

## CAROTENOIDES EN *TAGETES ERECTA* L. LA MODIFICACIÓN GENÉTICA COMO ALTERNATIVA

### CAROTENOIDS IN *TAGETES ERECTA* L. GENETIC MODIFICATION AS AN OPTION

Alma Angélica Del Villar-Martínez<sup>1\*</sup>, Miguel Ángel Serrato-Cruz<sup>2</sup>, Araceli Solano-Navarro<sup>1</sup>,  
Martha Lucía Arenas-Ocampo<sup>1</sup>, Adrián Guillermo Quintero-Gutiérrez<sup>1</sup>, José Luis Sánchez-Millán<sup>3</sup>,  
Silvia Evangelista-Lozano<sup>1</sup>, Antonio Jiménez-Aparicio<sup>1</sup>, Federico Alfredo García-Jiménez<sup>3</sup>  
y Pablo Emilio Vanegas-Espinoza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional (CEPROBI-IPN). Km. 8.5 Carr. Yautepec-Jojutla, Col. San Isidro. 62731, Yautepec, Mor. Tel (735) 394-2020, Fax (735) 394 1856. <sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Texcoco, Edo. de Méx. <sup>3</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.

\* Autor para correspondencia (im\_delvillar@hotmail.com)

#### RESUMEN

El cempasúchil (*Tagetes erecta* L.) es una planta originaria de México y sus flores acumulan carotenoides, principalmente luteína. Los pigmentos del cempasúchil se utilizan como aditivos en la elaboración de alimentos para aves, peces y crustáceos, y así mejorar el aspecto de éstos para el consumo humano. Existen estudios en los que se relacionan a los carotenoides con la prevención de algunas enfermedades oculares asociadas con la edad, como las cataratas y la degeneración macular, los cuales han producido resultados interesantes y han promovido el avance en otras áreas del conocimiento relacionadas con estos compuestos, como el mejoramiento de los carotenoides para su utilización en alimentos de consumo común, a través del uso de técnicas de ingeniería genética.

**Palabras clave:** *Tagetes erecta*, cempasúchil, carotenoides, luteína, ingeniería genética.

#### SUMMARY

Marigold (*Tagetes erecta* L.) is a plant native to México. Its flowers accumulate carotenoids, mostly as lutein. Flower pigments are used as food additives for poultry, fish and crustacean feed, in order to enhance the visual attractiveness of such products for human consumption. Different studies on carotenoids and their effects on the prevention of certain ocular diseases associated with aging, such as cataracts and macular degenerative diseases, have produced interesting conclusions. These advances have promoted important advances in other areas of knowledge related to these compounds; for example, the improvement of carotenoids to be used in common products in the food industry through genetic engineering techniques.

**Index words:** *Tagetes erecta*, marigold, carotenoids, lutein, genetic engineering.

#### INTRODUCCIÓN

El mercado actual de los pigmentos del cempasúchil (*Tagetes erecta* L.) a nivel mundial no solamente demanda productos orientados a la alimentación de animales (aves, peces, crustáceos) y para consumo humano, sino también de productos que además de tener capacidad nutricional, provocan algún efecto benéfico en la salud humana (anticancerígeno y antioxidante), lo cual asegura la permanencia del cempasúchil en el circuito mundial por mucho tiempo. Actualmente los empresarios mexicanos conservan el liderazgo internacional en la industrialización de los pigmentos de esta especie. La obtención de variedades de cempasúchil de uso industrial básicamente ha sido posible por el empleo del mejoramiento genético mediante la genotecnología clásica que ha contribuido significativamente al incremento del contenido de carotenoides (Sreecalá y Raghava, 2003); las posibilidades que tiene esta herramienta en el futuro para seguir contribuyendo a la mejora de este carácter tendrá que apoyarse en la diversidad genética de la especie en su área de origen y de domesticación actual, en este caso México.

El avance vertiginoso en ingeniería genética de especies vegetales es un recurso científico-tecnológico importante que tiene que valorarse en el mejoramiento del contenido de carotenoides en cempasúchil y, consecuentemente, considerarlo estratégico para potenciar los procedimientos de la genotecnología clásica. Por tanto, es necesario revisar la información científica disponible acerca de los mecanismos de síntesis de los pigmentos del cempasúchil, la regulación de su expresión a nivel molecular y los conocimientos

recientes sobre técnicas especiales de inserción de ADN en el genoma de esta especie, y discriminar sobre la expectativa para explorar la modificación genética del cempasúchil hacia la mayor síntesis de carotenoides. En este escrito se describe una revisión documental sobre los carotenoides del cempasúchil en las partes de la planta que los contienen, biosíntesis, obtención y uso, prevención de enfermedades y manipulación genética de la ruta de biosíntesis en sistemas vegetales.

### CEMPASÚCHIL

El cempasúchil es una planta originaria de México (Tosco, 1970). Los antiguos mexicanos del grupo náhuatl le dieron el nombre de “cempoalxóchitl” (flor de las cuatrocientas vidas) y era empleada en diversas ceremonias religiosas (Sahagún, 1829). En las diversas regiones de México la planta ha recibido diferentes nombres: apátsicua, cempaxúchil, cempazúchil, cempasúchitl, cimpual, zempoalxóchil, flor de muerto, y en la península de Yucatán se le llama x’pujuc (Chi *et al.*, 2002).

El cempasúchil es una planta herbácea anual, erecta y muy aromática, de tallos estriados y hojas pinnadas, cuya flor es una cabezuela solitaria conocida como capítulo, inflorescencia que a su vez contiene numerosas flores individuales de los tipos tubulado o ligulado (Serrato-Cruz, 2006). Estas inflorescencias pueden presentar diferente morfología: tipo pompón o doble (todas las flores individuales liguladas); tipo sencillo o margarita (una hilera de flores liguladas en la periferia del capítulo o zona radial, y numerosas flores individuales tubuladas en el disco floral o zona central) (Chi *et al.*, 2002; Serrato-Cruz, 2006); tipo semidoble (varias hileras de flores liguladas en la zona radial, del capítulo y flores del tipo tubulado en el disco floral); y apétalas (sin flores liguladas, solamente flores individuales tubuladas) (Gupta *et al.*, 1999; Serrato-Cruz, 2006).

Para el aprovechamiento industrial de los pigmentos florales del cempasúchil, las inflorescencias tipo doble son las de mayor importancia y presentan colores que varían del amarillo débil al anaranjado intenso (Figura 1). Esta gama de colores se debe a la presencia de diversos carotenoides, de los cuales el principal es la luteína (Soule, 1993; Bartley y Scolnik, 1995; Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003; Martínez-Peña *et al.*, 2004; Navarrete-Bolaños *et al.*, 2005).



Figura 1. Pigmentaciones presentes en la flor de *Tagetes erecta*.

### BIOSÍNTESIS DE LOS CAROTENOIDES DEL CEMPASÚCHIL

Los carotenoides son compuestos pertenecientes al grupo de los isoprenoides o terpenoides, todos ellos originados de un precursor común, una molécula de cinco carbonos llamada isopreno. Esta molécula en su forma reactiva, isopentenil pirofosfato (IPP), se condensa con su propio isómero, dimetilalil pirofosfato (DMAPP) para producir inicialmente el geranil pirofosfato (GPP), posteriormente el farnesil pirofosfato (FPP) y finalmente el geranilgeranil pirofosfato (GGPP) (Delgado-Vargas *et al.*, 2000) (Figura 2). Las unidades se van uniendo conforme a un patrón cabeza-cola hasta antes de la formación de GGPP, la cual se

origina de la unión cola-cola de dos moléculas de GPP para producir un compuesto de 40 carbonos con el orden invertido en el centro (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003), el cual da origen al fitoeno, primer carotenoide producido en la ruta, que es incoloro (Figura 2). La insaturación posterior de la cadena hidrocarbonada produce do-

bles enlaces conjugados, lo que le da a la molécula la capacidad de absorber luz de ciertas longitudes de onda y provocar la pigmentación de los organismos o tejidos que los contienen (Figura 2).

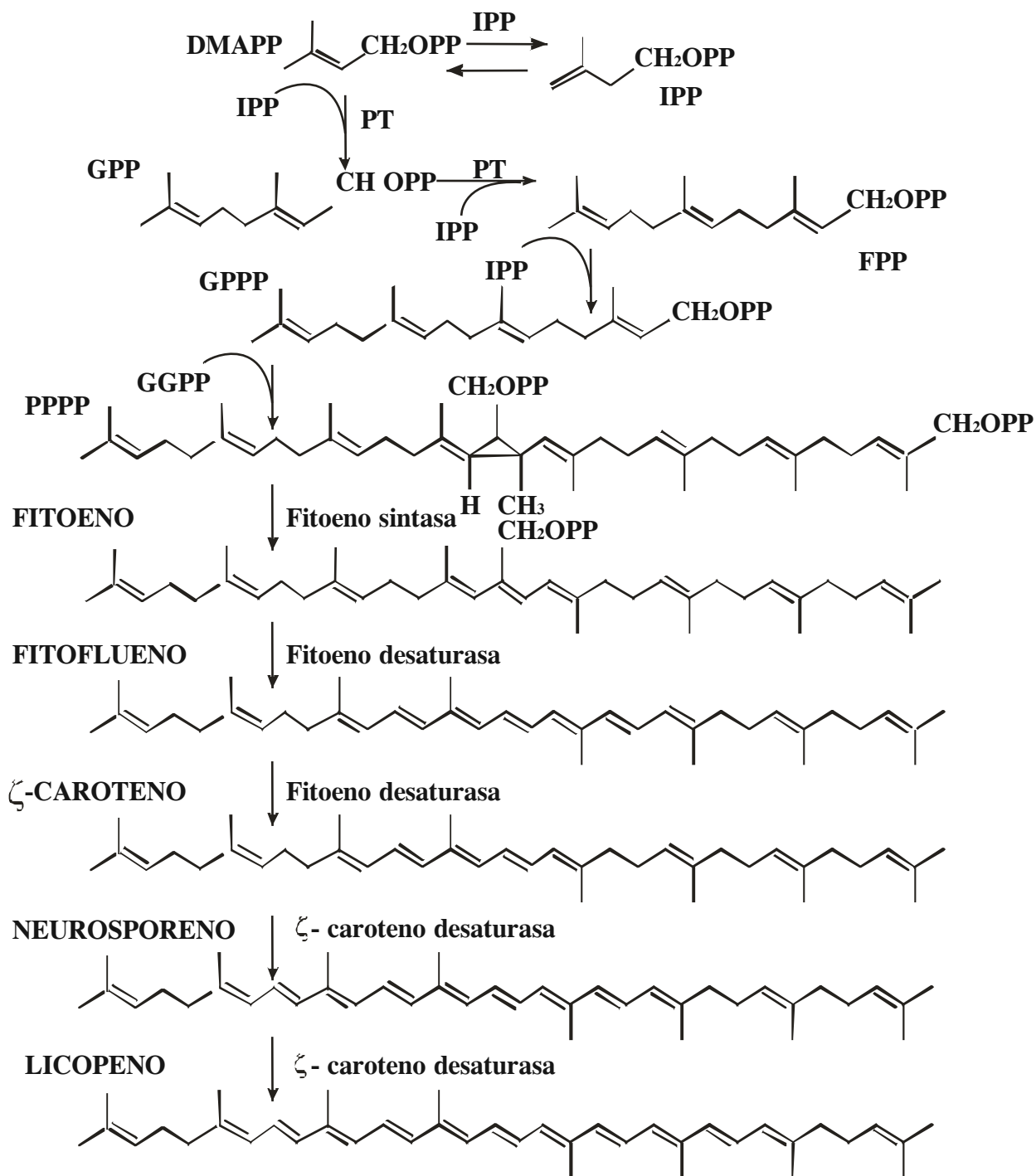


Figura 2. Ruta de biosíntesis de licopeno. IPP= Isopentenil pirofosfato; IPI= Isopentenil pirofosfato isomerasa; PT= Prenil transferasa; DMAPP= Dimetilalil pirofosfato; GPP= Geranil pirofosfato; FPP= Farnesil pirofosfato; GGPP= Geranilgeranil pirofosfato; PPPP= Prefitoeno pirofosfato (Adaptado de: Beyer *et al.*, 2002).

El licopeno es el precursor biosintético de la mayoría de los carotenoides cíclicos (Figura 3); la conversión de licopeno a  $\beta$ -caroteno se debe a la acción de la enzima  $\beta$ -licopeno ciclasa (LCY-B), enzima que cataliza la formación de anillos  $\beta$ -ionona en los extremos de la molécula (Cunningham *et al.*, 1996).

La ciclación del licopeno se ha planteado como un punto de regulación importante en la ruta de biosíntesis de los carotenoides. La formación del ciclo en ambos extremos de la molécula de licopeno (Figura 3) da como resultado a los  $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\epsilon$ - carotenos. La reacción de ciclación es catalizada por las enzimas  $\beta$ - o  $\epsilon$ -licopeno ciclasa (Bartley y Scolnik, 1995).

Cuando la enzima  $\beta$ -licopeno ciclasa actúa en ambos lados de la molécula ocurre la formación de  $\beta$ -caroteno, el cual es precursor de xantófilas como zeaxantina, violaxantina y anteraxantina (Figura 4). Las xantófilas se producen cuando uno o más átomos de oxígeno en grupos ceto,

hidroxi, epoxi, etc. se introducen a la molécula del caroteno (Cunningham *et al.*, 1996; Ronen *et al.*, 1999). La enzima  $\epsilon$ -licopeno ciclasa puede actuar en ambos extremos de la molécula y producir el  $\epsilon$ -caroteno; este compuesto se ha localizado en muy pocos organismos y en cantidades muy bajas (Cunningham y Gantt, 2001). Los anillos  $\epsilon$  difieren de los  $\beta$  en la posición del doble enlace dentro del ciclohexano; en cualquier caso, en plantas es común encontrar anillos modificados (Pecker *et al.*, 1996).

Finalmente, otro grupo de carotenoides bicíclicos tiene un anillo  $\beta$  y un anillo  $\epsilon$  en su estructura. Estos anillos son comunes en plantas y animales y son precursores de varias xantófilas, de las que la luteína es el ejemplo principal en muchas plantas y algas (Figura 4) (Bartley y Scolnik, 1995; Chappell, 1995; Cunningham *et al.*, 1996; Pogson *et al.*, 1996; Ronen *et al.*, 1999).

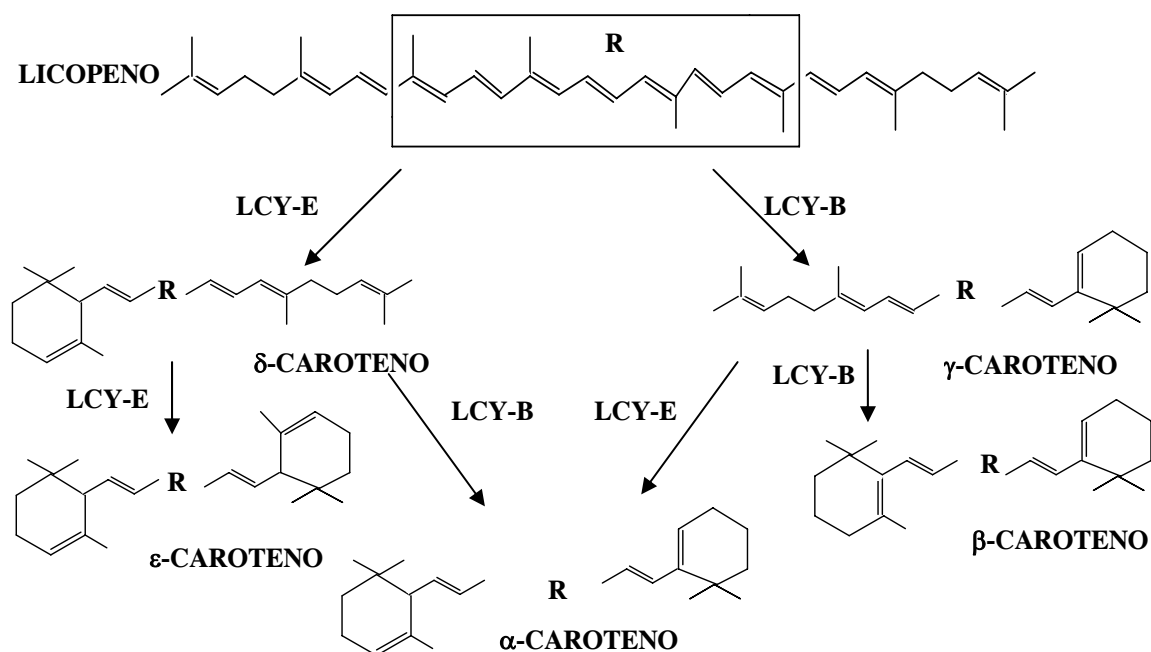


Figura 3. Biosíntesis de carotenoides cíclicos a partir de licopeno. LCY-E= Licopeno  $\epsilon$ -ciclasa; LCY-B= Licopeno  $\beta$ -ciclasa (Adaptado de: Cunningham *et al.*, 1996).

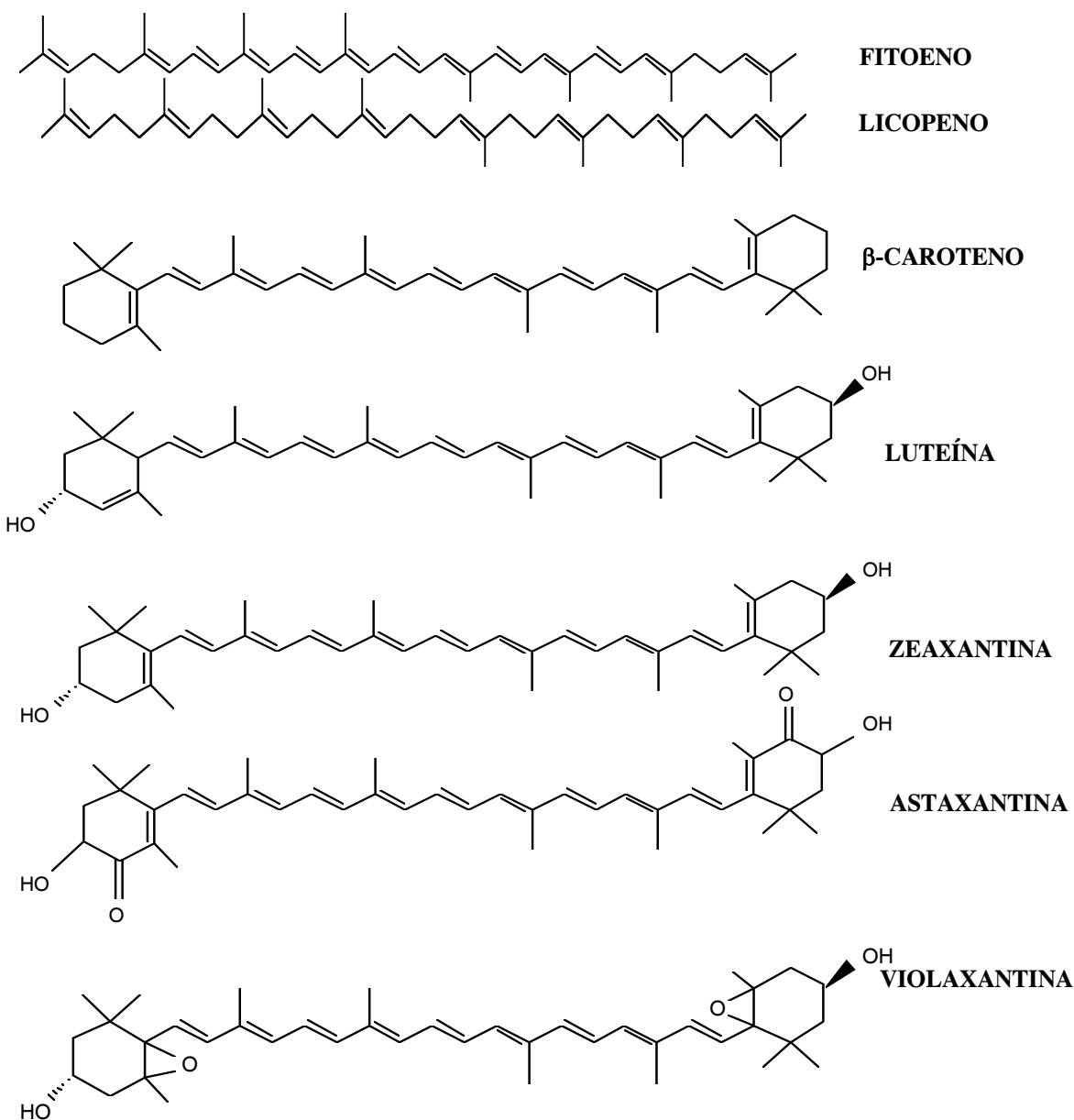


Figura 4. Estructura de algunos carotenoides cíclicos y acíclicos. Se muestra la conformación más estable (todo *trans*).

Existe gran similitud entre las estructuras químicas de la vitamina A y la de algunos carotenoides; los que tienen un anillo  $\beta$ -ionona (Figura 3) presentan actividad biológica de provitamina A (Figura 5). La mucosa intestinal de los animales superiores oxida estos anillos y los transforma en retinal, el que a su vez, por efecto de una reducción, se vuelve retinol, que finalmente es almacenado en el hígado como palmitato (Mayne, 1996; Rosati *et al.*, 2000). Los carotenoides biológicamente activos son los que tienen una configuración *trans*, ya que sus isómeros *cis* reducen su disponibilidad como precursores de vitamina A (Schieber y

Carle, 2005). La síntesis química de carotenoides es compleja, produce una mezcla racémica de estereoisómeros (*cis* y *trans*), algunos de los cuales, al no presentarse en la naturaleza, no tienen la actividad biológica adecuada, y por tanto no son aceptados para su consumo humano porque pueden provocar efectos adversos. Estas desventajas no se presentan en la producción de carotenoides en sistemas biológicos, como microorganismos, células vegetales y plantas completas, en los cuales se producen sólo los estereoisómeros naturales (Ausich, 1997).

### OBTENCIÓN Y USOS DE LOS PIGMENTOS DEL CEMPASÚCHIL

En la industria alimentaria el color de los productos es una característica importante ya que de ésta depende, en gran medida, la atracción hacia el consumidor. Para su utilización en esta industria, de manera general el proceso de obtención de los carotenoides de *T. erecta* incluye varios pasos. Primero, las flores son prensadas, deshidratadas y molidas. Posteriormente se realiza una extracción con disolventes, la que genera una oleorresina compuesta en su mayoría de carotenoides esterificados con un contenido de 70 a 120 mg g<sup>-1</sup> de xantófilas (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003). Esta oleorresina es saponificada a través de una hidrólisis alcalina para liberar a las xantófilas, de las cuales de 80 a 90 % es luteína, 5 % zeaxantina y de 5 a 15 % son otros carotenoides como violaxantina y criptoxantina (Fletcher *et al.*, 1986; Leigh *et al.*, 1999). El pigmento de la oleorresina puede ser purificado y mezclado con acei-

te vegetal, silicato de calcio y gelatina, entre otros aditivos, lo que da como resultado un producto con condiciones adecuadas para ser utilizado como aditivo pigmentante en la elaboración de pastas, aceites vegetales, productos lácteos y de panificación, así como jugos y mostaza (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003).

En la avicultura se utiliza la oleorresina en la elaboración de alimento para aves, con el fin de intensificar la pigmentación amarilla característica de la piel y tarsos del pollo de engorda, así como la yema del huevo. El nivel requerido en una ración para proveer una adecuada pigmentación puede variar ampliamente, dependiendo de la intensidad de pigmentación deseada por un mercado en particular (Martínez-Peña *et al.*, 2004). En atención a esta necesidad existen líneas de investigación que abordan los efectos que tienen los pretratamientos en la eficiencia de extracción de los carotenoides de *T. erecta* (Navarrete-Bolaños *et al.*, 2005).

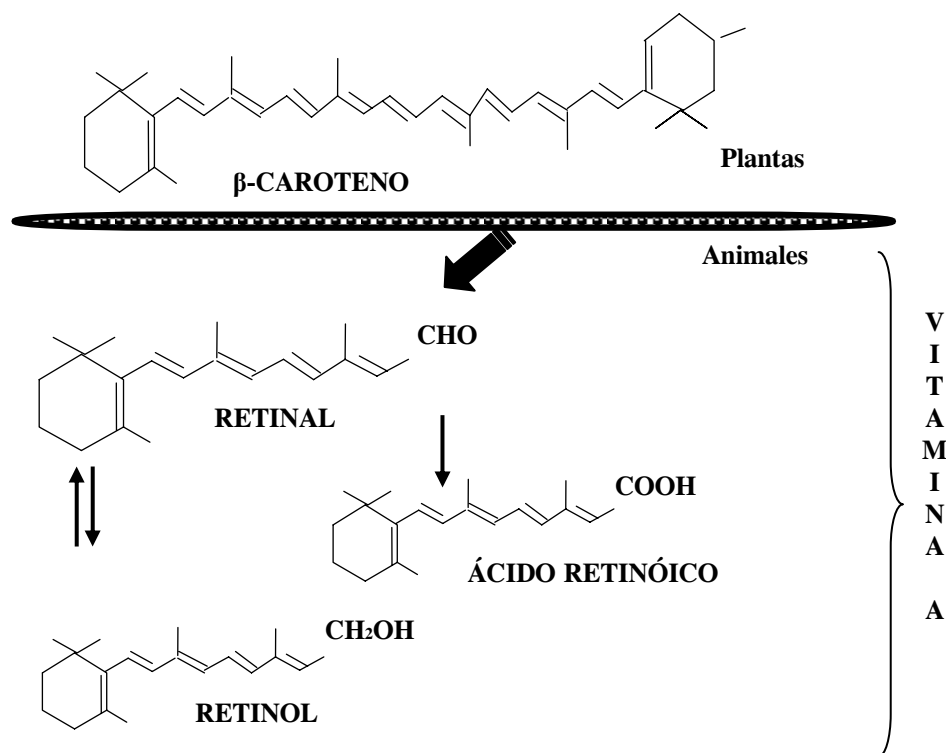


Figura 5. Esquema que ilustra la participación de los carotenoides como precursores de la vitamina A.

## LOS CAROTENOIDES EN LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES

En años recientes se ha observado un marcado rechazo hacia el uso de colorantes artificiales, y consecuentemente se prefieren productos de origen natural. El licopeno es uno de los principales carotenoides en la dieta de norteamericanos y europeos y se acumula en los frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.); este compuesto es sin duda el que más ha llamado la atención por su posible efecto en la salud humana. En este sentido se ha relacionado al licopeno con la prevención de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Astorg 1997; Clinton, 1998; Paredes-López *et al.*, 1999).

Además de la característica que presentan algunos carotenoides de ser precursores de vitamina A, existen otros a los que se les han atribuido diversas funciones biológicas importantes (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Al respecto, en unos trabajos se reporta la inhibición del crecimiento de células cancerosas de colon una vez que fueron tratadas con cantaxantina, en las cuales este compuesto indujo apoptosis (Bertram, 1999). También se ha observado menor incidencia de cáncer de colon en pacientes que presentaron niveles muy altos de licopeno y luteína en sangre (Nishino, 1997; Slattery *et al.*, 2000).

A la luteína, el carotenoide más abundante en la flor de cempasúchil, se le ha asociado con la prevención del desarrollo de enfermedades oculares asociadas con la edad, como son cataratas y la degeneración macular. Las cataratas resultan de la fotooxidación de las proteínas que se encuentran en la retina del ojo; durante este proceso ocurre acumulación, agregación y precipitación de esas proteínas (Mares-Perlman *et al.*, 2002). La luteína y la zeaxantina son los componentes principales de los pigmentos maculares; de acuerdo con las propiedades antioxidantes que estos compuestos presentan, su aumento en la mácula puede promover la disminución del daño oxidativo, y limitar así la cantidad de oxígeno que penetra por las membranas (Young y Lowe, 2001).

Mediante estudios epidemiológicos, diversos autores han encontrado una relación directa entre la ingesta de xantófilas (luteína y zeaxantina) y la reducción en el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer, particularmente el mamario y el pulmonar. Otros estudios sugieren que la ingesta de estos compuestos puede contribuir a la prevención de enfermedades cardiovasculares (Kritchevsky, 1999; Mollrem *et al.*, 2004; Ribaya-Mercado y Blumberg, 2004; Burke *et al.*, 2005).

## MANIPULACIÓN GENÉTICA DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN SISTEMAS VEGETALES

El estudio de los carotenoides en la prevención de enfermedades ha demostrado ser un campo muy amplio; por tanto, el interés en los carotenoides ya no es únicamente por su utilidad como pigmento, aspecto que sigue siendo de importancia, sino también por su papel como agente nutracéutico que es aquél que además de tener capacidad nutricional, provoca algún efecto benéfico para la salud humana (Mayne, 1996; Yang *et al.*, 1998). La abundancia de reportes al respecto ha promovido el avance en otras áreas, como por ejemplo el mejoramiento del contenido de carotenoides en alimentos de consumo común (Bartley y Scolnik, 1995). La manipulación genética en plantas, entre otros recursos científico-técnicos disponibles, puede ser utilizada para incrementar el contenido de estos compuestos en frutas y hortalizas.

De manera general, se ha establecido que la regulación de la biosíntesis de los carotenoides es compleja y que debe ocurrir a varios niveles debido a que su síntesis está restringida a tejidos específicos (regulación órgano-específica). Las enzimas que participan en este proceso son codificadas por genes nucleares y los precursores de las proteínas son importados a plástidos; sin embargo, la biosíntesis de carotenoides puede ser regulada potencialmente a nivel transcripcional y postranscripcional (Godoy-Hernández y Lozoya-Gloria, 1999).

En los últimos años se han clonado genes que participan en la ruta de biosíntesis de carotenoides (*psy*, *pds*, *lcy-b*, *lcy-e*, entre otros; Figuras 2 y 3) de varias plantas (tomate; tabaco *Nicotiana tabacum*; narciso *Narcissus pseudonarcissus*; cempasúchil *Tagetes erecta*; girasol, *Helianthus annuus*, etc.). Estos avances representan una herramienta molecular importante para llevar a cabo la manipulación genética de la carotenogénesis (Cunningham *et al.*, 1996; Mann *et al.*, 2000; Cunningham y Gantt, 2001; Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003; Del Villar-Martínez *et al.*, 2005; Salvini *et al.*, 2005).

Un ejemplo de esto es la transformación genética del arroz (*Oryza sativa* L.), en el que tras ocho años de trabajo se logró la acumulación de carotenoides en el endospermo de arroz, debido a la introducción de: un gen que codifica para la enzima con actividad de fitoeno sintasa de *Narcissus*, la cual produjo buenas cantidades de fitoeno en su endospermo; un gen con actividad de doble desaturasa de *Erwinia*; y un gen que codifica para la  $\beta$  licopeno ciclasa de *Narcissus*. Con estos tres elementos se logró colocar todos los genes necesarios para inducir la biosíntesis desde geranil geranil pirofosfato hasta  $\beta$  caroteno, con lo cual se

generó una variedad de arroz con endospermo de color amarillo que contiene provitamina A y otros terpenoides de importancia nutritiva. Para sorpresa de muchos, se logró manipular toda una ruta compleja de biosíntesis terpénica, y canalizar recursos de la planta hacia la valiosa provitamina A (Potrykus, 2001; Beyer *et al.*, 2002). La principal justificación de esta investigación fue la de beneficiar a las personas que consumen arroz como alimento principal y al mismo tiempo presentan alta incidencia de enfermedades relacionadas con la deficiencia de vitamina A. La línea de arroz dorado produce suficiente provitamina A ( $1.6 \mu\text{g g}^{-1}$  de endospermo) como para esperar un efecto positivo en el alivio de su deficiencia en la dieta habitual de muchas personas (Ye *et al.*, 2000).

Por otro lado, se han hecho varios trabajos tendentes a modificar genéticamente las plantas de tomate con la finalidad de incrementar los niveles de carotenoides en el fruto. Un ejemplo es la transformación genética de estas plantas al introducirles el gen que codifica para la enzima fitoeno sintasa, la cual participa en las etapas iniciales de la ruta de biosíntesis de carotenoides. Desafortunadamente, como resultado de esta modificación se generaron varios fenotipos en donde la característica sobresaliente de los individuos fue el enanismo (Fray *et al.*, 1995). Sin embargo, los esfuerzos posteriores se dirigieron a la elaboración de construcciones adecuadas y se logró sobreexpresar el gen que codifica para la enzima licopeno  $\beta$  ciclasa y  $\beta$  hidroxilasa, bajo el control de un promotor específico de fruto aislado del gen que codifica para la enzima fitoeno desaturasa, con lo cual se logró la acumulación de nuevos pigmentos en el fruto del tomate transgénico: la  $\beta$  criptoxantina y zeaxantina. No obstante que los primeros trabajos a este respecto no lograron la acumulación del compuesto sin afectar el desarrollo normal de la planta (Fray *et al.*, 1995), con esfuerzos posteriores se logró modificar la cantidad y calidad de los carotenoides que acumula el fruto de tomate (Rossati *et al.*, 2000; Dharmapuri *et al.*, 2002; Fraser *et al.*, 2002).

En cuanto a la síntesis de nuevos carotenoides, se ha reportado la producción de astaxantina, un compuesto con alto poder pigmentante y con propiedades nutraceuticas. En tejidos de tabaco se llevó a cabo la modificación genética de la ruta de biosíntesis de carotenoides mediante la introducción del cDNA del gen *crtO*, el cual codifica para la enzima  $\beta$ -caroteno cetolasa. El gen utilizado para la modificación genética proviene de la alga *Haematococcus pluvialis* y participa en las etapas finales de la ruta. El gen *crtO* fue transferido a las plantas de tabaco bajo el control del promotor *pds* (del gen que codifica para la enzima fitoeno desaturasa), el cual tuvo como función dirigir el producto de la expresión del gen hacia el tejido blanco. Los cromoplastos del nectario de las plantas transformadas

acumularon astaxantina principalmente, y otros cetocarotenoides en menor proporción, lo cual provocó el cambio de la coloración del tejido de amarillo a rojo. Con esto se demostró que mediante la introducción del gen respectivo procedente del alga *H. pluvialis*, se pueden utilizar plantas para la producción de nuevos carotenoides (Mann *et al.*, 2000).

La información obtenida de los trabajos reportados acerca de la ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas, genera conocimiento suficiente y apoya la posibilidad de continuar con estudios sobre el mejoramiento genético de cultivos que de manera natural acumulan estos compuestos. En trabajos realizados anteriormente se logró la clonación de los genes que codifican para las enzimas PSY (fitoeno sintasa), PDS (fitoeno desaturasa), LCY-B ( $\beta$ -licopeno ciclasa) y LCY-E ( $\epsilon$ -licopeno ciclasa) (Moehs *et al.*, 2001; Del Villar-Martínez *et al.*, 2005), los cuales se utilizaron para llevar a cabo los análisis de expresión de RNA mensajero en donde se observó que el gen que codifica para la LCY-B representa un punto importante de control (Del Villar-Martínez *et al.*, 2005). Con este conocimiento se ha planteado la posibilidad de transformar genéticamente al cempasúchil.

Con el sistema de *Agrobacterium tumefaciens* se ha logrado la expresión transitoria del gen reportero *uidA*, que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa; este grupo sigue realizando investigaciones para lograr la transformación estable (Godoy-Hernández *et al.*, 2006). Por otro lado, con el método de biobalística Vanegas *et al.* (2006) reportaron tanto la expresión transitoria del mismo gen *uidA*, como la integración estable del gen *nptII* que transfiere resistencia al antibiótico kanamicina; en este trabajo se obtuvo una eficiencia de transformación de 3 %. En ambos trabajos se ha logrado la expresión de genes reporteros y se continúa investigando con la finalidad de modificar la ruta de biosíntesis de carotenoides en puntos específicos, mediante la introducción de genes para potenciar su expresión y obtener una mayor cantidad de pigmentos, o bien para integrar genes heterólogos para promover la síntesis de nuevos pigmentos.

Al integrar toda la información anterior, se tiene que a partir del análisis de expresión de mensajero que sugiere que la participación de *lcy-b* a nivel de transcrito es importante en el proceso de carotenogénesis en flores de cempasúchil, y aprovechando el avance importante que se tiene con las técnicas de transformación en este sistema, se plantea la posibilidad de llevar a cabo la modificación genética a nivel de la ciclación del licopeno, mediante el uso del gen que codifica para la enzima  $\beta$ -licopeno ciclasa, la cual se clonó previamente de una biblioteca de cDNA de flores de cempasúchil (Del Villar-



Martínez *et al.*, 2005). Los trabajos de investigación en este aspecto, deberán estar dirigidos a incrementar o innovar el producto final, para de esta manera aprovechar la vasta maquinaria biosintética natural de la planta e inducir la a producir nuevos carotenoides con características funcionales y económicas más atractivas.

Es importante mencionar que el éxito en cada uno de los sistemas depende de la compatibilidad de la estrategia con cada uno de los sistemas de estudio, ya que en cada uno de ellos se puede hacer uso del conocimiento general y particularizar de acuerdo con las necesidades de cada caso.

### CONCLUSIÓN

La información documental indica que el interés por la utilización de pigmentos naturales para la industria alimentaria se ha ido incrementando durante las últimas décadas. Los estudios realizados acerca de los beneficios a la salud relacionados con el consumo de carotenoides, son realmente alentadores. Por ello, el cempasúchil representa un sistema interesante que abre un amplio panorama de estudio relacionado con su mejora mediante ingeniería genética, con la finalidad de inducir mayor producción de los compuestos que ya acumula, así como la posibilidad de producir otros con características más atractivas para ciertos mercados.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Instituto Politécnico Nacional, México, por los apoyos otorgados para la realización de trabajos de investigación.

### BIBLIOGRAFÍA

- Astorg P (1997) Food carotenoids and cancer prevention: an overview of current research. *Trends Food Sci. Technol.* 8:406-413.
- Ausich R L (1997) Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. *Pure Appl. Chem.* 69:2169-2173.
- Bartley G E, P A Scolnick (1995) Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell* 7:1027-1038.
- Bertram J S (1999) Carotenoids and gene regulation. *Nutr. Rev.* 6:182-191.
- Beyer P, S Al-Babili, X Ye, P Lucca, P Schaub, R Welsch, I Potrykus (2002) Golden rice: Introducing the  $\beta$ -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *J. Nutr.* 132:506S-510S.
- Burke J D, J Curran-Celentano, A J Wenzel (2005) Diet and serum carotenoid concentrations affect macular pigment optical density in adults 45 years and older. *J. Nutr.* 135:1208-1214.
- Chappell J (1995) The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol.* 107:1-6.
- Chi M B, P P Flores, M R Rivera (2002) Cempasúchil fuente importante de carotenoides. *Ciencia y Desarrollo* 165:20-25.
- Clinton S K (1998) Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr. Rev.* 56:36-51.
- Cunningham F X, E Gantt (2001) One ring or two? Determining of ring number in carotenoids by lycopene  $\epsilon$ -cyclases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98:2905-2910.
- Cunningham F X, B Pogson, Z Sun, K McDonald, D DellaPenna, E Gantt (1996) Functional analysis of the  $\beta$ - and  $\epsilon$ - lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *The Plant Cell* 8:1613-1626.
- Delgado-Vargas F, A R Jiménez, O Paredes-López (2000) Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40:173-289.
- Delgado-Vargas F, O Paredes-López (2003) *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses.* CRC Press Boca Raton, Florida, USA. pp:113-166, 257-305.
- Del Villar-Martínez A A, P A García-Saucedo, A Cárabez-Trejo, A Cruz-Hernández, O Paredes-López (2005) Carotenogenic gene expression and ultrastructural changes during development in marigold. *J. Plant Physiol.* 162:1046-1056.
- Dharmapuri S, C Rosati, P Pallara, R Aquilani, F Bouvier, B Camara, G Giuliano (2002) Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits. *FEBS Lett.* 519:30-34.
- Fletcher D L, C M Papa, F X Tirado (1986) The effect of saponification on the broiler coloring capability of marigold extracts. *Poultry Sci.* 65:1708-1714.
- Fraser P D, S Romer, C A Shipton, P B Mills, J W Kiano, N Misawa, R G Drake, W Schuch, P M Bramley (2002) Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 99:1092-1097.
- Fray R G, A Wallace, P D Fraser, D Valero, P Hedden, P M Bramley, D Grierson (1995) Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *The Plant J.* 8:693-701.
- Godoy-Hernández G, E Lozoya-Gloria (1999) Plant pigments: Characterization, biosynthesis, gene regulation, and applications as food additives. *In: Molecular Biotechnology for Plant Food Production.* O Paredes-López (ed). Technomic Publishing Co. USA. pp:89-130.
- Godoy-Hernández G, E Berzunza, L Concha, M Miranda-Ham (2006) *Agrobacterium*-mediated transient transformation of marigold (*Tagetes erecta*) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 84:365-368.
- Gupta Y C, S P S Raghava, R L Misra (1999) Inheritance of male sterile apetalous inflorescence in African marigold. *J. Ornament. Hort. New Series* 2:65-66.
- Kritchevsky S B (1999)  $\beta$ -carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. *J. Nutr.* 129:5-8.
- Leigh H W, R H Watkins, L W Levi, E Regalado, D M Rivadeneira, B van Breemen, S J Schwartz (1999) Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. *J. Agric. Food Chem.* 10:4189-4194.
- Mann V, M Harker, I Pecker, J Hirschberg (2000) Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nature Biotechnol.* 18:888-892.
- Mares-Perlman J, A E Millen, T Ficek, S E Hankinson (2002) The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. *J. Nutr.* 132:518S-524S.
- Martínez-Peña M, A Cortés-Cuevas, E Ávila-González (2004) Evaluación de tres niveles de pigmento de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) sobre la pigmentación de la piel en pollos de engorda. *Téc. Pec. Méx.* 42:105-111.
- Mayne S T (1996) Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J.* 10:690-701.

- Moehs C P, L Tian, K W Osteryoung, D DellaPenna (2001)** Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Mol. Biol.* 45:281-293.
- Moldrem K L, J Li, P W Simon, S A Tanumihardjo (2004)** Lutein and  $\alpha$ -carotene from lutein-containing yellow carrots are bioavailable in humans. *Amer. J. Clin. Nutr.* 80:131-136.
- Navarrete-Bolaños J L, C L Rangel-Cruz, H Jiménez-Islas, E Botello-Alvarez, R Rico-Martínez (2005)** Pre-treatment effects on the extraction efficiency of xanthophylls from marigold flower (*Tagetes erecta*) using hexane. *Food Res. Internatl.* 38:159-165.
- Nishino H (1997)** Cancer prevention by natural carotenoids. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 27:86-91.
- Paredes-López O, S H Guzmán-Maldonado, C Reyes-Moreno, C Ordorica-Falomir, F Delgado-Vargas (1999)** Alimentos nutraceuticos-realidad y ficción. *Rev. Univer. Aut. Sin.* 6:20-34.
- Pecker I, R Gabbay, F X Cunningham, J Hirschberg (1996)** Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Physiol.* 104:227-234.
- Pogson B, K McDonald, M Truong, G Britton, D DellaPenna (1996)** *Arabidopsis* carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. *The Plant Cell* 8:1627-1639.
- Potrykus I (2001)** Golden rice and beyond. *Plant Physiol.* 125:1157-1161.
- Ribaya-Mercado J D, J B Blumberg (2004)** Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. *J. Amer. College Nutr.* 23:567S-587S.
- Ronen G, M Cohen, D Zamir, J Hirschberg (1999)** Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *The Plant J.* 17:341-351.
- Rosati C, R Aquilani, S Dharmapuri, P Pallara, C Marusic, R Tabaza, F Bouvier, B Camara, G Giuliano (2000)** Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *The Plant J.* 24:413-419.
- Salvini M, A Bernini, M Fambrini, C Pugliesi (2005)** cDNA cloning and expression of the phytoene synthase gene in sunflower. *J. Plant Physiol.* 162:479-484.
- Sahagún B (1829)** *Historia General de las Cosas de Nueva España.* Ángel Ma- Garibay K (ed). 1956. Ed. Porrúa. México, D. F.
- Schieber A, R Carle (2005)** Occurrence of carotenoid *cis*-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications. *Trends Food Sci. Technol* 16:416-422.
- Serrato-Cruz M A (2006)** Manual Gráfico para la Descripción Varietal de Cempasúchil (*Tagetes* L.) Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS-SAGARPA) y la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). México 100 p.
- Slattery M L, J Benson, K Curtin, K-N Ma, D Scheffer, J D Potter (2000)** Carotenoids and colon cancer. *Amer. J. Clin. Nutr.* 71:575-582.
- Soule J A (1993)** *Tagetes minuta*: A potential new herb from South America. *In: New Crops.* J. Janick J E Simon (eds). Wiley, New York. pp:649-654.
- Sreecalá C, S P S Raghava (2003)** Exploitation of carotenoid in African marigold (*Tagetes erecta* L.) and its correlation with esterase polymorphism. *Theor. Appl. Gen.* 106:771-776.
- Tosco U (1970)** *Diccionario de Botánica.* Instituto Botánico de Agostini. Ed. Teide. S. A. Barcelona, España.
- Vanegas P E, M Valdez-Morales, M E Valverde, A Cruz-Hernández, O Paredes-López (2006)** Particle bombardment, a method to gene transfer in marigold. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 84:359-363.
- Yang Y T, G N Bennet, K Y San (1998)** Genetic and metabolic engineering. *EJB Electronic J. Biotechnol.* 1:134-141.
- Ye X, S Al-Babili, A Klöti, J Zhang, P Lucca, P Beyer, I Potrykus (2000)** Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 278:303-305
- Young A J, G M Lowe (2001)** Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arc. Biochem. Bioph.* 385:20-27.