). Los cálices de esta planta (Figura. 1) son ricos en compuestos fenólicos en los que se encuentran los flavonoides y las antocianinas con una marcada actividad fisiológica (Olatunde, 2003).



Figura 1. Cáliz de jamaica

Las antocianinas pertenecen al complejo grupo de los compuestos fenólicos solubles en agua y confieren a frutos, flores y hojas los colores azul, rojo y violeta (Kong *et al.*, 2003), se sintetizan a partir de los precursores fenilalanina y acetato, por medio de la ruta fenilpropanoide (Zhang *et al.*, 2004), misma que es regulada a nivel génico y está altamente influenciada por factores ambientales (Kong *et al.*, 2003).

Las antocianinas se sintetizan en determinados tejidos y únicamente durante determinadas etapas de vida de la planta, las cuales han sido objeto de investigación genética y bioquímica, cuyos resultados han permitido conocer la ruta biosintética de los flavonoides (Boss *et al.*, 1996), misma que da información acerca de las reacciones involucradas y sobre algunos genes que son altamente expresados en estadio de flores y especialmente en las etapas de maduración del fruto cuando ocurre el desarrollo del color (Figura 2).

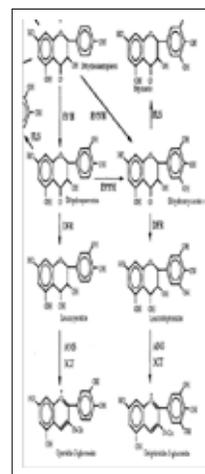


Fig.2 Ruta Biosintética de Antocianinas

La acumulación visible de estos compuestos usualmente refleja la actividad de las enzimas involucradas en la ruta biosintética (Jaakola *et al.*, 2002), las cuales, pueden actuar como complejos multienzimáticos asociados con las membranas, lo que impacta la regulación, eficiencia y especificidad de la vía metabólica (Jeong *et al.*, 2004).

---

Estudios de diferentes especies, como arábidopsis (*Arabidopsis thaliana*), maíz (*Zea mays*), petunia (*Petunia hybrida*), tabaco (*Nicotiana tabaco*) y vid (*Vitis vinifera*) han llevado a dilucidar las rutas de la expresión de genes que codifican a las enzimas, y su interacción física con el retículo endoplasmático (RE) (Downey *et al.*, 2003) (Achnine *et al.*, 2004).

Zhang (2004), menciona que la síntesis de estos pigmentos comienza con la conversión de los precursores fenilalanina y acetato. La chalcona sintasa (CHS) condensa los precursores activos malonil CoA y 4-cumaronil CoA para formar naringenina-chalcona (Wesche, 1999). Asimismo, indica que en las flores, la flavonona 3-hidroxilasa (F3H), enzima del tipo citocromo P450 hidroxilasa, cataliza la hidroxilación del carbono 3 del anillo C de naringenina, para transformarlo en dihidrokaempferol y dirige el flujo de carbono a la síntesis de Cianidina, Delfinidina y Peonidina en menor proporción (Camire, 2002). Esta etapa es de gran importancia, ya que los diferentes patrones de hidroxilación que se distinguen en las antocianinas generan los colores característicos que van desde rojo hasta púrpura, lo que determina además su capacidad antioxidante (Eder, 1996).

La expresión de los cinco genes que codifican para las enzimas PAL, CHS, F3H, DFR Y ANS se producen en dos fases: en la floración (temprana) y otra cercana al cambio de color del fruto (tardía) (Boss *et al.*, 1996). Por lo que, amplificar mediante RT-PCR los cuatro principales genes F3'H, F3'5'H, DFR y ANS relacionados con la biosíntesis de antocianinas en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) fue el objetivo del presente trabajo en virtud de su importancia para fines alimenticios, terapéuticos y sus propiedades antioxidantes.

### **Materiales y métodos**

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de biología molecular del Centro de Investigación de Graduados Agropecuarios del Instituto Tecnológico de Tlajomulco de Zúñiga Jalisco, ubicado en el municipio de Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco.

En este estudio se emplearon cinco variedades de jamaica donadas por el Banco de germoplasma del Labo-

ratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco las cuales corresponden a: 1) Americana 2) Diamante 3) Colima 4) Guerrero 33 y 5) Guerrero 34 las cuales son clasificadas y numeradas según su coloración que van desde un rojo intenso hasta incoloro.

Los iniciadores de las secuencias genómicas se diseñaron con base en las secuencias de proteínas (F3'H, F3'5'H, DFR y ANS) reportadas en la base de datos del Gene Bank con acceso en el The National Center of Biotechnology Information (NCBI) con especies similares a *Hibiscus sabdariffa* seleccionadas con base en la coloración de las variedades en estudio (cianidina y delfinidina) se utilizaron cinco secuencias pertenecientes a las familias, *Torenia*, *Ipomea*, *Petunia hybrida*, *Rosa hybrida* y *Genciana*. Las secuencias fueron analizadas mediante el programa DNASTAR V 4.05 Lasergene 99 para finalmente alinearlas y editarlas, las regiones codificantes se utilizaron en el diseño de los primers con el apoyo del software PerlPrimer version 1.1.10., donde se consideraron las secuencias homólogas de las especies diferentes.

Durante la etapa juvenil de la planta de jamaica se obtuvo el RNA total de la hoja y cáliz con el protocolo de extracción del Kit TRIZOL (Invitrogen), y por medio de la transcripción reversa se sintetizó cDNA usando el kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), utilizando hexameros. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, se emplearon 50 ng de ADN, agua MQ (Sigma); Buffer de Reacción 1 X, dNTP's 0.2 mM, 0.8 pmol de cada primer y 2.5 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) con los primers para cada gen, las condiciones en el termociclador fueron: temperatura inicial de desnaturalización 94°C por dos minutos seguido de 35 ciclos con desnaturalización 94°C por un minuto, alineamiento 52°C para F3'H, F3'5', DFR, y ANS un minuto, dos minutos de extensión a 72°C y finalmente una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los productos amplificados fueron analizados en gel de agarosa al 1.2 %, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en UV (White/2UV).

### **Resultados y discusión**

Los primers obtenidos en las diferentes especies resultaron ser homólogos en las secuencias de proteínas repor-

tadas para diferentes especies, éstos presentan entre 20 y 24 nucleótidos y un contenido de GC distribuido de forma regular, además de tener una temperatura de alineamiento similar con un máximo de 5° C de diferencia entre ellos (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Primers degenerados para RT-PCR en jamaica**

GEN	OLIGONUCLEOTIDOS
F3'H	FLA3H-F ATGAYDMAGAAYTAYGGHCC
	FLA3H-R1 CTTGDAHYTCHAYCCAARRD
	FLA3H-R2 GDCCATAWSDTTTCRTCCAT
F3'5'H	F35H-F GCWARAGCGTTCYTSAAAAC
	F35H-R1 CATRCCWRRRTCWATCCCVTGR
	F35H-R2 ATAAKCATSAAHAGGKAGSCMW
DFR	DFR-F DTTTCAYRTGGCHACDCCTYT
	DFR-R1 CAAAYTMCATCCAMCYNGTC
	DFR-R2 ACWGGRAYGTCRTRYTCYAT
ANS	ANS-F RGAVGCMGCNDTSGANTGGGG
	ANS-R1 CNGGRTGAGGYCATTTVGGYT
	ANS-R2 AANACNGCCCAHGAAAYTMACC

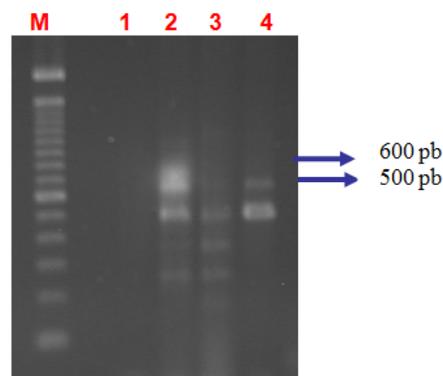
A través de la técnica de Reacción de la Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa (RT-PCR) se obtuvieron los resultados para cada gen mostrados en el cuadro 2.

**Cuadro 2. Características de genes amplificados por RT-PCR**

Gen amplificar	Primer usado	Tamaño amplif. pb
<i>f3'h</i>	F3'H F/R1	500, 600
<i>f3'5'h</i>	F3'5'H F/R2	400, 900
<i>dfr</i>	DFR F/R2	no amplifica
<i>ans</i>	ANS F/R2	400, 700

Resultados similares han sido reportados por Toda *et al.*, (2002) que trabajo con *Glycine max* para obtener un fragmento de 590 pb para el gen F3'H (1,034 pb) el cual utilizó primers degenerados, Mori *et al.*,(2004) reportó el gen F3'5'H (1,518 pb) en *Vinca major* dos fragmentos de 885 pb muy próximos a los obtenidos en jamaica, Fazard *et al.*,(2003) reportó que en *Viola cornuta* se obtuvieron fragmentos de genes para ANS (1,188 pb) los cuales fueron de 405 pb y 783 pb en flores en desarrollo y flores completamente abiertas, siendo muy parecidos a los de jamaica tanto en los estadios como en el tamaño del fragmento. La identidad de las secuencias amplificadas fue en 98% para F3'H y ANS, para F3'5'H en un 88%, en comparación con secuencias previamente reportadas.

Del gen F3'H/R1 y F3'5'H/R2 (Figura 3) se obtuvieron dos fragmentos de 500 y 600 pb, utilizando los estadios de brote rojo donde el fragmento fue débil, en hoja fue un solo fragmento poco visible y en cáliz pequeño fue notable, resultados similares han sido reportados por Jeong *et al.*, (2005).



**Figura.3 Amplificación de F3'H F/R1:** de la variedad americana. M, marcador, 1) brote floral, 2) brote rojo, 3) hoja, 4) cáliz pequeño,

Para el gen F3'5'H/F y F3'5'H/R2 (Figura 4) en jamaica se obtuvo un fragmento de 400 pb, utilizando los mismos estadios, en brote rojo el fragmento fue poco visible, en hoja fue notable, en cáliz pequeño se obtuvieron dos fragmentos de 400 pb y 900 pb el fragmento fue débil, estos resultados son similares a los reportados por Castallarín *et al.*, (2006).

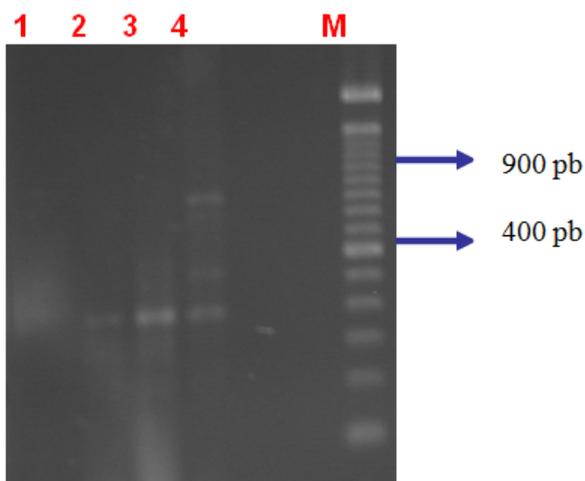


Figura.4 Amplificación de F3'5'H F/R2: en la variedad americana. 1) brote floral, 2) brote rojo, 3) hoja, 4) cáliz pequeño, M) marcador

Los resultados obtenidos en jamaica donde en brote floral no obtenemos banda que indique la presencia de ANS/F y ANS/ R2, el brote rojo dio un fragmento débil de 400 pb, mientras que en la hoja se obtuvieron tres bandas de 400, 500 y 700 pb y en cáliz pequeño obtuvimos una banda notable de 400 pb similares a los reportados por Fazard *et al.*, (2003). (Figura.5).

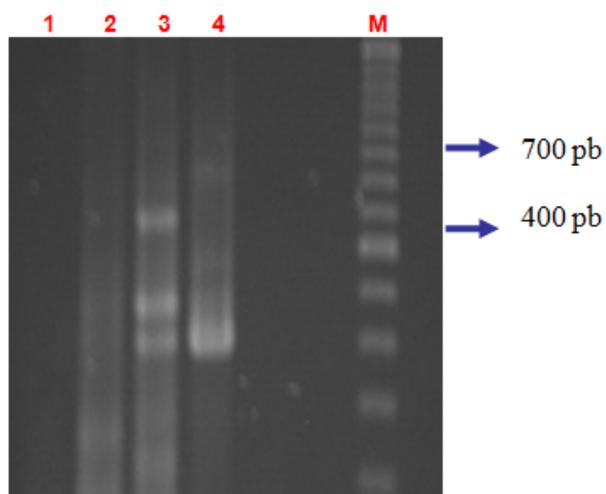


Figura. 5 Amplificación de ANS F/R2, en la variedad Americana. 1) brote floral, 2) brote rojo, 3) hoja y 4) cáliz pequeño.

### Conclusiones

Mediante el análisis bioinformático, se logró el diseño de los primers específicos para los genes F3'H, F3'5'H, DFR, ANS, los cuales se amplificaron por PCR en las diferentes variedades de jamaica.

Se estandarizó la técnica para el aislamiento de RNA total de jamaica, el cual se obtuvo de calidad. Se amplificaron por RT-PCR los fragmentos correspondientes a los genes *f3'h*, *f3'5'h*, y *ans*.

Con la información obtenida se pretende realizar la manipulación de la planta de jamaica para el desarrollo de nuevas variedades mejoradas que produzcan mayor cantidad de antocianinas.

---

## Bibliografía

- Achnine L, Blancaflor E.B., Rasmussen S., Dixon R.A. (2004). Localitation of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 16:3098-3109.
- Boss, P.K., C Davies, Robinson, S.P. (1996). *Analysis of expression of anthocyanin pathway genes in developing Vitis vinifera cv. Shiraz grape berries and implication for pathway regulation*. *Plant Physiol.*111:1059-1066.
- Camire, M:E: 2002. *Blueberry and grape anthocyanins as breakfast cereal colorant*. *J. Fd. Sci.*, 67,438.
- Castellarin, S., Gaspero, G.D., Marconi, R. (2006). *Colour variation in red grapevines (Vitis vinifera): genomic organisation, expression of flavonoide 3' hidroxylase, flavonoide 3'5' hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin/blue delphinidin based anthocyanins in berry skin*. *BMC Genomic* 7:12.
- Downey, M. JS, Harvey and Robinson, S.P. (2003). *Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (Vitis vinifera L.)*.*Grape Wine Res.* 9:110-121.
- Eder, R. Pigments: *In Handbook of food analysis*. Ndlet, M., L.1996
- Editorial Marcel Decker, Inc.New York, USA. P 964-983.
- M, Fazard, R, Griesbach, J, Hammond. R, Weiss. 2003. *Differential expression of three key anthocyanin biosynthetic genes in a color-changing flower, Viola cornuta cv. Yesterdar, today and tomorrow*. *Plant Science*. pp. 1333-1342.
- Fennema, O.R. 2002. *Química de los alimentos*. 2da. Edición. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (España) from maize seedlings. *Plant Physiol.* 80, 483-486.
- Jaakola, L., Maatta, K., Pirttila, A.M., Torronen, R., Karenlampi, S., Hohtola, A. (2002). *Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation and anthocyanin, proanthocyanindin and flavonol levels during bilberry fruit development*. *Plant Physiol.* 130:729-739.
- Jeong, S., Yamamoto, H., Esaka, M. (2006). *Expression of flavonoid 3' hydroxylase and flavonoid 3'5' hydroxilase genes and flavonoid composition in grape (Vitis vinifera)*. *Plant Science* 170: 61-69.
- Kong, J. M., Chiam, L. S., Goh, N.K., Chia, T.F., Brouillard, C. (2003). *Analysis and biological activities of anthocyanins*. *Phytochemistry* 64:923-933.
- Márquez, V.R., De la Rosa, T.C., Augusto, R.C., Medina, M.M. 2007. *Actividad diurética del extracto total acuoso de los cálices de Hibiscus sabdariffa, L. administrado en ratas albinas variedad Winstar*. *Sciencia et Technica* 12(3):377-381
- Mori,S., Kobayashi, H., Hoshi,Y., kondo, M., y Nakano, M. 2004. *Heterologous expression of the flavonoide 3' 5'- hydroxylase gene of Vinca major alters flower color in transgenic Petunia hybrida*. *Plant Cell.* 22:415-421.
- Olantude, F.E. (2003). *African Indigenous Plants whit chemotherapeutic Potentials and Biotechnological Approach to the Production of Bioactive Prophylactic Agents*. *African Journal of Biotechnology*. Vol.2, pp 662-671.
- Toda, K., Yang, D., Yamanaka, N. y Watanabe, S. 2002. *A single-base deletion in soybean flavonoid 3' hydroxylase gene is associated whit gray pubescence color*. *Plant Molecular Biology.* 50: 187-196.

---

Wesche, 1999. *Hibiscus anthocyanins effects of interactions with poliphenoloxidase, acetaldehyde and catching on colour stability.*

Zhang, W., Franco, C., Curtin, C. and Conn, S. 2004. *To stretch the boundary of secondary metabolite production in plant cell-based bioprocessing: Anthocyanin as a case study.* Journal of Biomedicine and Biotechnology 5:264-271.

Datos de los autores

Graciela López Guzmán  
Unidad Académica de Agricultura,  
Universidad Autónoma de Nayarit. México  
[lguzman2303@hotmail.com](mailto:lguzman2303@hotmail.com)

Juan F. Gómez L.  
Instituto Tecnológico de Tlajomulco,  
Jalisco, México.

Juan A. Aguilar C.  
Unidad Académica de Agricultura,  
Universidad Autónoma de Nayarit. México  
Pablo Ruelas H.  
Unidad Académica de Agricultura,  
Universidad Autónoma de Nayarit. México

Roberto Valdivia R.  
Unidad Académica de Agricultura,  
Universidad Autónoma de Nayarit. México