



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

MARCADORES MOLECULARES DE LA HERENCIA MATERNA DEL PICOR EN CHILE MANZANO

MARÍA EMMA MORALES GUTIÉRREZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

Abril 2015

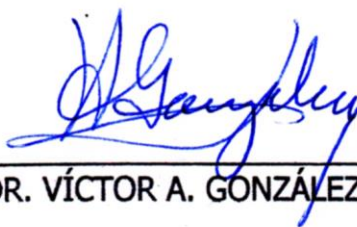
La presente tesis titulada: **Marcadores moleculares de la herencia materna del picor en chile Manzano**, realizada por la alumna **María Emma Morales Gutiérrez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



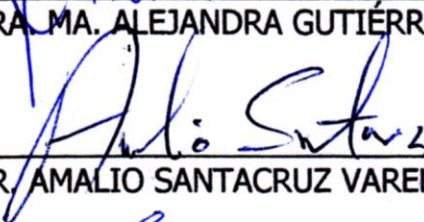
DR. VÍCTOR A. GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

ASESOR



DRA. MA. ALEJANDRA GUTIÉRREZ ESPINOSA

ASESOR



DR. AMALIO SANTACRUZ VARELA

ASESOR



DR. MARIO PÉREZ GRAJALES

ASESOR



DR. MIGUEL ÁNGEL GÓMEZ LIM

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril de 2015

MARCADORES MOLECULARES DE LA HERENCIA MATERNA DEL PICOR EN CHILE MANZANO

María Emma Morales Gutiérrez, DC.

Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

El picor del chile es una característica atractiva y apreciada porque contribuye al sabor del fruto. Sus principales componentes, los alcaloides capsaicina y dihidrocapsaicina, explican 90 % del picor total. En Chile Manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) se había reportado que el picor es alterado por la herencia materna, presumiblemente por genes extranucleares cuyo efecto en dihidrocapsaicina fue detectado mediante métodos genotécnicos, y explicó hasta 52 % de la variabilidad en progenies F₂. El objetivo de la presente investigación fue buscar asociaciones significativas entre los contenidos de capsaicina, dihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina, con marcadores microsatélites específicos para núcleo, cloroplasto y mitocondria, en una población segregante F₂ derivada de dos líneas hermanas endogámicas (F₅), L4 y L6. Con el marcador microsatélite NTCP4 de cloroplasto se encontró asociación significativa ($P \leq 0.05$) con el contenido de dihidrocapsaicina, que en estos materiales representó 31 % del picor total. La R² aquí registrada fue de 12 %, que implica un grado de correlación (r) de 34 %, proporción 18 % menor a la detectada por métodos genotécnicos. Este resultado constituye el primer reporte de un marcador genético de la herencia materna del picor en Chile. En los híbridos F₁, la cruce directa L4 × L6 tuvo picor más alto que la cruce recíproca L6 × L4, lo que confirma que existe efecto materno en la herencia del picor. Para realizar este estudio genético con 96 materiales genéticos, se desarrolló una microtécnica de aislamiento de cloroplastos y mitocondrias, la cual permite procesar numerosas muestras y obtener ADN en la cantidad y calidad requeridas, y con menor cantidad de reactivos que lo reportado en estudios previos.

Palabras clave: *Capsicum pubescens*, herencia de los capsaicinoides, heterosis, marcadores microsatélites, efectos maternos.

MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED WITH MATERNAL INHERITANCE OF PUNGENCY IN MANZANO PEPPER

María Emma Morales Gutiérrez, DC.

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

Pungency is an attractive and appreciated featured because it contributes to fruit flavor. Alkaloids, mainly capsaicin and dihydrocapsaicin account for 90 % of pungency. In Manzano pepper (*Capsicum pubescens* R. & P.) maternal inheritance modifies pungency, as previous research found by conventional genetics methods. Such research reported that maternal effects explained 52 % in dihydrocapsaicin content in progeny. The work searched for significant associations between capsaicin, dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin content and specific microsatellite genomic markers in nuclei, chloroplasts and mitochondria using a F₂-derived population from two F₅-inbred lines. Chloroplast microsatellite marker NTCP4 was associated significantly ($P \leq 0.05$) with dihydrocapsaicin content; dihydrocapsaicin accounts for 31 % of pungency in the tested genotypes. The R² obtained was 11.6 % which is equivalent to a correlation coefficient of 34 %; that it is an 18 % lower proportion than the detected by conventional genetics. The results shown here are the first report of a genomic region related to maternal inheritance for pepper pungency. In the F₁-direct crosses (L4 × L6), pungency was higher than in the F₁-reciprocal crosses (L6 × L4), confirming maternal effects in pungency inheritance. As part of this research, we developed an improved procedure for chloroplasts and mitochondria isolation that reduces reagents quantity, allows working with high number of samples, and does not compromise extracted DNA quality and quantity.

Key words: *Capsicum pubescens*, pungency inheritance, heterosis, microsatellites markers, maternal effects.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi Fortaleza y paz en los momentos de soledad y angustia.

Al Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por financiar mis estudios de postgrado permitiéndome optar al grado de Doctora en Ciencias.

A mi consejero de tesis, Dr. Víctor González Hernández por su magnífica dirección, acompañamiento y preocupación a lo largo de este estudio.

A la Dra. Ma. Alejandra Gutiérrez, Dres. Mario Pérez Grajales, Amalio Santacruz Varela y Miguel Á. Gómez Lim, quienes con su valiosa dedicación y tiempo guiaron el desarrollo de mi tesis.

Especial y cariñoso agradecimiento a Iván Ramírez al orientarme en muchos aspectos de mi trabajo y colaborarame incansablemente de forma desinteresada. Así también a los Dres. Nicacio Cruz, Ricardo Lobato y Serafín Cruz por los aportes brindados a la investigación.

A mis amigos: Adriana Isabel Pérez, Isis Jaimez Ruiz, Alejandro Martínez, Nely Arellano, Jimena Bustamante, Yolanda Moreno, Elisa Martínez, Naiby Muñoz y Augusto Peña, por hacer gratos y llevaderos infinidad de momentos que atesoraré en mi corazón.

A todas las personas que participaron con su granito de arena en estos cuatro años.

DEDICATORIA

Dedico con mucho orgullo mi trabajo de investigación a mis padres, quienes con su amor y apoyo incondicional me han permitido concentrarme en mis metas llegando a ser una mejor profesional. Cada logro que alcanzo es un reflejo de la educación recibida en casa al ser ellos grandes personas y profesionales, son un ejemplo excepcional que me motiva cada día a seguir sus pasos para convertirme además de la persona que ellos quieren que sea, en aquella que con sabiduría y creatividad haga frente a su futuro y pueda moldearlo con ética para alcanzar nuevos logros cada día.

Dedico también todo mi esfuerzo concentrado en estas páginas a mis hermanos.

Mi familia es mi gran inspiración

María Emma Morales Gutiérrez

CONTENIDO

	Página
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	
1.1 Objetivos.....	4
1.2 Hipótesis.....	5
1.3 Literatura citada.....	6
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERERATURA	
2.1 Generalidades de chile Manzano.....	13
2.2 Capsaicinoides.....	15
2.3 ADN y su extracción.....	22
2.4 Análisis genético.....	24
2.5 Literatura citada.....	34
CAPÍTULO III. MICROTÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE ADN DE CLOROPLASTOS Y MITOCONDRIAS Y EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL CON EL KIT DNA_{ZOL}	
3.1 Resumen.....	43
3.2 Abstract.....	44
3.3 Introducción.....	45
3.4 Materiales y métodos.....	48
3.5 Resultados y discusión.....	54
3.6 Conclusión.....	60
3.7 Literatura citada.....	61
CAPÍTULO IV. CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES	
4.1 Resumen.....	64
4.2 Abstract.....	65
4.3 Introducción.....	66
4.4 Materiales y métodos.....	67
4.5 Resultados y discusión.....	70

4.6 Conclusión.....	81
4.7 Literatura citada.....	82
 CAPÍTULO V. HERENCIA DE LOS CAPSAICINOIDES	
5.1 Resumen.....	85
5.2 Abstract.....	86
5.3 Introducción.....	87
5.4 Materiales y métodos.....	90
5.5 Resultados y discusión.....	95
5.6 Conclusión.....	106
5.7 Literatura citada.....	107
 CAPÍTULO VI. CONCLUSIÓN GENERAL.....	
	111

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO II

- Figura 2.1. Ruta metabólica para la síntesis de capsaicinoides (Kim *et al.*, 2014).....18
- Figura 2.2. Clasificación de los chiles más conocidos según su picor en Unidades Scoville (SHU) (Weiss, 2002).....21

CAPÍTULO III

- Figura 3.1. Aislamiento y purificación de cloroplastos y mitocondrias.
- A. Secuencia de aislamiento que muestra los procesos de obtención, desintegración, filtrado y precipitado, iniciando con núcleos y células remanentes, luego de cloroplastos y en último lugar mitocondrias, según corresponda.
- B. Secuencia de purificación iniciando con la limpieza del organelo, luego una pre-separación por densidad, rescate de la interfase y separación por densidad durante 1 h.....55
- Figura 3.2. Verificación de la integridad y pureza del ADN extraído de cloroplastos y mitocondrias mediante genes constitutivos de núcleo, cloroplasto y mitocondria.
- A. Integridad del ADN, B. Contaminación de ADN dado por la amplificación del gen ubiquitina (*ubi*) constitutivo en núcleo en: T– ADN Total, T + C – ADN total combinando con ADN de cloroplasto, T + M – ADN total combinado con ADN de mitocondria. C. Prueba de contaminación cruzada debida a la presencia de *ubi* en ADN de cloroplastos y mitocondrias. D. Amplificación de los genes rubisco subunidad grande (*rbcL*) y citocromo oxidasa (*COX1*) constitutivos en cloroplasto y mitocondria, en ADN de cloroplasto (C) y mitocondria (M). P₁: línea endogámica 4,

P ₂ : línea endogámica 6, H ₁ : Híbrido 4 × 6; H ₂ : Híbrido 6 × 4, M: marcador de peso molecular.....	57
---	----

CAPÍTULO IV

Figura 4.1. Contenido de capsaicinoides (CAPS) en las líneas L4 y L6 y sus F ₁ . A, Distribución porcentual en progenitores e híbridos con respecto al contenido total de CAPS; B, Contenido de CAPS en las líneas progenitoras; C, Contenido de CAPS en los híbridos F ₁ de cruce directa (CD) y de cruce recíproca (CR).....	72
Figura 4.2. Contenido y análisis de nordihidrocapsaicina (NOR) en la F ₂ . A. Segregación de 90 individuos de la F ₂ , incluye las líneas progenitoras L4 y L6; B. Escala de frecuencia que agrupa los individuos de la F ₂ por sus contenidos de NOR; C. Histograma de distribución normal del contenido de NOR.....	75
Figura 4.3. Contenido y análisis de capsaicina (CAP) en la F ₂ . A. Segregación de 90 individuos de la F ₂ , incluye las líneas progenitoras L4 y L6; B. Escala de frecuencia que agrupa los individuos de la F ₂ por sus contenidos de CAP; C. Histograma de distribución normal del contenido de CAP.....	76
Figura 4.4. Contenido y análisis de dihidrocapsaicina (DICAP) en la F ₂ . A. Segregación de 90 individuos de la F ₂ , incluye las líneas progenitoras L4 y L6; B. Escala de frecuencia que agrupa los individuos de la F ₂ por sus contenidos de DICAP; C. Histograma de distribución normal del contenido de DICAP.....	77

Figura 4.5.	Contenido y análisis de capsaicinoides totales (CAPS) en la F ₂ . A. Segregación de 90 individuos de la F ₂ , incluye las líneas progenitoras L4 y L6; B. Escala de frecuencia que agrupa los individuos de la F ₂ por sus contenidos de CAPS; C. Histograma de distribución normal del contenido de CAPS.....	78
-------------	---	----

CAPÍTULO V

Figura 5.1.	Patrón de bandeo de microsatélites en el núcleo y elección de loci polimórficos.	95
Figura 5.2.	Secuencias microsatélites polimórficas del núcleo usando como molde ADN de líneas endogámicas de chile Manzano, L4 en la parte superior y L6 en la inferior. Amplificación de los iniciadores: A, HPMS 1-173; B, EPMS-472.....	96
Figura 5.3.	Ubicación de los microsatélites nucleares Hpms1-173 y EPMS-472 en el cromosoma 3. Mapas generados por: A, Yi <i>et al.</i> (2006), B. Ben-Chaim <i>et al.</i> (2006); C. Barchi <i>et al.</i> (2009).....	97
Figura 5.4.	Amplificación de la secuencia microsatélite polimórfica NTCP4 constitutivo de cloroplasto usando como molde ADN de este organelo de las líneas endogámicas de chile Manzano, L4 en la parte superior y L6 en la inferior.....	100
Figura 5.5.	Ubicación del marcador microsatélite NTCP-4, polimórfico en la región intergénica <i>trnK/rps16</i> del ADN de cloroplasto en <i>Capsicum annuum</i> L. Mapa reportado por Jo <i>et al.</i> (2011).....	100
Figura 5.6.	Mapa de ligamiento del cromosoma 3, donde se ubican los marcadores <i>Hpms1-173</i> y <i>EPMS_472</i> generado a través del programa ICIMapping.....	106

LISTA DE CUADROS

Página

CAPÍTULO II

Cuadro 2.1	Enzimas involucradas en la ruta de síntesis de Capsaicinoides (Mazourek <i>et al.</i> , 2009; Blum <i>et al.</i> , 2003).....	20
------------	---	----

CAPÍTULO III

Cuadro 3.1.	Iniciadores de genes constitutivos de núcleo, cloroplasto y mitocondria.....	53
Cuadro 3.2.	Concentración y calidad del ADN extraído de cloroplastos, mitocondrias y total a partir de 500 mg del pericarpio de frutos de chile manzano en inicio de maduración.....	56
Cuadro 3.3.	Reducción en el uso de reactivos y costos totales al incrementar el número de muestras.....	58

CAPÍTULO IV

Cuadro 4.1.	Heterosis (%) del picor con respecto al progenitor femenino, Línea 4 o Línea 6, en los híbridos de cruce directa (CD) y de cruce recíproca (CR) de chile Manzano.....	73
-------------	---	----

CAPÍTULO V

Cuadro 5.1.	Iniciadores microsatélites seleccionados con marcaje fluorescente.....	94
Cuadro 5.2.	Descripción de las secuencias microsatélites del núcleo amplificadas por electroforesis capilar.....	96
Cuadro 5.3.	Descripción de las secuencias microsatélites de cloroplastos y mitocondrias amplificadas por electroforesis capilar.....	99

Cuadro 5.4. Grado de asociación estadística entre los contenidos de los principales capsaicinoides y dos marcadores QTL en chile manzano.....	102
---	-----

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

El chile (*Capsicum* spp.) es una de las hortalizas más importantes a nivel mundial (FAO, 2014). El sabor y en especial el picor la hacen apreciada. Se consume en fresco y se procesa para la agroindustria, modalidades que constituyen sus principales destinos comerciales. Ofrece compuestos metabólicos a los que se les atribuyen propiedades nutraceuticas (Conn *et al.*, 1992; Howard *et al.*, 2000; Giuffrida *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 1995; Namiki, 1990; Navarro *et al.*, 2006; Palozza y Krinsky, 1992, Topuz *et al.*, 2011; Wahyuni *et al.*, 2011), y aplicaciones en medicina, principalmente para el tratamiento del dolor, sobrepeso, cáncer y enfermedades cardiacas (Cordell y Araujo, 1993; Deal *et al.*, 1991; Govindarajan y Sathyanarayana, 1991; Hautkappe *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 1997; Liu y Nair, 2010; Luo *et al.*, 2010; Marabini *et al.*, 1991; Mori *et al.*, 2006; Peppin y Pappagallo, 2014; Negulesco *et al.*, 1987; Robbins, 2000; Sánchez *et al.*, 2006; Spiller *et al.*, 2008).

México es el país donde ocurrió la domesticación del chile (Laborde y Pozo, 1984; Eshbaugh, 1993); por ende, en él se encuentra una amplia diversidad de especies de *Capsicum* que varían en tamaños, formas y colores (Paran y Van der Knaap, 2007). En cada una de ellas se aprecia un picor característico, causado por la mezcla de compuestos alcaloides conocidos como capsaicinoides que difieren en la distribución final de su contenido (Todd *et al.*, 1977; Krajewska y Powers, 1988; Wahyuni *et al.*, 2013). Se conocen 22 tipos de capsaicinoides (Reyes-Escogido *et al.*, 2011), pero son sólo tres, capsaicina, dihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina, los que comúnmente se extraen en mayor cantidad (Bosland y Votava, 2000; Choi *et al.*, 2006; Garcés-Claver *et al.*, 2006; Kozukue *et al.*, 2005; Pérez-Cruz *et al.*, 2007; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2010).

En nuestros días la ruta de biosíntesis continúa siendo materia de estudio (Aluru *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009; Mazourek *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2005; Thiele *et al.*, 2008). Actualmente se conoce que los capsaicinoides son producto de la condensación de la cadena ramificada de ácidos grasos (cuyos precursores son los aminoácidos valina, leucina e Isoleucina) con vanillilamina (procedente del aminoácido fenilalanina). Molecularmente, su presencia está correlacionada con el locus *Pun1* en el cromosoma 2 que codifica para aminotransferasa AT3, el cual es transcrito en la placenta; su ausencia se debe a la delección de 2.5 kb del primer exón de *Pun1* en *C. annuum* (Stewart *et al.*, 2005). Mutaciones similares se han encontrado en *C. chinense* (Stewart *et al.*, 2007; Stellari *et al.*, 2010).

Los intermediarios iniciales en la ruta biosintética son aminoácidos producidos en el cloroplasto (Mazourek *et al.*, 2009), y es en la mitocondria donde ocurre su catabolismo a compuestos derivados de CoA, como Isovaleril-CoA a partir de leucina, α -metilbutiril-CoA de isoleucina, e isobutiril-CoA de valina (Shimomura *et al.*, 2004). Estos compuestos regresan al cloroplasto para ser transformados en ácidos grasos (Aluru *et al.*, 2003). Las etapas finales de síntesis se llevan a cabo en el citoplasma (Mazourek *et al.*, 2009).

Cloroplastos y mitocondrias son organelos aportados por el progenitor femenino, razón por la cual su modo de herencia es conocida como materna (Birky, 1995; Hansen *et al.*, 2007; Kuroiwa *et al.*, 1993; Sato y Sato, 2013). Por tanto, en ausencia de recombinación su ADN es altamente conservado, lo que se aprovecha para establecer relaciones de filogenia y desarrollar estudios de evolución (Bendich, 2013; Galloway, 2009; Thiede, 1998; Vivas *et al.*, 2013). Existen numerosos protocolos publicados para la extracción de su ADN (Rahman y Huber, 1996; Kahlau *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2014); sin embargo, emplean cantidades grandes de tejido y de reactivos que en ocasiones resultan no ser eficientes en costos para estudios a gran escala.

Análisis genéticos a partir de ADN íntegro y puro derivan en la obtención de datos confiables y repetibles; además permiten, mediante marcadores moleculares, descubrir la variación alélica que sirve para contrastar individuos, poblaciones y especies, así como para analizar la diversidad, su distribución y dinámica, y también para establecer asociaciones (Dilworth y Frey, 2000; Mace *et al.*, 2003; Masojć, 2002; Patwardhan *et al.*, 2014; Varshney *et al.*, 2009; Xin *et al.*, 2003).

El objetivo de la asociación genética es identificar regiones de ADN o genes que expliquen la variabilidad en características complejas o cuantitativas, las cuales deben su nombre al efecto que tiene en ellas la interacción de genes y el ambiente. La asociación genética comprende aspectos como la característica cuantitativa a ser evaluada, la población o el grupo de individuos en la cual va a ser medida, los marcadores que van a ser genotipificados (descripción genética de la composición alélica y sus variantes en un organismo), y el método analítico para comprobar la asociación entre el genotipo y el fenotipo. El análisis puede conducir a establecer QTLs (loci de características cuantitativas) a través de la asociación estadísticamente significativa con una secuencia polimórfica (variante genética en un locus), y para asignar a la característica el porcentaje de variabilidad que es atribuida al locus (Mauricio, 2001; Tanksley, 1993; Würschum, 2012).

Por su naturaleza poligénica y expresión regulada por el ambiente y su interacción con los genes, el picor es una característica cuantitativa (Zewdie y Bosland, 2000). Su análisis en cruzas inter e intraespecíficas de individuos con y sin contenido, o contenido alto y bajo de picor, ha permitido la identificación de QTLs asociados con capsaicinoides a partir del uso de marcadores moleculares, entre ellos microsatélites, y poblaciones segregantes F₂, de familias F₃ y líneas endogámicas recombinantes (RILs) para mapeo (Blum *et al.*, 2003; Ben-Chaim *et al.*, 2006; Yarnes *et al.*, 2013). Sin embargo, con el conocimiento existente aún no se puede controlar la amplia variación en el grado de picor que hay entre especies y variedades del género *Capsicum*, picor que también es influenciado por el nivel de desarrollo del fruto (Pérez-Cruz *et al.*, 2007).

Investigaciones genotécnicas en Chile Manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) con poblaciones criollas de México y con las progenies F₁ y F₂ derivadas de híbridos interpoblacionales, han demostrado que 93 % del picor se debe a capsaicina y dihidrocapsaicina, alcaloides para los cuales imperan efectos aditivos y de heterosis o vigor híbrido (Pérez-Cruz *et al.*, 2007), y que hasta 45 % de su variación depende de la herencia materna debida a genes extranucleares (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2010). Estos reportes constituyen el primer indicio sobre herencia materna para los capsaicinoides, y es consecuencia de la síntesis inicial de precursores e intermediarios que ocurre en cloroplasto y mitocondria. Hasta el momento los genes del picor conocidos son nucleares y codifican enzimas que actúan directamente sobre su ruta metabólica (Mazourek *et al.*, 2009).

1.1. Objetivo general

Identificar QTLs de herencia materna y nuclear asociados con el contenido de capsaicinoides en plantas segregantes F₂ derivadas de dos líneas endogámicas (F₅) de Chile Manzano (progenitoras) y sus F₁ (cruzas directas y recíprocas).

Objetivos particulares

1. Desarrollar una microtécnica para el aislamiento de cloroplastos y mitocondrias y extracción de su ADN a partir del pericarpio de frutos de Chile Manzano.
2. Determinar los contenidos de capsaicina, dihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina en frutos completos de Chile Manzano, y analizar su distribución en la población.
3. Buscar microsatélites polimórficos entre las líneas progenitoras utilizadas de Chile Manzano, en ADN de núcleo, cloroplastos y mitocondrias.
4. Buscar asociaciones significativas entre alelos específicos de marcadores microsatélites polimórficos y contenidos de capsaicinoides para cloroplasto, mitocondrias y núcleo, en individuos segregantes F₂.

1.2. Hipótesis

En la presente investigación se postula que existen QTLs de herencia materna, lo cual es posible comprobar mediante la amplificación y selección de marcadores polimórficos procedentes de ADN de cloroplasto y mitocondria, marcadores que permitirían explicar la variación existente en el contenido de capsaicinoides en frutos desarrollados en iguales condiciones de crecimiento.

Hipótesis particulares

1. El aislamiento de cloroplastos y mitocondrias a partir de muestras pequeñas del pericarpio de Chile Manzano resulta en la extracción de ADN de suficiente calidad y cantidad, que permite su amplificación de manera confiable y repetible, lo que se puede verificar con el uso de marcadores microsatélites específicos.
2. La población segregante F_2 sigue una distribución normal en los contenidos de los tres principales capsaicinoides y en el picor total en los frutos de 76 días.
3. Existen alelos polimórficos en los ADN de cloroplasto, mitocondria o ambos, que permiten diferenciar genéticamente las líneas progenitoras y, sobre todo, explicar la herencia materna previamente detectada mediante métodos genotécnicos (diseños dialélicos).
4. Se pueden encontrar asociaciones significativas entre marcadores microsatélites polimórficos y contenidos de capsaicinoides en los distintos ADN de individuos de la F_2 que expliquen la variación en el picor del fruto entre los individuos de las progenies F_2 .

1.3. Literatura Citada

- Aluru, M. R., M. Mazourek, L. G. Landry, J. Curry, M. Jahn, and M. A. O'Connell. 2003. Differential expression of fatty acid synthase genes, *Acl*, *Fat*, and *Kas*, in Capsicum fruit. *Journal Experimental of Botany* 54:1655-1664.
- Ben-Chaim, A., Y. Borovsky, M. Falise, M. Mazourek, B. C. Kang, I. Paran, and M. Jahn. 2006. QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics* 113:1481-1490.
- Bendich, A. J. 2013. DNA abandonment and the mechanisms of uniparental inheritance of mitochondria and chloroplasts. *Chromosome Research* 21:287-296.
- Birky, C. W. Jr. 1995. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* 92:11331-11338.
- Blum E., M. Mazourek, M. O'Connell, J. Curry, T. Thorup, K. Liu, M. Jahn and I. Paran. 2003. Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics* 108:79-86.
- Bosland, P. W. and E. J. Votava. 2000. Peppers: vegetable and spice capsicums. CABI Publishing, Nueva York, USA.
- Choi, S. H., B. S. Suh, E. Kozukue, N. Kozukue, C. E. Levin, and M. Friedman. 2006. Analysis of the Contents of Pungent Compounds in Fresh Korean Red Peppers and in Pepper-Containing Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:9024.
- Conn, P. F., C. Lambert, E. J. Land, W. Schalch and T. G. Truscott. 1992. Carotene oxygen radical interactions. *Free Radical Research Communications* 16:401-408.
- Cordell, G. A., and O. E. Araujo. 1993. Capsaicin: identification, nomenclature, and pharmacotherapy. *Annals of Pharmacotherapy* 27:330-336.
- Cruz-Pérez, A. B., V. A. González-Hernández, R. M. Soto-Hernández, M. A. Gutiérrez-Espinosa, A. A. Gardea-Béjar, y M. Pérez-Grajales. 2007. Capsaicinoides, vitamina C y heterosis durante el desarrollo del fruto de chile manzano. *Agrociencia* 41:627-635.
- Deal, C. L., T. J. Schnitzer, E. Lipstein, J. R. Seibold, R. M. Stevens, M. D. Levy, D. Albert, and F. Renold. 1991. Treatment of arthritis with topical capsaicin: a double-blind trial. *Clinical Therapeutics* 13:383-395.

- Dilworth, E., and J. E. Frey. 2000. A rapid method for high throughput DNA extraction from material for PCR amplification. *Plant Molecular Biology Reporter* 18:61-64.
- Eshbaugh, W. H. 1993. History and exploitation of a serendipitous new crop discovery. In: Janick., J. and J. E. Simon, eds. *New crops*. New York: Wiley, 132-139.
- FAO, 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat3.fao.org/>
- Galloway, L. F. 2005. Maternal effects provide phenotypic adaptation to local environmental conditions. *New Phytologist* 166: 93-100.
- Garcés-Claver, A., M. S. Arnedo-Andrés, J. Abadía, R. Gil-Ortega, and A. Alvarez-Fernandez. 2006. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in capsicum fruits by liquid chromatography-electrospray/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:9303-9311.
- Giuffrida, D., P. Dugo, G. Torre, C. Bignardi, A. Cavazza, C. Corradini, and G. Dugo. 2013. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chemistry* 140:794-802.
- Howard, L. R., S. T. Talcott, C. H. Brenes, and B. Villalon. 2000. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:1713-1720.
- Govindarajan, V. S., and M. N. Sathyanarayana. 1991. Capsicum--production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism; structure, pungency, pain, and desensitization sequences. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 29:435-474.
- Hansen, A. K., L. K. Escobar, L. E. Gilbert, and R. K. Jansen. 2007. Paternal, maternal, and biparental inheritance of the chloroplast genome in passiflora (*Passifloraceae*): implications for phylogenetic studies. *American Journal of Botany* 94:42-46.
- Hautkappe, M., M. F. Roizen, A. Toledano, S. Roth, J. A. Jeffries, and A. M. Ostermeier. 1998. Review of the effectiveness of capsaicin for painful cutaneous disorders and neural dysfunction. *The Clinical Journal of Pain* 14:97-106.
- Ito, K., T. Nakazato, K. Yamato, Y. Miyakawa, T. Yamada, N. Hozumi, K. Segawa, Y. Ikeda, and M. Kizaki. 2004. Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication

- of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Research* 64:1071-1078.
- Kahlau, S., S. Aspinall, J. C. Gray, and R. Bock. 2006. Sequence of the tomato chloroplast DNA and evolutionary comparison of solanaceous plastid genomes. *Journal of Molecular Evolution* 63:194:207.
- Kim, J. D., J. M. Kim, J. O. Pyo, S. Y. Kim, B. S. Kim, R. Yu, and I. S. Han. 1997. Capsaicin can alter the expression of tumor forming-related genes which might be followed by induction of apoptosis of a Korean stomach cancer cell line, SNU-1. *Cancer Letters* 120:235-241.
- Kozukue, N., J. S. Han, E. Kozukue, S. J. Lee, J. A. Kim, K. R. Lee, C. E. Levin, and M. Friedman. 2005. Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:9172-9181.
- Krajewska, A. M. and J. J. Powers. 1988. Pentafluorobenzoylation of capsaicinoids for gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography A.*, 457:279.
- Kuroiwa, T., T. Kawazu, H. Uchida, T. Ohta, and H. Kuroiwa. 1993. Direct evidence of plastid DNA and mitochondrial DNA in sperm cells in relation to biparental inheritance of organelle DNA in *Pelargonium zonale* by fluorescence/electron microscopy. *European Journal of Cell Biology* 62: 307-313.
- Laborde C., J. A., y O. Pozo C. 1984. Presente y Pasado del Chile en México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Publicación Especial No. 85, México. 80 p.
- Lee, Y., L. R. Howard, and B. Villalon. 1995. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *Journal of Food Science* 60:473-476.
- Liu, Y., and M. G. Nair. 2010. Capsaicinoids in the hottest pepper Bhut Jolokia and its antioxidant and antiinflammatory activities. *Natural Product Communications* 5:91-94.
- Luo, X. - J., J. Peng, and Y. - J. Li. 2010. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European Journal of Pharmacology* 650:1-7.
- Mace, E. S., H. K. Buhariwalla, and J. H. Crouch. 2003. A high-throughput DNA extraction protocol for tropical molecular breeding programs. *Plant Molecular Biology Reporter* 21:459-460.

- Marabini, S., P. G. Ciabatti, G. Polli, B. M. Fusco, and P. Geppetti. 1991. Beneficial effects of intranasal applications of capsaicin in patients with vasomotor rhinitis. *European Archives Otorhinolaryngology* 248:191-194.
- Masojć, P. 2002. The application of molecular marker in the process of selection. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7:499-509.
- Mauricio, R. 2001. Mapping quantitative trait loci in plants: uses and caveats for evolutionary biology. *Nature Reviews Genetics* 2:370-381.
- Mazourek, M., A. Pujar, Y. Borovsky, Ilan Paran, L. Mueller and M. M. Jahn. 2009. A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant Physiology* 150:1806-1821.
- Mori, A., S. Lehmann, J. O'Kelly, T. Kumagai, J. C. Desmond, M. Pervan, W. H. McBride, M. Kizaki, and H. P. Koeffler. 2006. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Research* 66:3222-3229.
- Namiki, M. 1990. Antioxidants/antimutagens in food. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 29:273-300.
- Navarro, J. M., P. Flores, C. Garrido, and V. Martínez. 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry* 96:66-73.
- Negulesco, J. .A., S. A. Noel, H. A. I. Newman, E. C. Naber, H. B. Bhat, and D. T. Witiak. 1987. Effects of pure capsaicinoids (capsaicin and dihydrocapsaicin) on plasma lipid and lipoprotein concentrations of turkey poult. *Atherosclerosis*, 64:85-90.
- Palozza, P. and N. Krinsky. 1992. Antioxidants effects of carotenoids in vivo and in vitro – an overview. *Methods in Enzymology* 213:403-420.
- Paran, I. and E. Van der Knaap. 2007. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany* 58:3841-3852.
- Patwardhan, A., S. Ray, and A. Roy. 2014. Molecular markers in phylogenetic studies – A review. *Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology* 2:131.
- Peppin, J. F., and M. Pappagallo. 2014. Capsaicinoids in the treatment of neuropathic pain: a review. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 7:22-32.
- Rahman, A. S. and D. J. Huber. 1996. Isolation and physiological properties of intact mitochondria from bell pepper (*Capsicum annuum*) fruit. *Journal of Plant Physiology* 149:677-682.

- Reyes-Escogido, M. de L., E. G. Gonzalez-Mondragon and E. Vazquez-Tzompantzi. 2011. Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin. *Molecules* 16:1253-1270.
- Robbins, W. 2000. Clinical applications of capsaicinoids. *The Clinical Journal of Pain* 16:86-89.
- Sanchez, A. M., M. G. Sanchez, S. Malagarie-Cazenave, N. Olea, and I. Diaz-Laviada. 2006. Induction of apoptosis in prostate tumor PC-3 cells and inhibition of xenograft prostate tumor growth by the vanilloid capsaicin. *Apoptosis* 11:89-99.
- Sánchez-Sánchez, H., V. A. González-Hernández, A. B. Cruz-Pérez, M. Perez-Grajales, M. A. Gutiérrez-Espinosa, A. A. Gardea-Béjar, y M. A. Gómez-Lim. 2010. Herencia de capsicinoides en chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.). *Agrociencia* 44:655-665.
- Sato, M., and K. Sato. 2013. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833:1979-1984.
- Shi, C., N. Hu, H. Huang, J. Gao, Y. - J. Zhao, and L. - Z. Gao. 2012. An improved chloroplast DNA extraction procedure for whole plastid genome sequencing. *PLoS ONE* 7:e31468.
- Shimomura, Y., T. Murakami, N. Nakai, M. Nagasaki, R. A. Harris. 2004. Exercise promotes BCAA catabolism: effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise. *The Journal of Nutrition* 134:1583-1587.
- Spiller, F., M. K. Alves, S. M. Vieira, T. A. Carvalho, C. E. Leite, A. Lunardelli, J. A. Poloni, F. Q. Cunha, and J. R. de Oliveira. 2008. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan- and antigen-induced inflammation. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60:473-478.
- Stellari, G. M., M. Mazourek, and M. M. Jahn. 2010. Contrasting modes for loss of pungency between cultivated and wild species of *Capsicum*. *Heredity* 104:460-471.
- Stewart, C. Jr., B. C. Kang, K. Liu, M. Mazourek, S. L. Moore, E. Y. Yoo, B. D. Kim, I. Paran, and M. M. Jahn. 2005. The *pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *The Plant Journal* 42:675-688.
- Stewart, C. Jr., M. Mazourek, G. M. Stellari, M. O'Connell, M. Jahn. 2007. Genetic control of pungency in *C. chinense* via the *pun1* locus. *Journal of Experimental Botany* 58:979-991.
- Tanksley, S. D. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* 27:205-233.

- Thiele, R., E. Mueller-Seitz, and M. Petz. 2008. Chili pepper fruits: Presumed precursors of fatty acids characteristic for capsaicinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:4219-4224.
- Thiede, D. A. 1998. Maternal inheritance and its effect on adaptive evolution: a quantitative genetic analysis of maternal effects in a natural plant population. *Evolution* 52:998-1015.
- Todd, P.H. Jr, M. G. Bensinger, and T. Biftu. 1977. Determination of pungency due to capsicum by gas-liquid chromatography. *Journal of Food Science* 42:660.
- Topuz, A., C. Dincer, K. S. Ozdemir, H. Feng, and M. Kushad. 2011. Influence of different drying methods on carotenoids and capsaicinoids of paprika (Cv. Japaleño). *Food Chemistry* 129:860-865.
- Varshney, R. K., S. N. Nayak, G. D. May, and S. A. Jackson. 2009. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology* 27:522-530.
- Vieira, LdN, H. Faoro, H. P. de F. Fraga, M. Rogalski, E. M. de Souza, F. de O. Pedrosa, R. O. Nodari, and M. P. Guerra. 2014. An improved protocol for intact chloroplasts and cpDNA isolation in Conifers. *PLoS ONE* 9:e84792.
- Vivas, M., R. Zas, L. Sampedro, and A. Solla. 2013. Environmental maternal effects mediate the resistance of Maritime Pine to biotic stress. *PLoS ONE* 8:e70148.
- Wahyuni, Y., A. R. Ballester, E. Sudarmonowati, R. J. Bino, and A. G. Bovy. 2011. Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry* 72:1358-1370.
- Wahyuni, Y., A. R. Ballester, Y. Tikunov, R. C. H. de Vos, K. T. B. Pelgrom, A. Maharijaya, E. Sudarmonowati, R. J. Bino, and A. G. Bovy. 2013. Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. *Metabolomics* 9:130-144.
- Würschum T., L. W., H. P. Maurer, S. Abel, and J. C. Reif. 2012. Dissecting the genetic architecture of agronomic traits in multiple segregating populations in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 124:153-161.
- Xin, Z., J. P. Velten, M. J. Oliver, and J. J. Burke. 2003. High-throughput DNA extraction method suitable for PCR. *Biotechniques* 34:820-824.
- Yarnes, S. C., H. Ashrafi, S. Reyes-Chin-Wo, T. A. Hill, K. M. Stoffel, and A. V. Deynze. 2013. Identification of QTLs for capsaicinoids, fruit quality, and plant

architecture-related traits in an interspecific *Capsicum* RIL population. *Genome* 56:61-74.

Zewdie, Y. and P. W. Bosland. 2000. Evaluation of genotype, environment and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. *Euphytica* 111: 185-190.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades del chile Manzano

El chile Manzano (*Capsicum pubescens* R. y .P) es una especie perenne nativa de Suramérica, procedente de los Andes de Perú y de Bolivia. En México, país de domesticación, se cultiva en huertos familiares, en los estados de México, Michoacán, Morelos, Puebla y Veracruz, para consumo local pero también se produce en invernaderos con fines de exportación (Pérez *et al.*, 1997).

El periodo de producción se estima entre 5 y 7 años, aunque existen huertas de hasta 10 años de edad (Muciño *et al.*, 2004; Pérez y Castro, 2008), y a diferencia de los pocos reportes de los que ha sido objeto en Perú y Bolivia, en México existen investigaciones con respecto a sus requerimientos ambientales, fisiológicos, nutricionales e hídricos, producción de plántula, sistemas de producción intensiva, control y manejo de plagas y enfermedades, comercialización, indicadores financieros (Pérez y Castro, 2008), y además se dispone de variedades mejoradas con registro a nivel nacional.

2.1.1 Descripción botánica

El tallo es leñoso, con hábito de crecimiento compacto y erecto y sus hojas presentan pubescencia abundante. Su ramificación es pseudodicotómica. La hoja es simple y peciolada con forma cordada, ápice acuminado, bordes lisos, vellosa y de nervadura perinerve. Su filotaxia es alterna dística. La flor es hermafrodita de color violeta y raramente blanca. Los estambres tienen la misma longitud y el ovario es súpero. El fruto es verde en estado inmaduro y al madurar cambia a amarillo, naranja o rojo. Según el número de lóculos varía de forma de pera cuando tiene entre 1 y 2 lóculos, a forma de manzana con 3 y 4 lóculos. El sistema

radical consta de una raíz principal pivotante y numerosas raíces secundarias que pueden alcanzar hasta 1.2 m de profundidad y 0.8 m de exploración horizontal (Pérez y Castro, 2008).

2.1.2 Manejo

Se cultiva de manera convencional a campo abierto, asociado con especies forestales y frutícolas como fuente de sombra, entre las cuales están el pino, el aguacate, el durazno y la guayaba (Muciño *et al.*, 2004), en superficies de hasta 5 ha. Sus rendimientos son bajos ($\sim 16 \text{ t ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) y la calidad del fruto es regular, razón por la que se destina a mercados locales y regionales (Pérez y Castro, 2008). En contraste, el manejo intensivo bajo invernadero produce frutos de mejor calidad, con rendimientos de 70 y hasta $75 \text{ t ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Pérez y Castro, 2008), sistema que se caracteriza por el uso de malla sombra, sustrato inerte, solución nutritiva, riego por goteo, sistema de tutoreo, podas, y control de plagas y enfermedades, que tienen el propósito de optimizar las condiciones de cultivo (Pérez y Castro, 2008).

2.1.3 Caracterización de poblaciones nativas

La caracterización de variedades criollas para uso en mejoramiento genético condujo a la obtención de híbridos de alto rendimiento y calidad de fruto. Así, en seis variedades criollas (cinco de México y una de Perú de donde se introdujo hace algunos siglos) y 15 híbridos interpoblacionales o intervarietales, se encontró que cada una de las variedades criollas pueden aportar características fisiológicas y morfológicas ventajosas, como: 'Puebla' con los frutos más grandes y de pericarpio más grueso, 'Zongolica' y 'Huatusco II' con los entrenudos más cortos para reducir el porte de la planta, 'Perú' y 'Puebla' con altos índices de cosecha para asignar al fruto una mayor proporción de la biomasa producida, y 'Chiapas' con la más alta tasa en acumulación de biomasa (Pérez y Castro, 2008). Algunos de estos híbridos presentan un alto grado de heterosis o vigor híbrido en rendimiento (51 %) y en

tamaño de fruto (33 %); por ejemplo, el híbrido intervarietal 'Zongolica x Puebla' rinde 48 t ha⁻¹ de fruto en condiciones de invernadero con manejo intensivo (Pérez-Grajales *et al.*, 2009), rendimiento que duplica al de la mejor variedad progenitora producida en las mismas condiciones; en contraste, en campo los productores regionales cosechan de 7 a 9 t ha⁻¹ de fruto.

En cuanto al picor, Sánchez-Sánchez *et al.* (2010) reportaron variabilidad entre las variedades y sus cruzas resultantes, con valores entre 4,032 y 36,712 SHU. El picor de los progenitores, ordenados de mayor a menor picor fueron: Zongolica, Huatusco, Perú, Tacámbaro y Puebla, y entre los híbridos, Zongolica x Huatusco fue el más alto ($p < 0.05$). También se detectó heterosis positiva (con mayor picor que el progenitor más picoso) o negativa (menor picor que los progenitores),

2.2. Capsaicinoides

Los capsaicinoides son alcaloides que en humanos producen la sensación de picor. Son sintetizados por plantas del género *Capsicum*, en hojas, tallos, raíces, pedúnculo (Ishikawa, 2003), y sobre todo en vesículas de células epidérmicas de la placenta de los frutos (Suzuki *et al.*, 1980).

Las funciones principales de estos compuestos en las plantas están dirigidas a mecanismos de defensa y de dispersión de su semilla (Foley y Moore, 2005; Tewksbury *et al.*, 2008). Con relación al tema de defensa, se le han atribuido propiedades antifúngicas y antibacteriales que resultan de su aplicación exógena a otras plantas y que se han traducido en la prevención de enfermedades y reducción de la depredación por insectos (Cowles *et al.*, 1989; Hongo y Karel, 1986; Weissenberg *et al.*, 1986) o herbivorismo (Cichewicz y Thorpe, 1996; Dima *et al.*, 2013). Respecto a la dispersión, investigaciones moleculares recientes sobre susceptibilidad en el receptor de vainilloides (TRPV-1, transient receptor potential vanilloid-1 según sus siglas en inglés) entre aves y mamíferos, han revelado que

en aves no producen efecto mientras que mamíferos causan una sensación de picor (Jordt y Julius, 2002). Lo anterior apoya la idea sobre estrategias de dispersión promovida por aves y vía aérea en el género *Capsicum* (Foley y Moore, 2005).

El receptor temporal de vainilloides, TRPV-1, es parte de una familia de canales que responde a temperaturas altas y pH bajo, que también se ha sugerido para morfina y cannabinoides (Knotkova *et al.*, 2008). Este receptor fue el primero en ser clonado, además de ser el más estudiado entre los más de 28 conocidos. Se activa por calor excesivo, quemaduras y toxinas de arañas. La aplicación inicial de capsaicinoides causa dolor, pero su uso frecuente tiene efecto analgésico debido a la pérdida de función del receptor e insensibilización de las fibras C. Además de analgésico, presenta actividad antioxidante (Perucka y Materska, 2003; Rosa *et al.*, 2002) y anticancerígena (Lin *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2010); también han sido usados para contrarrestar dolores crónicos neuropáticos (Derry *et al.*, 2013) y en la elaboración de gas lacrimógeno (Kumar *et al.*, 2012).

2.2.1. Biosíntesis

La biosíntesis de los capsaicinoides ha sido objeto de estudio por alrededor de siglo y medio (Blum *et al.*, 2003; Wang y Bosland, 2006; Aza-González *et al.*, 2011). Inicia con el descubrimiento de los precursores: porción vainillilamina a partir de fenilalanina, y la cadena ramificada de ácidos grasos de valina (Bennett y Kirby, 1968; Leete y Loudon, 1968), y los intermediarios de la síntesis de los fenilpropanoides (fenilalanina): ácidos cinámico, p-cumárico, cafeico, felúrico, vainillina y vainillilamina (Bennet y Kirby, 1968). Posteriormente se reportó la participación de las enzimas fenilamonioliasa (PAL), cinamato 4-hidroxilasa (C4H), cumarato 3 hidroxilasa O-metiltransferasa (COMT) (Fujiwake *et al.*, 1982; Sukrasno y Yeoman, 1993). Se ha propuesto además que la porción acil se deriva tanto de valina como de leucina (Suzuki *et al.*, 1980).

Posteriormente ocurre el hallazgo de enzimas como 4-cumaroil-CoA ligasa (4CL), hidroxicinamoil transferasa (HCT), cafeoyl-CoA O-metiltransferasa (CCoAOMT, en vez de COMT), e hidroxicinamoil-CoA hidratasa/liasa (HCHL) (Stewart *et al.*, 2005; Mazourek *et al.*, 2009). En la actualidad se sabe que 19 enzimas aproximadamente participan en la síntesis de capsaicinoides, y en 16 de ellas se cuenta con su secuencia completa de ADN, su ubicación en los cromosomas y localización celular (Cuadro 2.1). Las tres enzimas restantes conocidas en la biosíntesis de capsaicinoides son desaturasa, isovalerato deshidrogenasa y capsaicina sintasa (CS). No obstante, la búsqueda de otras enzimas candidatas continúa (Liu *et al.*, 2013), entre ellas: ácido dihidroxi-dehidratasa (DHAD), Thr deaminasa (TD) y pterinato aminotransferasa (Pat).

Según Prasad *et al.* (2006), el ácido-8-metil-nonanoico es el intermediario de mayor importancia en la síntesis y acumulación de capsaicina, ya que ambos compuestos están correlacionados positivamente. Estos mismos autores señalan que la ruta biosintética a partir de aminoácidos como valina tiene mayor peso en la producción de capsaicinoides que su contraparte, la ruta de fenilpropanoides. En su estudio las enzimas clave fueron Kas y CS, ambas con correlación positiva. En contraste, Kim *et al.* (2014) consideran que las enzimas claves son fenilalanina amonio-liasa (PAL), aminotransferasa de cadena amino ramificada (BCAT), cinamato 4-hidroxilasa (C4H), cetoacyl-ACP sintasa (Kas), proteína acil transportadora (ACL), cafeoil-CoA 3-O-metiltransferasa (COMT), acil-ACP tioesterasa (FatA), aminotransferasa (AMT) y capsaicina sintasa (CS). Cabe señalar que en su investigación las enzimas que tuvieron los niveles más altos de expresión al inicio y durante el desarrollo del fruto fueron PAL, COMT, FatA, Kas y CS (Figura 2.1).

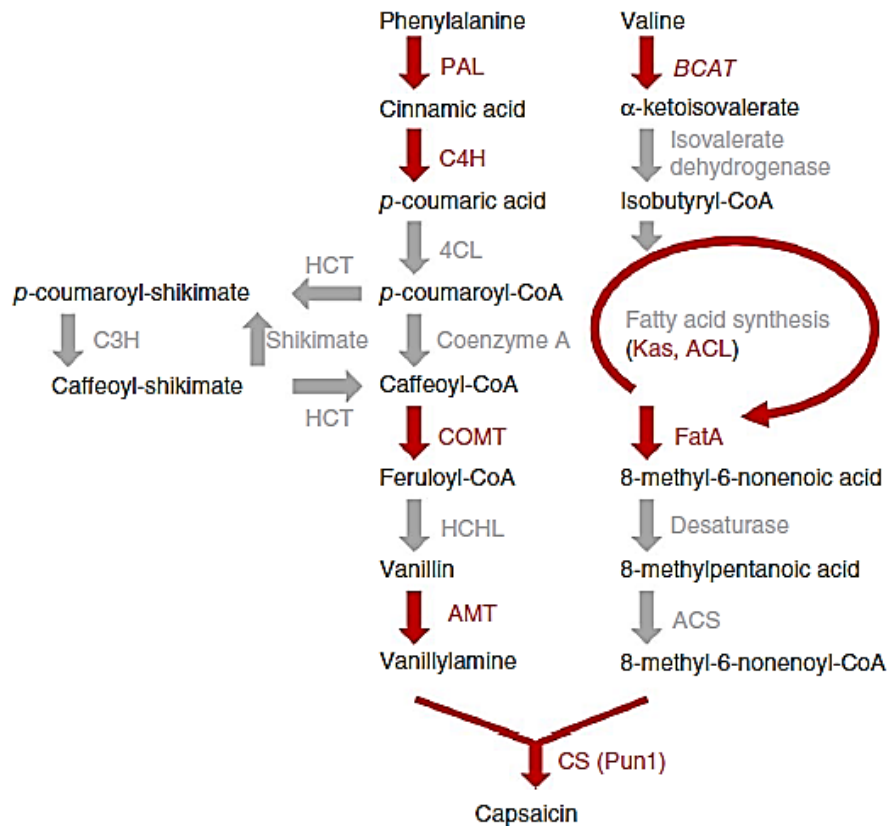


Figura 2.1. Ruta metabólica para la síntesis de capsaicinoides (Kim *et al.*, 2014).

2.2.2. Genes

A nivel molecular, la presencia de capsaicinoides está correlacionada con el locus C también conocido como *Pun1* ubicado en el cromosoma 2, cuyo producto es una aminotransferasa llamada AT3 transcrita en la placenta (Stewart *et al.*, 2005). Este gen con efecto mayor es esencial en la síntesis de estos compuestos. Hasta el momento se conocen tres mutantes alélicas: la primera es *Pun1*¹, exclusiva de *C. annuum*, con una deleción de 2.5 kb que elimina la región promotora y la mayor parte del primer exón, lo que ocasiona que el gen no se transcriba ni se traduzca (Stewart *et al.*, 2005); *Pun1*² de *C. chinense* presenta una deleción de 4 pb en el primer exón, lo cual crea un codón prematuro de parada, y

aunque hay transcripción la proteína no se produce (Stewart *et al.*, 2007). El tercer alelo conocido es *Pun1³*, que se caracteriza por la deleción en el extremo 3' del gen, lo que resulta en la pérdida de los últimos 70 aminoácidos en la proteína PUN1 (Stellari *et al.*, 2010).

Otros genes presentan la ubicación siguiente: en el cromosoma 3 se codifica a fafeoil-CoA 3-O-metil transferasa (COMT) y la aminotrasferasa putativa (pAMT); en el cromosoma 4, la cadena ramificada de aa transferasa (BCAT); y en el cromosoma 7, a NADH dehidrogenasa (ndhC). Mazourek *et al.* (2009) reportan más detalladamente la ubicación celular de las enzimas y el origen de los genes a partir de los cuales son codificadas (Cuadro 2.1).

2.2.3. El picor en frutos de *Capsicum*

El picor es una característica compleja que está regulado por la interacción del genotipo y el ambiente (Zewdie y Bosland, 2000; Gurung *et al.*, 2011), y su acumulación depende de la edad, tamaño y etapa de desarrollo del fruto (Estrada *et al.*, 1997). En plantas bajo condiciones diferentes de estrés hídrico (Estrada *et al.*, 1999), por temperatura (González-Zamora *et al.*, 2013), luz o salinidad (Arrowsmith *et al.*, 2012), se ha observado la tendencia a incrementar el contenido de capsaicinoides al tiempo que disminuyen los de lignina, y lo contrario ocurre en condiciones sin estrés (Estrada *et al.*, 2000), ello se debe a la competencia alta por intermediarios que comparten estas rutas. Según Estrada *et al.* (1999), al restringirse el crecimiento de la planta existe acumulación mayor de carbohidratos no estructurales que favorece la concentración final de capsaicinoides.

Cuadro 2.1. Enzimas involucradas en la ruta de síntesis de capsaicinoides (Mazourek *et al.*, 2009; Blum *et al.*, 2003).

Nombre	Abreviación	Accesión GeneBank No.	Localización órgano	Cromosoma	
				Mazourek	Blum
Fenil amonio liasa	PAL	EU616575	O	9	9
Cinnamato 4 hidrolasa	C4H	EU620574	RE	6	6
4-cumaroil-CoA ligasa	4CL	EU616540	O	LG A	
p-cumaroil shiquimato/quinato 3 hidrolasa	C3H	EU616552	RE	1 + 8	
Hidroxicinamoiltransferasa	HCT	EU616565		2	
Cafeoil-CoA 3-O-metil transferasa	CCoAOMT	EU616554	O	1 + 8	3
Aminotransferasa putativa	pAMT	AF085149	O	7, 3	7
Aminotransferasa putativa	pAMT2	EU616576	M	12	
Aciltransferasa 3 (Pun 1)	AT3	AY819029	O	2	
Cadena ramificada de aa transferasa	BCAT	AY034379	M	4	4
α-ácido-ceto-decarboxilasa E1 α	BCKDH α	E1 EU616548	M	6	
α-ácido-ceto-decarboxilasa E1 β	BCKDH β	E1 EU616549	M	1 + 8	
Dihidrolipoamida transacilasa	BCKDH	E2 EU616550	M	-	
Dihidrolipoamida dehidrogenasa	BCKDH	E3 EU616551	M	1 + 8	
Malonil-CoA: ACP transacilasa	MCAT	EU616573	C	-	
Acil-ACP tioesterasa	FatA	AF318288	C	6	6
Acil-ACP tioesterasa	FatB	EU616562	C	9	
Proteína transportadora acil	ACL	AF127796	C	1 + 8	
Cetoacil-ACP sintasa I	KAS I	AF085148	C	1 + 8	12
Cetoacil-ACP sintasa III	KAS IIIa	EU616569	C	-	
Cetoacil-ACP sintasa III	KAS IIIb	EU616570	C	-	
Acil-CoA sintetasa 1	ACS 1	EU616571	O	1 + 8	
Acil-CoA sintetasa 2	ACS 2	EU616572	O	1 + 8	

C: cloroplasto, M: mitochondria y RE: retículo endoplásmico O: otro, usualmente citoplasma.

La gran variabilidad entre genotipos en el contenido de capsaicinoides (Figura 2.2), aunada a su importancia comercial, hace que esta característica bioquímica forme parte de los programas de mejoramiento genético de este género.

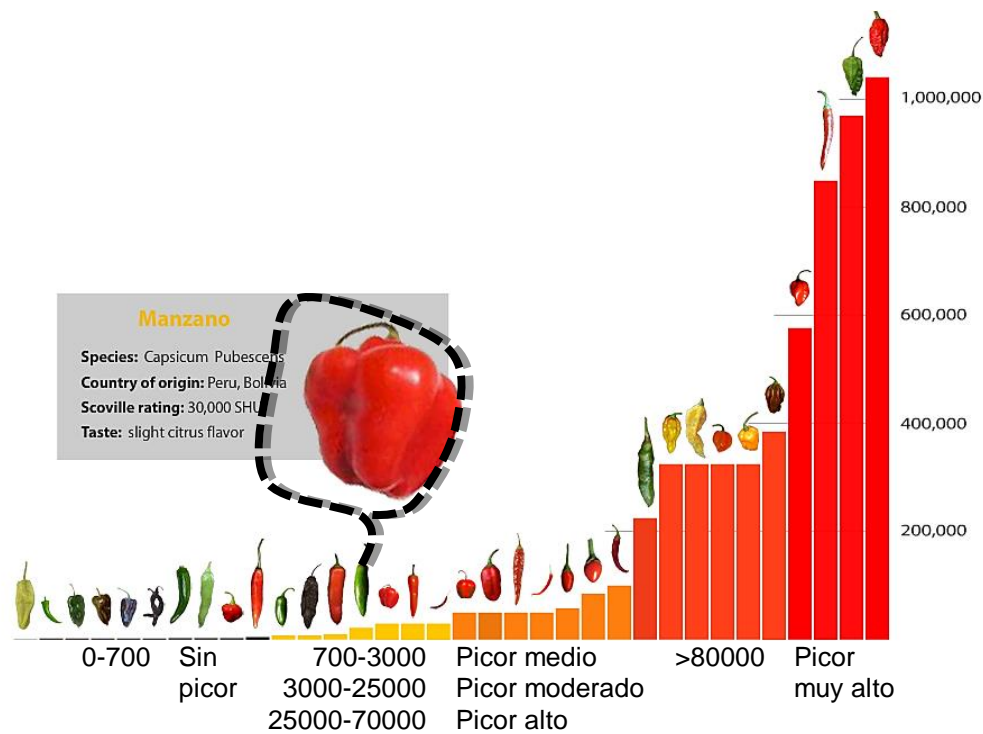


Figura 2.2. Clasificación de los chiles más conocidos según su picor en Unidades Scoville (SHU) (Weiss, 2002).

El primer método para la determinación del picor lo desarrolló el farmacéuta Wilbur Scoville (Scoville, 1912). La técnica consiste en series de diluciones que disminuyen el picor hasta no ser detectable, y el número final de diluciones asigna el valor en unidades Scoville (SHU, Scoville Heat Units). En la actualidad, el método más común, confiable y preciso para conocer la naturaleza y cantidad de estos compuestos, es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En unos reportes sobre el picor del chile Manzano (*C. pubescens* P. y R.) el contenido de capsaicinoides fluctúa entre 12 y 30 mil unidades Scoville (SHU), pero en otros indican un rango entre 50 y 250 mil SHU. En México, colectas de frutos procedentes de los estados de Veracruz, Puebla y Chiapas han registrado contenidos entre 4 mil y hasta 56 mil SHU (Cruz-Pérez *et al.*, 2007; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2010). En estos materiales se estableció que la cantidad de estos

alcaloides disminuye durante la maduración del fruto, por lo que su medición se hizo en la etapa óptima de cosecha, a los 76 días después de la polinización (Cruz-Pérez *et al.*, 2007).

2.3. ADN y su extracción

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una macromolécula de polinucleótidos cuyas unidades nucleotídicas están formadas por un azúcar (desoxirribosa), una base nitrogenada (adenina, citosina, guanina o timina) y un grupo fosfato. Esta molécula representa la información genética de la célula, y a la vez es responsable de su transmisión hereditaria.

En plantas el ADN tiene tres orígenes según su organelo huésped: núcleo, cloroplastos y mitocondrias. En células eucariotas, la mayor parte se encuentra contenida en el núcleo (nADN), en regiones de copia única, duplicadas o repetidas. En organismos diploides existen dos copias de cada región genética (loci) en los pares homólogos de los cromosomas (alelos). En cloroplastos (cpADN) y mitocondrias (mtADN) el ADN es circular, se encuentra altamente conservado, con tamaños que varían de 120 a 150 kb (Sugiura, 1987) y 76 a 773 kb, respectivamente (Kuntal y Sharma, 2011).

De acuerdo con su origen, la extracción del ADN se realiza mediante protocolos específicos. En el caso particular de ADN de cloroplastos y mitocondrias, la extracción inicia a partir del aislamiento, limpieza y purificación de estos organelos. Este proceso requiere de amortiguadores que permitan mantener la presión osmótica y el pH adecuados para conservar la integridad de estos organelos mientras se liberan compuestos por la ruptura celular (Millar *et al.*, 2007) y de gradientes de densidad que aseguren una separación apropiada del organelo deseado; por ello, un especial cuidado debe de observarse en la calidad de los

reactivos que fungen como materia prima para la preparación de los amortiguadores.

Numerosos reportes acerca del aislamiento y extracción de ADN para cloroplastos y mitocondrias (Douce *et al.*, 1987; Hájek *et al.*, 2004; Jansen *et al.*, 2005; Kahlau *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 2011; Millar *et al.*, 2001; Mourad y Polacco, 1988, Rahman y Huber, 1996; Rowan y Bendich, 2011; Salvi *et al.*, 2008; Triboush *et al.*, 1998), priorizan la integridad estructural de los organelos aislados así como el contenido bajo de contaminantes. A causa de la cantidad de reactivo que se emplea en cada muestra, algunos de ellos han tratado de reducir costos sin afectar la eficiencia y calidad del ADN extraído (Hájek *et al.*, 2004; O'Hara-Mays y Capwell, 1993; Mourad y Polacco, 1989; Triboush *et al.*, 1998); no obstante, el consumo de reactivos continúa siendo elevado, más cuando el propósito es el de procesar centenares de muestras, incurriendo en costos significativos, por ejemplo al establecer relaciones genéticas entre individuos y entre poblaciones. Además, algunas metodologías requieren de equipos no tan comunes como ultracentrífugas, para poder sedimentar los organelos dentro de los gradientes de percoll, cloruro de cesio u otros.

Los pasos subsecuentes tales como lisis celular, eliminación de proteínas y precipitación y limpieza del ADN son iguales que en la extracción de ADN nuclear. El propósito de la lisis es permitir la liberación del ADN de la membrana que lo rodea mediante: a) detergentes como SDS (dodecil sulfato de sodio); b) quelantes, como EDTA (ácido etileno di-amino tetra acético), cuya forma des-protonizada atrae cationes que desestabilizan la membrana celular e inhiben las ADNasas; c) sales, como NaCl, que recubren el ADN y evitan su degradación; d) amortiguadores de pH, como Tris-HCl, TAE, TBE, entre otros; y, para algunos casos e) proteinasa k, que degrada proteínas o enzimas.

La mezcla se incuba durante periodos cortos de tiempo a temperaturas cercanas a 80 °C, pero no superiores que causen la degradación del ADN. El

siguiente paso es la eliminación de proteínas, la cual emplea fenol en igual volumen al de la muestra, y luego cloroformo cuya función es la obtención de ADN libre de lípidos, o la combinación de ambos, junto con isopropanol en proporción 25:24:1. Por último, la precipitación del ADN utiliza etanol absoluto y sal a alta concentración (encargada de crear una capa iónica positiva sobre el ADN que está cargado negativamente y permitir así su precipitación). La muestra se almacena a -20 °C por 45 min o hasta una noche completa. Posteriormente se centrifuga, se elimina el etanol, se deja secar el ADN y se re-suspende en agua libre de ADNasas o en amortiguador TAE (Falcón y Valera, 2007).

Estudios del cpADN y el mtADN se han encaminado, por su tipo de herencia, hacia investigaciones sobre composición y organización de la información genética ahí contenida (Kahlau *et al.*, 2006), función, coordinación y secuencia de los genes (Sugiura, 1992; Sorenzo *et al.*, 1999; Sugiyama *et al.* 2005; Kahlau *et al.*, 2006), linaje de poblaciones, inferencia en cambios demográficos y de dispersión (Di Rienzo y Wilson, 1991), y a determinar procesos de evolución mediante análisis filogenéticos (Chung *et al.*, 2003; Ryzhova y Kochieva, 2004; Ravi *et al.*, 2008; Jo *et al.*, 2011). Por lo anterior, su aislamiento del núcleo celular debe hacerse de manera confiable y repetible.

2.4. Análisis genético

El análisis genético se basa en la detección de polimorfismos, que son variaciones heredables en regiones de ADN detectadas entre los genotipos, generalmente mediante el empleo de marcadores moleculares. Otra utilidad de los marcadores reside en incrementar la probabilidad de encontrar el genotipo deseado al combinar más de una característica en la progenie.

2.4.1. Marcadores microsatélites

Los microsatélites, también conocidos como SSR (Simple Sequence Repeat), son marcadores de ADN formados por secuencias repetidas cortas y en serie de 1 a 6 nucleótidos, presentes tanto en procariotas como en eucariotas (Hancock, 1996). Su uso continuo en investigación se explica por la variabilidad, repetitividad, detección fácil, codominancia y distribución amplia en el genoma (Powell *et al.*, 1996, Li *et al.*, 2002). Además, han sido exitosos en el análisis de la diversidad genética (Echt *et al.*, 1998; Mengoni *et al.*, 2001) y de la evolución (Ishii y McCouch, 2000; Li *et al.*, 2000; Richard y Thorpe, 2001). Los marcadores variables o polimórficos se creen son resultado de errores en la replicación (Moxon y Wills, 1999), cuya ocurrencia tiene tasas más frecuentes que las mutaciones en ADN no repetitivo (Wierdl *et al.*, 1997).

En cloroplasto y mitocondria los SSR comenzaron a diseñarse a partir de la secuencia genómica del de *Nicotiana tabacum*, que luego se aplicaron con éxito en otras especies (Weising y Gardner, 1999; Bryan *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2003; Ryzhova y Kochieva, 2004; Sugiyama *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2005). No obstante, también ha sido necesario la búsqueda de nuevos microsatélites, acción que ha estado sujeta a la disponibilidad de secuencias en bibliotecas genómicas de la especie en cuestión o altamente relacionadas con ella (Hosaka y Sanemoto, 2009; Ishii *et al.*, 2006; Rajendrakumar *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2011).

En arroz (*Oriza spp.*) los microsatélites en el cloroplasto y en la mitocondria representan 4.5 % y 3.5 % de su genoma, equivalente a 871 y 2528 motivos repetidos, respectivamente (Rajendrakumar *et al.*, 2007). Su densidad en ambos organelos en regiones génicas es de 36 pb/kb y 28 pb/kb, y en regiones intergénicas de 49 pb/kb y 36 pb/kb. En *O. sativa*, *O. japonica* y *O. nivara* los microsatélites abarcan entre 60 y 69 % de las secuencias de genes codificantes. Los mismos autores reportan también que las repeticiones A y T fueron las más

abundantes y que en los cloroplastos existen mayor cantidad de mononucleótidos, en tanto en las mitocondrias son dinucleótidos. De forma similar McCouch *et al.* (2002) obtuvieron que estos microsatélites son los más abundantes y polimórficos incluso en el genoma nuclear. Rajendrakumar *et al.* (2007) sugieren que la ocurrencia de estos marcadores es un evento no al azar. En los microsatélites analizados para cloroplastos y mitocondrias encontraron polimorfismo en 1 (contenido de información polimórfica o PIC = 0.34) y 13 (PIC entre 0.14 y 0.45) de los marcadores, respectivamente.

En cloroplastos de cítricos y géneros cercanos, Cheng *et al.* (2005) probaron 22 microsatélites: tres derivaron de *Pinus*, cinco de *Oriza* y 14 de *Nicotiana tabacum*; además, desarrollaron otros 11 a partir de la secuencia de *Arabidopsis thaliana*. No hubo amplificación con los iniciadores de *Pinus* ni de *Oriza*, por lo cual sugieren que la secuencia de mononucleótidos conservados es escasa entre gimnospermas y angiospermas (Weising y Gardner, 1999; Cheng *et al.*, 2005) y entre monocotiledóneas y dicotiledóneas (Cheng *et al.*, 2005). De los 14 seleccionados, ocho de tabaco y seis de *Arabidopsis*, 11 fueron polimórficos en 34 genotipos (*Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus* y algunos de sus híbridos), con 2 a 8 alelos por loci (PIC entre 0.057 y 0.732). Las relaciones filogenéticas a partir de dendrogramas fueron congruentes con investigaciones taxonómicas previas, y además se pudieron distinguir progenitores maternos así como la procedencia (hibridación o poliembrionía), en ciertos genotipos.

En cinco tribus de la familia Cucurbitacea se estudiaron 21 especies con el fin de conocer su proximidad genética (Chung *et al.*, 2003). De los 23 microsatélites de cloroplastos usados, cuatro tuvieron poca variación y en tres no hubo alguna. Los cambios encontrados en la secuenciación de algunos de los microsatélites restantes fueron inserciones, deleciones, inversiones y duplicaciones, incluso en secuencias vecinas. Por su parte, Orti *et al.* (1997) en regiones que rodean microsatélites detectaron eventos de mutación, que en combinación con cambios en el propio microsatélite, fijan el tamaño final de la variación. Otro aspecto fue la

construcción de grupos mediante el análisis de componentes principales y de dendrogramas, con los cuales observaron relaciones de evolución entre taxa.

Estos análisis respaldan los estudios bioquímicos y morfológicos que indican la existencia de linajes diferentes dentro de la tribu Benincaseae, y reafirman la hipótesis que el género *Benincasa* es descendiente de un ancestro africano, y que el progenitor en el nuevo mundo de la tribu Sicyeae comparte un ancestro común con el género *Luffa* de las Benincaseae del viejo mundo. En *Theobroma cacao* Yang *et al.* (2011) diseñaron 9 microsatélites y los evaluaron en 95 accesiones, encontraron que el microsatélite de polimorfismo más alto fue una repetición pentámera. El número de alelos varió entre 2 y 7 (h entre 0.444 y 0.797). Entre las accesiones se logró identificar a 8 haplotipos de cpADN.

Entre las familias Solanaceae, Actinidiaceae, Brasicaceae, Fabaceae, Myrtaceae, Rosaceae y Poaceae, Weising y Gardner (1999) identificaron 10 microsatélites consenso en cpADN. Observaron que la amplificación de las monocotiledóneas fue la menos eficiente, que polimorfismos en mayor grado y frecuencia se encuentran con el microsatélite ubicado entre los genes *rpl20* y *rps12*, que en Solonaceas y Actinidiaceas la variación intraespecífica es limitada, y que la mayor fuente de variación es causada por el número de repeticiones del microsatélite.

En Solanaceas Bryan *et al.* (1999) examinaron 36 microsatélites en el genoma del cloroplasto, de los cuales 26 mostraron polimorfismo pero no correlación entre el nivel de variación y la longitud del microsatélite. De igual manera, al comparar la sustitución de nucleótidos con la variación en el tamaño del SSR, Orti *et al.* (1997) encontraron correlación baja. Se detectó mayor polimorfismo dentro de intrones que aquellos SSRs ubicados en exones (Bryan *et al.*, 1999).

Ryzhova y Kochieva (2004), mediante 6 microsatélites analizaron el polimorfismo de especies silvestres y cultivadas del género *Capsicum*: *C.*

galapagoense, *C. eximium*, *C. cardenasii*, *C. paraetermissum*, *C. chacoense*, *C. pubescens*, *C. baccatum*, *C. flurescens*, *C. chinense* y *C. annum*. Encontraron que aunque la divergencia dentro de este género es poca, fue posible identificar haplotipos para cpADN en cada especie. El número de variantes alélicas estuvo entre 2 y 8. El polimorfismo intraespecífico alcanzado no ha sido posible lograrlo con el análisis de AFLP y RAPD, aunque el bajo nivel de variación es independiente del marcador usado. En el cpADN de *C. annum* se observó la menor variación. Hubo mayor diversidad en las especies silvestres, en las cuales se identificaron variantes alélicas propias. Se reafirman las relaciones filogenéticas entre los plastomas (cpADN) del género *Capsicum* con la reportada mediante características morfológicas y mediante marcadores isoenzimáticos y moleculares en el ADN nuclear.

En el genoma de la mitocondria la variación debido a cambios en la longitud del microsatélite nad3-1 en 15 especies de *Pinus* fue reportado por Sorenzo *et al.* (1999). La ubicación de este microsatélite es una región intergénica entre los genes que codifican tanto para la subunidad 3 de la NADH deshidrogenasa como para la proteína ribosomal S12 (*rps12*). Su análisis permitió la clasificación de esta especie, y además se tuvo el primer reporte acerca del polimorfismo del genoma mitocondrial en plantas.

En especies del género *Oriza* se detectó polimorfismo con 7 marcadores microsatélites en mitocondria; no obstante, el grado difirió entre las secuencias amplificadas (Nichikawa *et al.*, 2005). Cuando el microsatélite se ubicó en regiones codificantes no hubo variación alguna entre accesiones, a causa de los efectos deletéreos que conllevaría una mutación. Se encontró también polimorfismo en la forma de inserciones o deleciones, pero esta vez asociado con la región que flanquea el microsatélite, similar a lo antes reportado en el cloroplasto del género *Clusia* (Hale *et al.*, 2004). Los autores relacionaron las accesiones a través de dendrogramas, y con la información de 5 microsatélites en el cloroplasto construyeron un modelo.

Entre *Arabidopsis thaliana*, *Beta vulgaris*, *Oriza sativa* y *Brassica napus* con respecto a *C. annuum*, Sugiyama *et al.* (2005) compararon microsatélites en secuencias que codifican tRNA, proteínas ribosomales y componentes del complejo II de la mitocondria, y no encontraron homología; por ello los autores sugieren que en cada especie los microsatélites se produjeron independientemente durante su evolución; así mismo reportaron que el orden de los genes y las secuencias espaciadoras e intergénicas difieren entre las especies mencionadas.

En trigo (*Triticum aestivum* L.) se detectaron polimorfismos en 15 de 21 microsatélites evaluados en el mtADN, correspondientes a 2 y hasta 5 alelos polimórficos (Ishii *et al.*, 2006). Al relacionar especies ancestrales de trigo y el trigo común identificaron 7 haplotipos, uno de los cuales se mantuvo conservado durante la evolución de las especies tetraploides silvestres hasta los hexaploides cultivados. La variabilidad de los microsatélites en mitocondria fue menor a la registrada en cloroplastos.

En especies silvestres y cultivadas de papa (*Solanum tuberosum* L.), Hasaka y Sanemoto (2009) desarrollaron microsatélites con el propósito de diferenciarlas mediante la amplificación del ADN mitocondrial. Obtuvieron menor polimorfismo en el genoma de la mitocondria en comparación al encontrado en un estudio previo en cloroplastos. Con estos tipos de información se produjeron dendrogramas similares, con excepción de 3 haplotipos; al agrupar los resultados de perfiles del cpADN y mtADN, se derivaron relaciones filogenéticas más claras. La clasificación de haplotipos mediante diferencias en la estructura o rearreglos de la mitocondria se efectuó a partir de 3 microsatélites de los 14 marcadores desarrollados.

En 16 genomas mitocondriales que parten desde las algas hasta las angiospermas, se investigó la organización de los microsatélites (Kuntal y Sharma, 2011). En todas las especies varió tanto la frecuencia de microsatélites por kb, como su proporción en el genoma. Las repeticiones de mononucleótidos (A/T) fueron las más abundantes seguidas de las de dinucleótidos (TA/AT), con

excepción de *Zea mays*, *T. aestivum* y *Cucurbita pepo* en las que las más abundantes fueron de trinucleótidos.

2.4.2. QTL y su análisis

Una característica cuantitativa o compleja es aquella cuya expresión se ve afectada por más de un gen (poligénico) y por el ambiente. Son pocos los casos en los que la variabilidad se explica por un solo gen y en los que el ambiente no influye en el fenotipo; por ello la mayoría de las características de interés son complejas. El locus (ubicación del gen entre cromosomas homólogos) que controla esta característica cuantitativa es lo que comúnmente se conoce como QTL (Quantitative trait locus) (Liu, 1998).

La localización del QTL trae consigo la identificación del o los marcadores asociados más fuertemente con la característica; por tanto, es clave la asociación significativa entre la característica y el marcador para la detección de un QTL cercano. La distribución de la característica para el genotipo del QTL deberá tener un modelo típico que corresponde a una variable aleatoria, para la cual se asume distribución normal (Liu, 1998). Su análisis presenta tres hipótesis (Churchill y Doerge, 1998):

$H_0^1: \Delta = 0$; *no hay presencia de QTL*

$H_0^2: r = \frac{1}{2}$; $\Delta > 0$; *hay presencia de QTL pero no está ligado al marcador*

$H_A: r < \frac{1}{2}$; $\Delta > 0$; *hay presencia de QTL y está ligado al marcador*

Así mismo, son tres las premisas que conforman la base genética de la relación herencia de la característica cuantitativa—marcador genético. La primera de ellas enuncia que los genes que controlan la característica cuantitativa están ubicados en el genoma como marcadores genéticos; la segunda premisa estima que los marcadores, al cubrir una porción amplia del genoma, tienen la oportunidad

de estar ligados a los genes que controlan dicha característica; y en la tercera se considera que al segregar los genes y el marcador en una población definida genéticamente, entonces la relación de ligamiento entre ellos puede hallarse mediante la asociación entre la variación de la característica y el patrón de segregación del marcador (Liu, 1998).

La ubicación de QTLs aplica metodologías de mapeo enfocadas a servir como puente entre la genética cuantitativa y la biología molecular, mediante la conexión entre el efecto de los genes y los procesos bioquímicos. A partir de estos análisis se cambió la visión convencional de la herencia poligénica, para permitir la identificación de nuevos loci con funciones biológicas importantes pero con poca información molecular.

Los padres seleccionados para derivar una población de mapeo deben contar con variación suficiente en sus secuencias de ADN y en su fenotipo para la característica de interés (Mauricio, 2001). No obstante, la falta de variación fenotípica entre los padres no implica que no haya variación genética; la razón principal es porque diferentes grupos de genes pueden resultar en el mismo fenotipo. La finalidad en el diseño de cruza es detectar y seguir el progreso de los marcadores en la progenie, a la vez que se facilita la división e interpretación de los componentes genéticos de la varianza (Liu, 1998).

Una de las metodologías de ubicación es el análisis de asociación, mapeo por asociación o mapeo por desequilibrio de ligamiento. Este mapeo consiste en encontrar asociaciones marcador-característica a través de la magnitud de su correlación, para detectar y localizar loci de carácter cuantitativo en poblaciones genéticamente diversas. Este mapeo ofrece mayor precisión que el análisis basado en el ligamiento de familias, por lo cual la selección asistida por marcadores, el hallazgo de genes y de formas de conectar la diversidad de secuencias con diferencias genotípicas heredables, se podría hacer más eficiente (Mackay y Wayne, 2007). Este tipo de análisis está siendo aplicado recientemente en la genotecnia vegetal, en especies como maíz (*Zea mays*), *Arabidopsis*, sorgo

(*Sorghum* spp.), trigo (*Triticum* spp.), avena (*Avena sativa*), papa (*Solanum tuberosum*), arroz (*Oriza sativa*), *Pinus*, caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), eucalipto (*Eucalyptus* spp.) y pastos perennes (*Lolium* spp.), principalmente en líneas endogámicas (Zhu *et al.*, 2008).

Cómo su nombre lo indica, el desequilibrio de ligamiento (DL), el cual mide el grado de asociación no aleatorio entre los alelos en diferente loci ubicados en el mismo cromosoma (Mackay y Wayne, 2007), y determina la densidad de marcadores requeridos para el análisis de una población: si el DL aumenta sobre distancias físicas largas (algunos cM), un número relativo bajo marcadores será necesario para obtener marcadores cercanos a sitios funcionales, pero la resolución será baja; caso contrario ocurre cuando el DL disminuye sobre distancias cortas (Yu *et al.*, 2006). La importancia del DL radica en la detección de loci de interés a través del mapeo cercano. Algunos factores que lo incrementan son el sistema de cruzamiento de especies autógamias, el aislamiento genético entre linajes, subdivisiones en la población, selección natural y artificial; en cambio, disminuye con tasas altas de recombinación, sistema de cruzamiento de especies alógamas y poblaciones con gran tamaño (Rafalski y Morgante, 2004).

2.4.3. QTL asociados con picor

El picor es una característica agronómica importante, compleja, heredable, que es influenciada por factores ambientales. En Chile son varias las investigaciones en las que se han detectado QTLs asociados con el contenido de los principales capsaicinoides. Blum *et al.* (2003) generaron una población de mapeo F₂ a partir de líneas endogámicas progenitoras con y sin contenido de picor. En la población se usaron 400 iniciadores RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA, por sus siglas en inglés) y los polimórficos se convirtieron en marcadores SCARs (Sequence Characterized Amplified Region, por sus siglas en inglés). La asociación se hizo con 120 plantas, divididas en dos grupos de igual número, con contenido bajo y alto de picor, respectivamente. La detección del QTL 'cap' en el

cromosoma 7 explicó la variación fenotípica entre 34 y 38 % tanto para dihidrocapsaicina como para capsaicina.

Ben-Chaim *et al.* (2006) mapearon 6 QTLs en los cromosomas 3, 4 y 7 (cap 3.1, cap 4.1 y 4.2 y cap 7.1 y 7.2) y, a diferencia de Blum *et al.* (2003), usaron 234 familias F₃ y como progenitores a chiles de las especies *C. annum* cv. 'NuMexRNaky' y *C. frutescens* accesión BG 2814-6 contrastantes en picor y tamaño. Los QTLs explicaron la variación fenotípica en capsaicina en 24, 19 y 37 %, en dihidrocapsaicina 18, 13 y 25 %, y en capsaicinoides totales 23, 27 y 31 %, respectivamente.

Yarnes *et al.* (2013), en una población de 105 líneas endogámicas recombinantes (RILs) obtenidas a partir de los mismos progenitores utilizados por Ben-Chaim *et al.* (2006), identificaron 12 QTLs algunos con heterosis, y otros con efectos de aditividad asociados con el contenido de capsaicinoides en los cromosomas 3, 4, 5, 6, 7, 10 y 11 (QTL 3.1, 4.2, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 5.4, 6.8, 7.3, 10.2 y 11.8).

En la actualidad no existen análisis de QTLs para ADN de cloroplastos y mitocondrias que influyan sobre un carácter de importancia económica. Se puede aportar conocimiento novedoso referente al picor del fruto a partir del estudio de caracteres asociados a la producción de metabolitos secundarios en particular capsaicinoides; por tanto, la investigación de la herencia materna del picor contribuye con la generación de conocimiento en esta área.

2.5. Literatura citada

- Arrowsmith, S., T. P. Egan, J. F. Meekins, D. Powers, and M. Metcalfe. 2012. Effects of salt stress on capsaicin content, growth, and fluorescence in a Jalapeño cultivar of *Capsicum annuum* (Solanaceae). *BIOS* 83:1-7.
- Aza-González, C., H. G. Núñez-Palenius, N. Ochoa-Alejo. 2011. Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Cell Reports* 30:695-706.
- Ben-Chaim, A., Y. Borovsky, M. Falise, M. Mazourek, B. C. Kang, I. Paran, and M. Jahn. 2006. QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics* 113:1481-1490.
- Bennett J., and G. W. Kirby. 1968. Constitution and biosynthesis of capsaicin. *Journal of Chemistry Society* 0?:442-446.
- Blum E., M. Mazourek, M. O'Connell, J. Curry, T. Thorup, K. Liu, M. Jahn and I. Paran. 2003. Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics* 108:79-86.
- Bryan, G. J., J. McNicoll, G. Ramsay, R. C. Meyer, and W. S. D. Jong. 1999. Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants. *Theory and Applied Genetics* 99:859-867.
- Cheng, Y., M. C. De Vicente, H. Meng, W. Guo, N. Tao and X. Deng. 2005. A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in Citrus and related genera. *Tree Physiology* 25:661-672.
- Chung, S., D. S. Decker-Walters and J. E. Staub. 2003. Genetic relationships within the Cucurbitaceae as assessed by consensus chloroplast simple sequence repeats (ccSSR) marker and sequence analyses. *Canadian Journal of Botany* 81:814-832.
- Churchill, G. A. and R. W. Doerge. 1997. Mapping quantitative trait loci in experimental populations. *In: Molecular Dissection of Complex Traits*. Paterson, A. H. (ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. pp: 31-41.
- Cichewicz, R. H. and P. A. Thorpe. 1996. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* sp.) and their uses in Mayan medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 52:61-70.
- Cowles, R. S., J. E. Keller, and J. R. Miller. 1989. Pungent spices, ground red pepper, and synthetic capsaicin as onion fly ovipositional deterrents. *Journal of Chemical Ecology* 15:719-730.

- Cruz-Pérez, A. B., V. A. González-Hernández, R. M. Soto-Hernández, M. A. Gutiérrez-Espinosa, A. A. Gardea-Béjar, y M. Pérez-Grajales. 2007. Capsaicinoides, vitamina C y heterosis durante el desarrollo del fruto de chile manzano. *Agrociencia* 41: 627-635.
- Derry, S., A. S. C. Rice, P. Cole, T. Tan and R. A. Moore. 2013. Topical capsaicin (high concentration) for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2:CD007393. DOI: 10.1002/14651858.CD007393.pub3.
- Di Rienzo, A. and A. C. Wilson. 1991. The pattern of mitochondrial DNA variation is consistent with an early expansion of the human population. *Proceedings of the National Academy of Science* 88:1597-160.
- Dima, C., G. Coman, M. Cotârleț, P. Alexe, and S. Dima. 2013. Antioxidant and antibacterial properties of capsaicine microemulsions. *AUDJG Food Technology* 37:39-49.
- Douce, R., J. Bourgrignon, R. Brouquisse, and M. Neuburger. 1987. Isolation of plant mitochondria: general principles and criteria of integrity. *Methods in Enzymology* 148:403-415.
- Echt, C. S., L. L. De Verno, M. Anzidei, and G. G. Vendramin. 1998. Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Molecular Ecology* 7:307-316.
- Estrada, B., F. Pomar, J. Díaz, F. Merino, and A. Bernal, 1997. Evolution of capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* cv. Padrón at different growth stages after flowering. *Capsicum Newsletter* 16:60-64.
- Estrada, B., F. Pomar, J. Díaz, F. Merino and M. A. Bernal. 1999. Pungency level in fruits of the Padrón pepper with different water supply. *Scientia Horticulturae* 81: 385-396.
- Estrada B., M. A. Bernal, J. Díaz, F. Pomar, and F. Merino. 2000. Fruit development in *Capsicum annuum*: changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:6234-6239.
- Falcón, L. I. y A. Valera. 2007. Extracción de ácidos nucleicos. *In: Ecología Molecular*. L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (comps.). CONABIO, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. pp:499-516.
- Foley, W. J. and B. D. Moore. 2005. Plant secondary metabolites and vertebrate herbivores – from physiological regulation to ecosystem function. *Current Opinion in Plant Science* 8:430-435.

- Fujiwake, H., T. Suzuki, and K. Iwai. 1982. Capsaicinoid formation in the protoplast from the placenta of *Capsicum* fruits. *Agricultural Biology Chemistry* 46:2591-2592.
- González-Zamora, A., E. Sierra-Campos, J. G. Luna-Ortega, R. Pérez-Morales, J. C. Rodríguez O. and J. L. García-Hernández. 2013. Characterization of different *Capsicum* varieties by evaluation of their capsaicinoids content by high performance liquid chromatography, determination of pungency and effect of high temperature. *Molecules* 18:13471-13486.
- Gurung T, S. Techawongstien, B. Suriharn, and S. Techawongstien. 2011. Impact of environments on the accumulation of capsaicinoids in *Capsicum* spp. *HortScience* 46:1576– 1581.
- Hájek, T., D. Honys, and V. Capkova. 2004. New method of plant mitochondria: isolation and subfractionation for proteomic analyses. *Plant Science* 167:389-395.
- Hale, M. L., A. M. Borland, M. H. Gustafsson, and K. Wolff. 2004. Causes of size homoplasy among chloroplast microsatellites in closely related *Clusia* species. *Journal of Molecular Evolution* 58:182-190.
- Hancock, J. M. 1996. Simple sequences in a “minimal” genome. *Nature Genetics* 14:14-15.
- Hongo, H. and A. K. Karel. 1986. Effect of plant extracts on insect pests of common beans. *Journal of Applied Entomology* 102:164–169.
- Hosaka, K. and R. Sanemoto. 2009. Comparative differentiation in mitochondrial and chloroplast DNA among cultivated potatoes and closely related wild species. *Genes and Genetic Systems* 84:371-378.
- Ishii, T., and S. R. McCouch. 2000. Microsatellites and microsynteny in the chloroplast genomes of *Oryza* and eight other Gramineae species. *Theoretical and Applied Genetics* 100:1257-1266.
- Ishii, T., C. Takahashi, N. Ikeda, O. Kamijima and N. Mori. 2006. Mitochondrial microsatellite variability in common wheat and its ancestral species. *Genes and Genetic Systems* 81:211-214.
- Ishikawa, K. 2003. Biosynthesis of capsaicinoids in *Capsicum*. In: *Capsicum: the Genus Capsicum*. Krishna, A. (ed.). Taylor & Francis CRS Press. New York. pp: 87-95.
- Jansen R .K., L. A. Raubeson, J. L. Boore, C. W. de Pamphilis, T. W. Chumley, R. C. Haberle, S. K. Wyman, A. J. Alverson, R. Peery, and S. J. Hermanl.

2005. Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences. *Methods of Enzymology* 395:348–384.
- Jo, Y. D., J. Park, J. Kim, W. Song, C. Hur, Y. Lee, and B. Kang. 2011. Complete sequencing and comparative analyses of the pepper (*Capsicum annuum* L.) plastome revealed high frequency of tandem repeats and large insertion/deletions on pepper plastome. *Plant Cell Reports* 30:217-229.
- Jordt, S. E. and D. Julius. 2002. Molecular basis for species-specific sensitivity to 'hot' chili peppers. *Cell* 108:421-430.
- Joshi, S. P., V. S. Gupta, R. K. Aggarwal, P. K. Ranjekar and D. S. Brar. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by Inter simple sequence repeat polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1311-1320.
- Kahlau, S., S. Aspinall, J. C. Gray, and R. Bock. 2006. Sequence of the tomato chloroplast DNA and evolutionary comparison of solanaceous plastid genomes. *Journal of Molecular Evolution* 63:194:207.
- Kim, S., M. Park, S.-I. Yeom, Y.-M. Kim, J. M. Lee, H.-A. Lee, E. Seo, J. Choi, K. Cheong, K.-T. Kim, K. Jung, G.-W. Lee, S.-K. Oh, C. Bae, S.-B. Kim, H.-Y. Lee, S.-Y. Kim, M.-S. Kim, B.-C. Kang, Y. D. Jo, H.-B. Yang, H.-J. Jeong, W.-H. Kang, J.-K. Kwon, C. Shin, J. Y. Lim, J. H. Park, J. H. Huh, J.-S. Kim, B.-D. Kim, O. Cohen, I. Paran, M. C. Suh, S. B. Lee, Y.-K. Kim, Y. Shin, S.-J. Noh, J. Park, Y. S. Seo, S.-Y. Kwon, H. A. Kim, J. M. Park, H.-J. Kim, S.-B. Choi, P. W. Bosland, G. Reeves, S.-H. Jo, B.-W. Lee, H.-T. Cho, H.-S. Choi, M.-S. Lee, Y. Yu, Y. D. Choi, B.-S. Park, A. V. Deynze, H. Ashrafi, T. Hill, W. T. Kim, H.-S. Pai, H. K. Ahn, I. Yeam, J. J. Giovannoni, J. K. C. Rose, I. Sørensen, S.-J. Lee, R. W. Kim, I.-Y. Choi, B.-S. Choi, J.-S. Lim, Y.-H. Lee and D. Choi. 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature Genetics* 46:270-279.
- Knotkova, H., M. Pappagallo and A. Szallasi. 2008. Capsaicin (TRPV1 agonist) therapy for pain relief: farewell or revival. *The Clinical Journal of Pain* 24:142–154.
- Kumar, P., U. Deb, and M. P. Kaushik. 2012. Evaluation of oleoresin capsicum of *Capsicum frutescenes* var. *Nagahari* containing various percentages of capsaicinoids following inhalation as an active ingredient for tear gas munitions. *Inhalation Toxicology* 24:659-666.
- Kuntal, H. and V. Sharma. 2011. *In silico* analysis of SSRs in mitochondrial genomes of plants. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 15: 783-789.

- Lang, E. G. E., S. Mueller, S. Hoernstein, J. Porankiewicz-Asplund, M. Vervliet-Scheebaum, and R. Reski. 2011. Simultaneous isolation of pure and intact chloroplasts and mitochondria from moss as the basis for sub-cellular proteomics. *Plant Cell Reports* 30:205-215.
- Leete, E. and C. L. Louden. 1968. Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*. *Journal of American Chemistry Society* 90:6837-6841.
- Li, Y. C., M. S. Röder, T. Fahima, V. M. Kirzhner, A. Beiles, A. B. Korol, and E. Nevo. 2000. Natural selection causing microsatellite divergence in wild Emmer wheat at the ecologically variable microsite at Ammiad, Israel. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 985–999.
- Li, Y.- C., A. B. Korol, T. Fahima, A. Beiles, and E. Nevo. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11:2453-2465.
- Lin, C.-H., W.-C. Lu, C.-W. Wang, Y.-C. Chan, and M.-K. Chen. 2013. Capsaicin induces cell cycle arrest and apoptosis in human KB cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13:46.
- Liu, B.-H. 1998. Computational tools for study of complex traits. *In: Molecular Dissection of Complex Traits*. Paterson, A. H. (ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. pp: 43-79.
- Liu, S., W. Li, L. Wu, C. Chen, and J. Lei, 2013. *De novo* transcriptome assembly in chili pepper (*Capsicum frutescens*) to identify genes involved in the biosynthesis of capsaicinoids. *PlosOne* 8:e48156.
- Lu, H. F., Y. L. Chen, J. S. Yang, Y. Y. Yang, J. Y. Liu, S. C. Hsu, K. C. Lai, and J. G. Chung. 2010. Antitumor activity of capsaicin on human colon cancer cells in vitro and colon 205 tumor xenografts in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:12999-13005.
- Mackay, I. and P. Wayne. 2007. Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. *Trends in plant Science* 12:1360-1385.
- Mauricio, R. 2001. Mapping quantitative trait loci in plants: uses and caveats for evolutionary biology. *Nature Reviews Genetics* 2:370-381.
- Mazourek, M., A. Pujar, Y. Borovsky, Ilan Paran, L. Mueller and M. M. Jahn. 2009. A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant Physiology* 150:1806-1821.

- McCouch, S. R., X. Chen, and Y. G. Cho. 2002. Sequence divergence of rice microsatellites in *Oriza* and other plant species. *Molecular Genetics and Genomics* 268:331-343.
- Mengoni, A., C. Barabesi, C. Gonnelli, F. Galardi, R. Gabbrielli, and M. Bazzicalupo. 2001. Genetic diversity of heavy metal-tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 10: 1909-1916.
- Millar, A. H., L. J. Sweetlove, P. Giege, and C. J. Leaver. 2001. Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiology* 127:1711-1727.
- Millar, A. H., A. Liddell, and C. J. Leaver. 2007. Isolation and subfractionation of mitochondria from plants. *Methods in Cell Biology* 80:65-90, 2007.
- Moxon, E. R. and C. Wills. 1999. DNA microsatellites: agents of evolution? *Scientific American* 280:94-99.
- Mourad, G. and M. L. Polacco. 1989. Mini-preparation of highly purified chloroplast DNA from maize. *Plant Molecular Biology Reports* 7:78-84.
- Muciño S., S., E. Pedral M., J. G. Aquino M., y M. López R. 2004. Guía para cultivar chile manzano en invernadero. Grupo Produce, ICAMEX. Metepec, Edo. de México. 11 p.
- Nishikawa, T., D. A. Vaughan, and K. Kadowaki. 2005. Phylogenetic analysis of *Oryza* species, based on simple sequence repeats and their flanking nucleotide sequences from the mitochondrial and chloroplast genomes. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 696-705.
- O'Hara-Mays, E. P., and J. C. Capwell. 1993. Miniprep for chloroplast DNA isolation. *Microchemical Journal* 47:245-250.
- Orti, G., D. E. Pearse, and J. C. Avise. 1997. Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America* 94:10745-10749.
- Pérez G., M., F. Márquez S. y A. Peña L. 1997. Mejoramiento Genético de Hortalizas. Primera edición. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 380 p.
- Pérez G., M. y R. Castro B. 2008. El chile manzano. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 128 p.
- Pérez-Grajales, M., V. A. González-Hernández, A. Peña-Lomelí, and J. Sahagún-Castellanos. 2009. Combining ability and heterosis for fruit yield and quality in Manzano hot pepper (*Capsicum pubescens* R & P) landraces. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15:103-109.

- Perucka, I. and M. Materska. 2003. Antioxidant activity and content of capsaicinoids isolated from paprika fruits. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 12/53(2):15-18.
- Powell W., G. C. Machray, and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* 1:215-222.
- Prasad, B. C. N., H. B. Gururaj, V. Kumar, P. Giridhar, and G. A. Ravishankar. 2006. Valine pathway is more crucial than phenyl propanoid pathway in regulating capsaicin biosynthesis in *Capsicum frutescens* Mill. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:6660-6666.
- Rafalski, A. and M. Morgante. 2004. Corn and humans: recombination and linkage disequilibrium in two genomes of similar size. *Trends in Genetics* 20:103-111.
- Rahman, A. S. and D. J. Huber. 1996. Isolation and physiological properties of intact mitochondria from bell pepper (*Capsicum annuum*) fruit. *Journal of Plant Physiology* 149:677-682.
- Rajendrakumar, P., A. Kumar B., S. M. Balachandran, K. Srinivasarao and M. Sundaram. 2007. Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions. *Bioinformatics* 23:1-4.
- Ravi, V., J. P. Khurana, A. K. Tyagi, and P. Khurana. 2008. An update of chloroplast genome. *Plant Systematics and Evolution* 271:101-122.
- Richard, M. and R. S. Thorpe. 2001. Can microsatellites be used to infer phylogenies? Evidence from population affinities of Western Canary Island Lizard (*Gallotia galloti*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20:351-360.
- Rosa, A., M. Deiana, V. Casu, S. Paccagnini, G. Appendino, M. Ballero, and M. A. Dessí. 2002. Antioxidant activity of capsinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:4396-7401.
- Rowan, B. A. and A. J. Bendich. 2011. Isolation, quantification and analysis of chloroplast DNA. *Methods in Molecular Biology* 774:151-170.
- Ryzhova, N. N. and E. Z. Kochieva. 2004. Analysis of microsatellite loci of the chloroplast genome in the genus *Capsicum* (Pepper). *Russian Journal of Genetics* 40:892-896.
- Salvi, D., N. Rolland, J. Joyand and M. Ferro. 2008. Purification and proteomic analysis of chloroplast and their suborganellar compartments. *Methods in Molecular Biology* 432:19-36.

- Sánchez-Sánchez, H., V. A. González-Hernández, A. B. Cruz-Pérez, M. Pérez-Grajales, M. A. Gutiérrez-Espinosa, A. A. Gardea-Béjar y M. A. Gómez-Lim. 2010. Herencia de capsaicoides en chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.). *Agrociencia* 44: 655-665.
- Scoville, W. L. 1912. Note on *Capsicum*. *Journal of American Pharmacists Association* 1:453–454.
- Sorenzo, N., J. Provan, and W. Powell. 1999. An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome* 42:158-161.
- Stellari, G. M., M. Mazourek, and M. M. Jahn. 2010. Contrasting modes for loss of pungency between cultivated and wild species of *Capsicum*. *Heredity* 104:460-471.
- Stewart, C. Jr., B. C. Kang, K. Liu, M. Mazourek, S. L. Moore, E. Y. Yoo, B. D. Kim, I. Paran, and M. M. Jahn. 2005. The *pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *The Plant Journal* 42:675–688.
- Stewart, C. Jr., M. Mazourek, G. M. Stellari, M. O'Connell, M. Jahn. 2007. Genetic control of pungency in *C. chinense* via the *pun1* locus. *Journal of Experimental Botany* 58:979-991.
- Sugiura, M. 1987. Structure and function of the tobacco chloroplast genome. *The Botanical Magazine, Tokyo* 100:407-436.
- Sugiura, M. 1992. The chloroplast genome. *Plant Molecular Biology* 19:149-168.
- Sugiyama, Y., Y. Watase, M. Nagase, N. Makita, S. Yagura, A. Hirai, and M. Sugiura. 2005. The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. *Molecular Genetics and Genomics* 272:603–615.
- Sukrasno, N. and M. M. Yeoman. 1993. Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. *Phytochemistry* 32:839-844.
- Suzuki, T., H. Fujiwake and K. Iwai. 1980. Intracellular localization of capsaicin and its analogues, capsaicinoid, in *Capsicum* fruit. 1. Microscopic investigation of the structure of the placenta of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa. *Plant Cell Physiology* 21:839-853.
- Tewksbury, J. J., K. M. Reagan, N. J. Machnicki, T. A. Carlo, D. C. Haak, A. L. Calderón P. and D. J. Levey. 2008. Evolutionary ecology of pungency in wild chilies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:11808-11811.

- Triboush, S. O., N. G. Danilenko, and O. G. Davidenko. 1998. A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower. *Plant Molecular Biology Reporter* 16:183-189.
- Wang, D. and P. W. Bosland, 2006. The genes of *Capsicum*. *HortScience* 41: 1169-1187.
- Weising, K. and R. C. Gardner. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42:9-19.
- Weiss, E. A. 2002. *Spice Crops*. CABI Publishing International: New York, N. Y, USA. 411 p.
- Weissenberg, M., M. Klein, J. Meisner, K. R. S. Sscher. 1986. Larval growth inhibition of the spiny bollworm, *Earias insulana*, by some steroidal secondary plant compounds. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 42:213–217.
- Wierdl, M., M. Dominska, and D. P. Thomas. 1997. Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Theoretical Population Biology* 53:272-283.
- Wolfe, A.D. and C. P. Randle. 2001. Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences. *Systematic Botany* 26:120-130.
- Yang, J. Y., L. A. Motilal, H. Dempewolf, K. Maharaj, and Q. C. Cronk. 2011. Chloroplast microsatellite primers for cacao (*Theobroma cacao*) and other Malvaceae. *American Journal of Botany* 98:e372–374.
- Yarnes, S. C., H. Ashrafi, S. Reyes-Chin-Wo, T. A. Hill, K. M. Stoffel, and A. V. Deynze. 2013. Identification of QTLs for capsaicinoids, fruit quality, and plant architecture-related traits in an interspecific *Capsicum* RIL population. *Genome* 56:61-74.
- Yu, J., J. Holland, and E. Buckler. 2008. Genetic design and statistical power of nested association mapping in maize. *Genetics* 178:539-551.
- Zewdie, Y. and P. W. Bosland. 2000. Evaluation of genotype, environment and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annum* L. *Euphytica* 111: 185-190.
- Zhu, C., M. Gore, E. S. Buckler, and J. Yu. 2008. Status and prospects of association mapping in plants. *The Plant Genome* 1:5-20.

CAPÍTULO III

MICROTÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE ADN DE CLOROPLASTOS Y MITOCONDRIAS¹ Y EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL CON EL KIT DNA_{ZOL}

3.1. Resumen

Los protocolos recomendados para el aislamiento de cloroplastos y mitocondrias se basan en muestras grandes (> 5 g), lo que resulta en costos elevados. La miniaturización de la técnica mediante el uso de cantidades pequeñas de tejido y de reactivos es recomendable si el propósito del aislamiento es la extracción de ADN. En este trabajo se describe un protocolo miniaturizado y eficiente para el aislamiento de cloroplastos y mitocondrias y la extracción de su ADN (cpADN y mtADN, respectivamente) utilizando muestras pequeñas (0.5 g) de pericarpio de frutos de chile manzano (*Capsicum pubescens*). La eficiencia de extracción fue de 20 µg cpADN g⁻¹ de tejido fresco inicial para cloroplastos, y de 33 µg mtADN g⁻¹ de tejido fresco inicial para mitocondrias. El costo de 100 muestras con la micro-técnica se redujo hasta 160 veces para la extracción de cpADN y hasta 8 veces para la extracción de mtADN. La amplificación vía PCR de genes constitutivos *rbcL* (Rubisco subunidad grande) en cloroplasto y *coxI* (Citocromo oxidasa) en mitocondria confirmó la identidad del ADN extraído.

Palabras clave: *Capsicum pubescens*, ADN de cloroplastos, ADN de mitocondria, extracción de ADN.

¹ Enviado para su posible publicación como artículo científico en la revista Plant Cell Reports

MINIPREP FOR CHLOROPLAST AND MITOCHONDRIA ISOLATION AND DNA EXTRACTION

3.2. Abstract

Published protocols for DNA chloroplast and mitochondria isolation are based on large samples, more than 5 g, which imply high costs and plenty sample material. Reduction of tissue sample and reagent quantities is possible and convenient. This work describes an efficient miniprep for chloroplast and mitochondria isolation and DNA extraction from 500 mg of pericarp samples from Manzano chili (*Capsicum pubescens* R.& P.). Extraction efficiency from fresh fruit samples was 20 $\mu\text{g DNA g}^{-1}$ for chloroplasts and 33 $\mu\text{g DNA g}^{-1}$ for mitochondria. Isolation using the recommended miniprep resulted in costs reduction of 160x for chloroplast and up to 8x for mitochondria. PCR amplification of constitutive marker genes for chloroplast (*rbcL*, Rubisco large subunit) and mitochondria (*cox1*, Cytochrome oxidase) confirmed DNA identity and purity of each extraction.

Keywords: *Capsicum pubescens*, chloroplast DNA, mitochondria DNA, DNA extraction.

3.3. Introducción

El análisis de ADN de cloroplastos (cpADN) y mitocondrias (mtADN) proporciona información básica sobre la composición, función, coordinación y secuencia de la información genética ahí contenida (Kahlau *et al.*, 2006; Sugiura, 1992; Sorenzo *et al.*, 1999; Sugiyama *et al.* 2005). Sus secuencias conservadas debido al modo de herencia uniparental permiten determinar procesos de evolución mediante análisis filogenéticos (Chung *et al.*, 2003; Ryzhova y Kochieva, 2004; Ravi *et al.*, 2008; Jo *et al.*, 2011). No obstante, antes de analizar su ADN, es necesario separarlos del núcleo celular de manera confiable y repetible.

Existen numerosos reportes acerca del aislamiento y extracción de ADN para cloroplastos y mitocondrias (Douce *et al.*, 1987; Hájek *et al.*, 2004; Jansen *et al.*, 2005; Kahlau *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 2011; Millar *et al.*, 2001; Mourad y Polacco, 1988, Rahman y Huber, 1996; Rowan y Bendich, 2011; Salvi *et al.*, 2008; Triboush *et al.*, 1998). Las técnicas descritas priorizan la integridad estructural de los organelos aislados así como el contenido bajo de contaminantes. Ambas características aseguran la extracción de ADN de calidad.

Los protocolos de referencia presentan varias dificultades. La cantidad inicial recomendada de tejido vegetal fresco fluctúa desde decenas de gramos hasta kilogramos. Por ejemplo, Rahman y Huber (1996) usaron 100 g de pericarpio de fruto homogeneizado en 150 mL de amortiguador de extracción; Kahlau *et al.* (2006) usaron 50 g de hojas en 2 L del amortiguador de extracción; Shi *et al.* (2012) emplearon 20 g de hojas en 400 mL de amortiguador, similar a Vieira *et al.* (2014) quienes usaron 25 g de hojas en 400 mL de amortiguador de extracción.

Algunos protocolos han intentado reducir costos sin afectar la eficiencia mediante diferentes estrategias; por ejemplo, Mourad y Polacco (1989) usaron 10 g de hojas frescas en 10 volúmenes de amortiguador de extracción, mientras que O'Hara-Mays y Capwell (1993) y Triboush *et al.* (1998) usaron 5 g de tejido en 20 -

25 mL de amortiguador. Generalmente el tejido de la muestra es homogeneizado en licuadora. Hájek *et al.* (2004) señalan la intensidad y la duración como características críticas de la homogenización del tejido porque influyen en la eficiencia de ADN extraído. Particular cuidado debe de observarse en la calidad de los reactivos para la preparación de los amortiguadores de extracción, lavado, purificación y remoción de las membranas de los organelos. Dichos amortiguadores deben mantener la presión osmótica y el pH adecuados para conservar la integridad de los organelos mientras se liberan compuestos por la ruptura celular (Millar *et al.*, 2007).

El gradiente de concentraciones utilizado para la separación de organelos con base en su densidad representa otra dificultad. El gradiente se puede crear con sacarosa, percoll o cloruro de cesio, y puede requerir de ultracentrifugación para su formación (Millar *et al.*, 2007). Los gradientes más frecuentemente utilizados presentan limitantes; por ejemplo, la sacarosa puede entrar a la matriz de la mitocondria lo que dificulta la subsecuente interpretación de análisis proteómicos (Nikaido y Rosenberg, 1983; Benz, 1994), y el percoll puede ser difícil de remover en etapas posteriores de la metodología (Beavis y Vercesi, 1992; Yang y Mulligan, 1996).

En la actualidad, los protocolos más eficientes en el uso de amortiguadores aún emplean altas cantidades de reactivos, que elevan significativamente los costos al procesar centenares de muestras, por ejemplo al establecer relaciones genéticas entre individuos y entre poblaciones. Además, algunas metodologías requieren de ultracentrífugas para poder sedimentar los organelos dentro de los gradientes de percoll, cloruro de cesio u otros. Para solucionar el costo excesivo de separación de cloroplastos y mitocondrias para estudios a gran escala, en esta investigación se generó una microtécnica de extracción de ADN de cloroplastos (cpADN) y mitocondrias (mtADN) que permite procesar numerosas muestras de frutos de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) para reducir los volúmenes de reactivos y emplear equipos comunes en la extracción del ADN.

Referente al ADN total, se han desarrollado métodos de extracción a partir de los años 1950's; éstos incluyen la miniaturización de la técnica y requieren de la preparación de soluciones, por lo que la extracción puede tomar desde horas hasta más de un día. Debido a ello, también se han diseñado kit comerciales que al necesitar menor cantidad de pasos, disminuyen el tiempo de extracción, aumentan la eficiencia de procesamiento y a su vez permiten la obtención de cantidades y calidades, aunque con menor concentración de ADN que técnicas tradicionales, suficientes para análisis posteriores mediante marcadores moleculares como microsatélites u otros para la identificación de individuos, familias y poblaciones, entre ellas las de mapeo genético. Por lo tanto su uso tuvo como objetivo facilitar la extracción de ADN total en frutos de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) de dos líneas, sus híbridos (F₁ de cruce directa y recíproca) y su población segregante (F₂).

3.4. Materiales y métodos

3.2.1. Material vegetal

El material vegetal provino de dos líneas endogámicas de chile manzano (*C. pubescens* R. y P.) derivadas del híbrido Zongolica × Puebla (líneas 4 y 6), con 5 ciclos de autofecundación, las dos cruza F₁ de ambas líneas (cruzas directa y recíproca) y 90 plantas segregantes de la F₂ (45 plantas derivadas de cada cruza). Las plantas se sembraron en invernadero, y se manejaron conforme a lo señalado por Pérez y Castro (2008). En todos los casos los frutos muestreados para su análisis estaban en la etapa de inicio de maduración, que corresponde al inicio del cambio de color de verde a amarillo.

3.2.2. Aislamiento de cloroplastos

El protocolo propuesto por Kahlau *et al.* (2006), que parte de 50 g de tejido, se usó como referencia para las proporciones de los materiales empleados para extraer ADN del cloroplasto. El primer intento de miniaturización consistió en disminuir la cantidad de tejido a 5 g (triturado en licuadora), el amortiguador de extracción a 100 mL y el amortiguador de lavado a 20 mL. La reducción continuó disminuyendo a 2 g de tejido (triturado mediante batidora de inmersión), 20 mL de amortiguador de extracción y 10 mL de amortiguador de lavado. No obstante, se detectó contaminación en los cloroplastos obtenidos, por lo cual se incluyeron pasos adicionales de limpieza.

El protocolo modificado consistió de los siguientes pasos: los frutos recién cosechados se lavaron con jabón y se enjuagaron con agua destilada; una muestra de 500 mg del pericarpio se seccionó en segmentos no mayores a 5 mm que se depositaron junto con 3 balines con tamaño 3.2 cm cada uno, en tubos de 2 mL. Se agregó 1.0 mL de amortiguador de extracción frío (350 mM sorbitol, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 15 mM β ME y 0.1 % BSA) y el tejido se

homogenizó. Para triturar el tejido en este caso se utilizó un triturador Tissuelyzer (Retsch MM400™, Alemania) a 30 hertz por 3.5 min. El homogenizado se filtró a través de una tela de nailon de red densa. Los núcleos y restos celulares se precipitaron por centrifugación a 500 x *g* por 5 min a 4 °C. Se separó el sobrenadante y se repitió la precipitación. El sobrenadante se centrifugó una vez más a 2000 x *g* por 10 min a 4 °C para compactar los cloroplastos, y luego éste se descartó con cuidado para no romper la pastilla formada.

La pastilla de cloroplastos se lavó al suspenderla en 500 µL de amortiguador de lavado frío (350 mM sorbitol, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA y 0.1 % BSA). La suspensión se centrifugó a 2000 x *g* por 10 min a 4 °C. Después de cada centrifugación, el sobrenadante se descartó cuidadosamente y se repitió el lavado dos veces más. Después del triple lavado, la pastilla se disolvió en 500 µL de amortiguador de lavado frío.

Para purificar los cloroplastos, se vertieron 700 µL de una solución 1.08 M de sacarosa grado molecular en un tubo eppendorf de 2 mL. En la parte superior de la solución se vertió cuidadosamente la suspensión de cloroplastos. Con cuidado de no mezclar el contenido del tubo, se centrifugó a 2000 x *g* por 5 min a 4 °C. Al final de la centrifugación se formó una interfase entre las soluciones, misma que cuidadosamente fue extraída con una micropipeta. La interfase extraída se colocó en otro tubo y se agregaron 500 µL de amortiguador de lavado frío. La suspensión fue centrifugada a 2000 x *g* por 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se disolvió la pastilla en 300 µL de amortiguador de lavado.

En un tubo limpio se creó el gradiente de sacarosa para la purificación de los cloroplastos. Se prepararon soluciones de sacarosa a concentraciones de 1.75 y 1.08 M, disueltas en soluciones de 50 mM Tris-HCl pH 8.0 y 25 mM EDTA pH 8.0. Se vertieron 700 µL de la solución 1.75 M sacarosa y sobre esa solución se vertieron, cuidadosamente para evitar mezclar, 900 µL de la solución 1.08 M sacarosa. Los 300 µL de la suspensión de cloroplastos se agregaron sobre el

gradiente superior, con cuidado para no mezclar las soluciones. El tubo que contenía los gradientes y la suspensión de cloroplastos se centrifugó a 7000 x *g* por 1 hora a 4 °C. Los cloroplastos purificados se encontraron en la interfase de los gradientes compactados en la pared del tubo. Estos cloroplastos se colectaron con una micropipeta, y se colocaron en otro tubo, al cual se le adicionaron tres volúmenes de amortiguador de dilución frío (175 mM sorbitol, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA). Posteriormente, se centrifugó el tubo a 2000 x *g* por 10 min a 4 °C.

3.2.3. Aislamiento de mitocondrias

El protocolo propuesto por Rahman y Huber (1996) se utilizó como referencia para las proporciones de materiales en la purificación de mitocondrias. Al igual que en la extracción de cpADN, se disminuyó la cantidad de tejido y de reactivos, se adicionaron pasos de limpieza y otros pasos para la lisis de la membrana de la mitocondria, y la extracción y precipitación del mtADN. La microtécnica consistió en los siguientes pasos: los frutos recién cosechados se lavaron con jabón y se enjuagaron con agua destilada. De los frutos se tomaron 500 mg del pericarpio y se seccionaron en segmentos no mayores a 5 mm para ser depositados junto con 3 balines con tamaño 3.2 cm cada uno, en tubos eppendorf de 2 mL. Posteriormente se adicionó 1 mL de amortiguador de extracción frío (400 mM sacarosa, 50 mM Trizma base, 1 mM EDTA, 10 mM KH₂PO₄, 4 mM cisteína y 1 % BSA; pH 7.6), y el tejido se homogenizó en un triturador Tissuelyzer (Retcsch MM400, Alemania) a 30 hertz por 3.5 min.

El homogenizado se filtró a través de una tela de nylon de red densa. El filtrado se centrifugó a 500 x *g* por 10 min a 4 °C para precipitar núcleos y restos celulares remanentes. Se separó el sobrenadante, se centrifugó a 2000 x *g* por 10 min a 4 °C, y se repitió nuevamente la centrifugación con el nuevo sobrenadante. Para la obtención de mitocondrias, el sobrenadante se centrifugó a 16000 x *g*, y se descartó con cuidado de no romper la pastilla; ésta se lavó suspendiéndola en 500 µL de amortiguador de lavado frío (400 mM manitol, 10 mM KH₂PO₄ y 0.5 % BSA,

pH 7.2). La suspensión se centrifugó a 16000 x *g* por 10 min a 4 °C. Luego se removió y descartó el sobrenadante, y se repitió el lavado. La pastilla resultante fue resuspendida en 300 µL de amortiguador de lavado frío.

En un tubo limpio se creó el gradiente de sacarosa para la purificación de las mitocondrias. Se prepararon soluciones de sacarosa a concentraciones de 0.6 M y 1.8 M disueltas en solución de 50 mM Trizma base y 10 mM KH₂PO₄. En tubo eppendorf de 2 mL se vertieron primero 700 µL de la solución 1.8 M sacarosa y sobre esa solución se vertió 900 µL de la solución 0.6 M sacarosa, con todo cuidado para evitar mezclar las capas. Los 300 uL de la suspensión de mitocondrias se agregaron sobre el gradiente superior con cuidado de no mezclar las soluciones.

El tubo que contenía los gradientes y la suspensión de mitocondrias se centrifugó a 22,000 x *g* por 1 hora a 4 °C. Al término de la centrifugación las mitocondrias purificadas se ubicaron en la interfase de los gradientes, y se distinguieron por formar un anillo verde–amarillo. Estas mitocondrias se colectaron con una micropipeta y se transfirieron a otro tubo al cual se le adicionaron tres volúmenes de amortiguador de dilución frío (175 mM maniitol, 10 mM KH₂PO₄ sin BSA, pH 7.2). Posteriormente se centrifugó el tubo a 16,000 x *g* por 10 min a 4 °C.

3.2.4. Extracción de ADN de cloroplastos y mitocondrias

El método de extracción de ADN fue el mismo para cloroplastos y mitocondrias. La pastilla obtenida en el aislamiento respectivo se disolvió en 500 µL de amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 2 % N-lauroylsarcosine sodium salt), y se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente para desintegrar las membranas de los organelos. Posteriormente se añadió 1 mL de solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). La mezcla se agitó y centrifugó a 14,000 x *g* por 10 min a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante y se repitió la extracción nuevamente con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. El ADN se

precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. La mezcla se mantuvo a -20 °C durante la noche. Al día siguiente la mezcla se centrifugó a 14,000 x g por 10 min a 4 °C, para compactar el ADN precipitado. El etanol sobrenadante se eliminó por decantación. El etanol remanente se evaporó al ambiente por aproximadamente 1 h. La pastilla de ADN se diluyó en 30 µL de amortiguador 0.1 M TE (10 mM tris, pH 8.0 y 1 mM EDTA) por agitación y se dejó reposar por 1 h.

3.2.5. Extracción de ADN total

La extracción del ADN total se hizo con el kit comercial DNAzol® (Invitrogen™). El protocolo constó de los pasos siguientes: se pesaron 30 mg de tejido liofilizado y molido y se transfirieron con espátula a un tubo de 1.5 mL. Se agregaron 300 µL de DNAzol y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces. Posteriormente se incubó a 25 °C y se invirtió por 5 min. Se añadieron 300 µL de cloroformo y se agitó en vórtex. Nuevamente se incubó a 25 °C e invirtió por 5 min. Se centrifugó a 12,000 x g por 10 min para una mayor separación de las fases. Se transfirió la fase acuosa con pipeta (~100 µL), a un tubo nuevo y se agregaron 225 µL de etanol 100 % para precipitar el ADN. Se invirtió el tubo de 6 a 8 veces y se dejó reposar 5 min. Se centrifugó a 5000 g por 4 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 1:0.75 DNAzol-etanol 100% (171.43 µL DNAzol con 128.57 µL etanol 100 %), se agitó en vórtex, y se dejó reposar 5 min. Se centrifugó a 5000 g por 4 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 300 µL de etanol 75 % y se centrifugó a 5000 x g por 4 min para compactarla. Finalmente se decantó el etanol, se dejó secar y la pastilla se resuspendió en 70 µL de amortiguador 0.1 M TE.

3.2.6. Confirmación de integridad y contaminación cruzada

La integridad del ADN se determinó en gel de agarosa 0.8 %. De cada muestra se corrieron 6 µL en el gel, con las siguientes condiciones de corrida: 90 V y 400 mA por 90 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio a 10 % por 15 min.

Adicionalmente, la calidad se determinó por absorbancia en un Nanodrop (Thermo Scientific, Mod. 2000, USA).

El ADN extraído de cada fracción (cloroplasto o mitocondria) se sometió a PCR. Se diseñaron iniciadores de genes constitutivos basados en información del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), específicamente localizados en un organelo. Se escogieron 3 genes constitutivos: el primero de origen nuclear, el segundo de cloroplasto, y el tercer gen de mitocondria (Cuadro 1). Los iniciadores se basaron en la secuencia de codificación (Coding Sequence o CDS) con el programa Primer3 v.4 (<http://primer3.ut.ee/>) con los parámetros estándar. La mezcla de amplificación contenía 40 ng de ADN, amortiguador de PCR 1x, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's y 20 pM de cada iniciador. El programa del PCR fue 95 °C por 3 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 40 s, y 72 °C durante 10 min. Posteriormente, se corrieron 6 µL de cada producto de PCR en gel de agarosa a 1.2 %, a 90 V y 150 – 180 mA por 90 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio 10 % por 15 min. El tamaño de los productos del PCR se estimó con el programa LabWorks®.

Cuadro 3.1. Iniciadores de genes constitutivos de núcleo, cloroplasto y mitocondria.

Gen	Origen	Clave	Secuencia
Ubiquitina (<i>ubi</i>)	Nuclear	^a CaUBlf	CTGGAAAGCAGCTTGAGGAC
		^a CaUBlr	TGGCCTTAACGTTGTTCGATT
Rubisco subunidad grande (<i>rbcl</i>)	Cloroplasto	^a CaRBCLf	TCACGCTGGTACCGTAGTAGG
		^a CaRBCLr	CTCATTACCTTCCCGAGCAA
Citocromo oxidasa (<i>cox1</i>)	Mitocondria	^b SoCOX1f	TACCAGCCATTCTGGAGGAG
		^b SoCOX1r	CTGCCAGTACCGGAAGTGAT

Iniciador desarrollado a partir de la secuencia de ^a *Capsicum annum* y ^b *Solanum nigrum*.

3.5. Resultados y discusión

Los pasos en cada microtécnica incluyendo la formación de gradientes de sacarosa se escalaron a la baja de manera exitosa en tubos de 2 mL. Las modificaciones efectuadas a los protocolos de referencia para la extracción de cloroplastos y mitocondrias en mini-muestras no impidieron la obtención de ADN íntegro y de buena calidad. Los protocolos modificados siguieron los mismos pasos que la técnica normal; se requirió ruptura y homogeneización del material vegetal, separación por centrifugación diferencial, y un paso adicional fue la purificación en gradientes de sacarosa por centrifugación de densidad (Figura 3.1).

La cantidad promedio de ADN extraído de cloroplasto fue de 14.51 μg , con una proporción de absorbancias A_{260}/A_{280} promedio de 1.8 (Cuadro 3.2). En mitocondria la concentración obtenida de ADN fue de 19.44 μg y la proporción de absorbancias promedio fue de 1.75 (Cuadro 3.2). En ambos casos, cpADN y mtADN, la calidad fue apropiada, ya que según O'Hara-Mais y Capwell (1993) en cloroplastos y mitocondrias es aceptable entre valores de A_{260}/A_{280} de 1.65 a 1.85. Además, los geles de agarosa del ADN extraído de cloroplastos y mitocondrias mostraron bandas definidas sin barrido (Figura 3.2A).

El uso del kit comercial DNAzol para la extracción de ADN total condujo a la obtención de cantidades menores de ADN en comparación con las obtenidas con los protocolos propuestos para ADN de cloroplasto y de mitocondria, obteniendo en promedio 9.63 μg y una proporción A_{260}/A_{280} de 1.85 (Cuadro 3.2). Asimismo su eficiencia de extracción fue la más baja con un valor de 19.27 $\mu\text{g } \tau\text{ADN} \cdot \text{g}^{-1}$ tejido inicial liofilizado. En tanto la extracción de ADN mitocondrial (38.87 $\mu\text{g ADN} \cdot \text{g}^{-1}$ de tejido inicial) fue más eficiente en 9.85 $\mu\text{g ADN} \cdot \text{g}^{-1}$ de tejido inicial que la de cloroplastos (Cuadro 3.2).

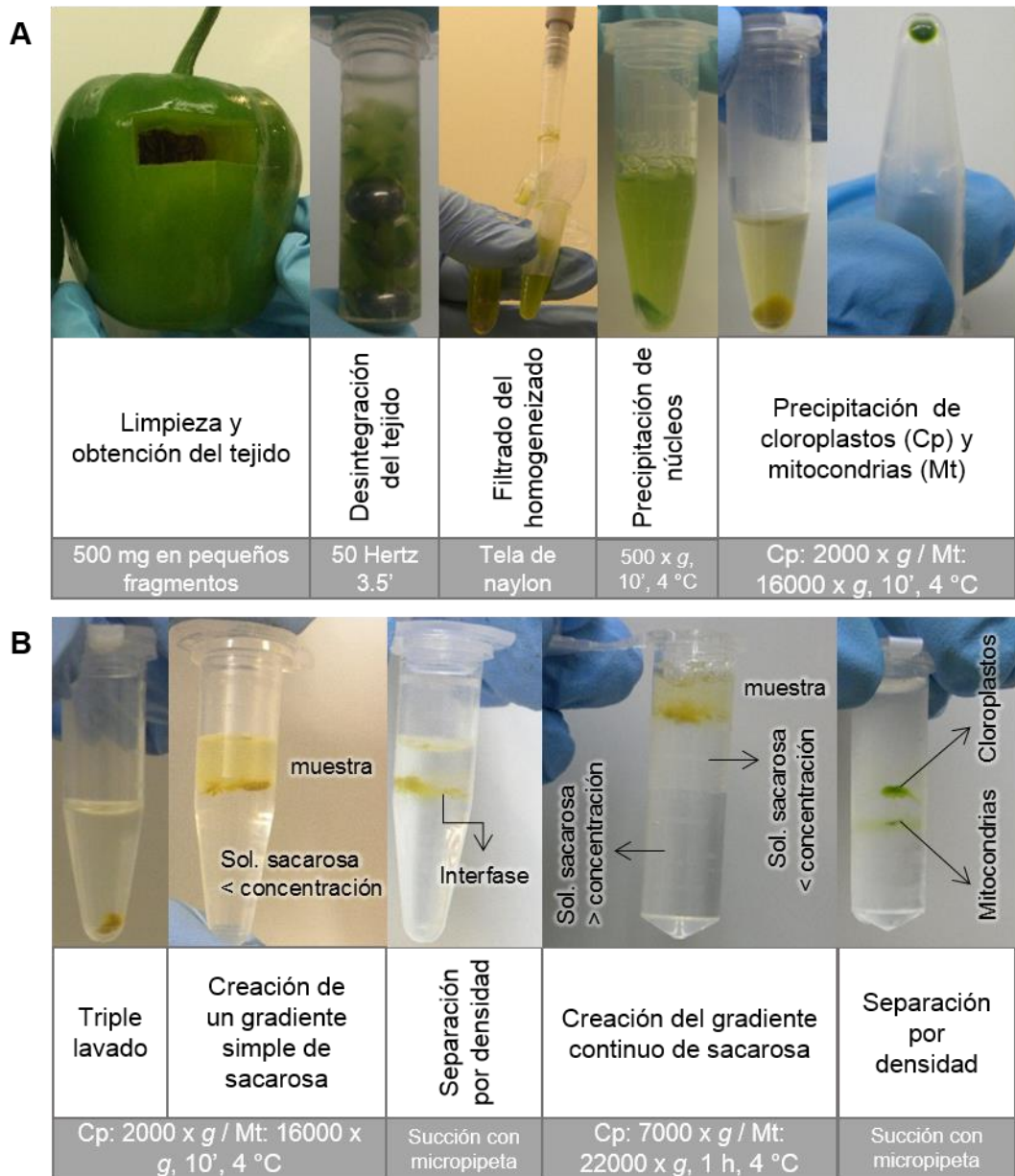


Figura 3.1. Aislamiento y purificación de cloroplastos y mitocondrias. A. Secuencia de aislamiento que muestra los procesos de obtención, desintegración, filtrado y precipitado, iniciando con núcleos y células remanentes, luego de cloroplastos y en último lugar mitocondrias, según corresponda. B. Secuencia de purificación iniciando con la limpieza del organelo, luego una pre-separación por densidad, rescate de la interfase y separación por densidad durante 1 h.

Cuadro 3.2. Concentración y calidad del ADN extraído de cloroplastos, mitocondrias y total a partir de 500 mg del pericarpio de frutos de chile manzano en inicio de maduración.

Organelo	Origen de Material Vegetal	Concentración de ADN total (μg)	$A_{260/280}$	Eficiencia ($\mu\text{g cpADN} \cdot \text{g}^{-1}$ tejido inicial fresco)	Dilución
Cloroplasto (protocolo generado)	Línea 4	9.09 ± 0.37	1.89 ± 0.02	21.22 ± 4.23	$30 \mu\text{L}$
	Línea 6	13.32 ± 5.72	1.73 ± 0.04		
	F ₁ : 4x6	11.24 ± 2.38	1.96 ± 0.09		
	F ₁ : 6x4	8.78 ± 4.03	1.79 ± 0.04	36.84 ± 8.78	$80 \mu\text{L}$
	F ₂ : 4x6	21.52 ± 6.70	1.72 ± 0.09		
	F ₂ : 6x4	15.32 ± 4.37	1.65 ± 0.05		
Mitocondria (protocolo generado)	Línea 4	15.36 ± 5.77	1.85 ± 0.09	33.38 ± 6.41	$30 \mu\text{L}$
	Línea 6	14.73 ± 2.97	1.72 ± 0.12		
	F ₁ : 4x6	15.19 ± 2.64	1.76 ± 0.14		
	F ₁ : 6x4	21.48 ± 4.87	1.69 ± 0.06	44.37 ± 4.40	$80 \mu\text{L}$
	F ₂ : 4x6	20.63 ± 4.06	1.72 ± 0.03		
	F ₂ : 6x4	23.74 ± 6.34	1.76 ± 0.06		
ADN total (Kit DNAzol)	Línea 4	12.86 ± 0.61	1.74 ± 0.03	23.73 ± 3.31	$300 \mu\text{L}$
	Línea 6	11.69 ± 1.33	1.93 ± 0.01		
	F ₁ : 4x6	13.30 ± 0.22	1.91 ± 0.04		
	F ₁ : 6x4	9.60 ± 0.97	1.92 ± 0.03	14.80 ± 0.93	$200 \mu\text{L}$
	F ₂ : 4x6	7.07 ± 1.52	1.78 ± 0.04		
	F ₂ : 6x4	7.73 ± 1.52	1.80 ± 0.05		

Los rendimientos obtenidos con las metodologías para cloroplasto y mitocondria aquí desarrolladas son mayores a los reportados por Mourad y Polacco (1988) en ADN de cloroplastos de maíz ($0.1\text{-}0.2 \mu\text{g ADN} \cdot \text{g}^{-1}$ de tejido) y a los obtenidos por Triboush *et al.* (1988) en girasol al extraer ADN de ambos organelos ($5\text{-}10 \mu\text{g ADN} \cdot \text{g}^{-1}$ de tejido). El protocolo en maíz emplea 1 kg de hojas mientras el de girasol lo hace con 5 y 10 g de hojas jóvenes, como cantidad inicial de material vegetal. Lo anterior indica que utilizar mayor material vegetal no

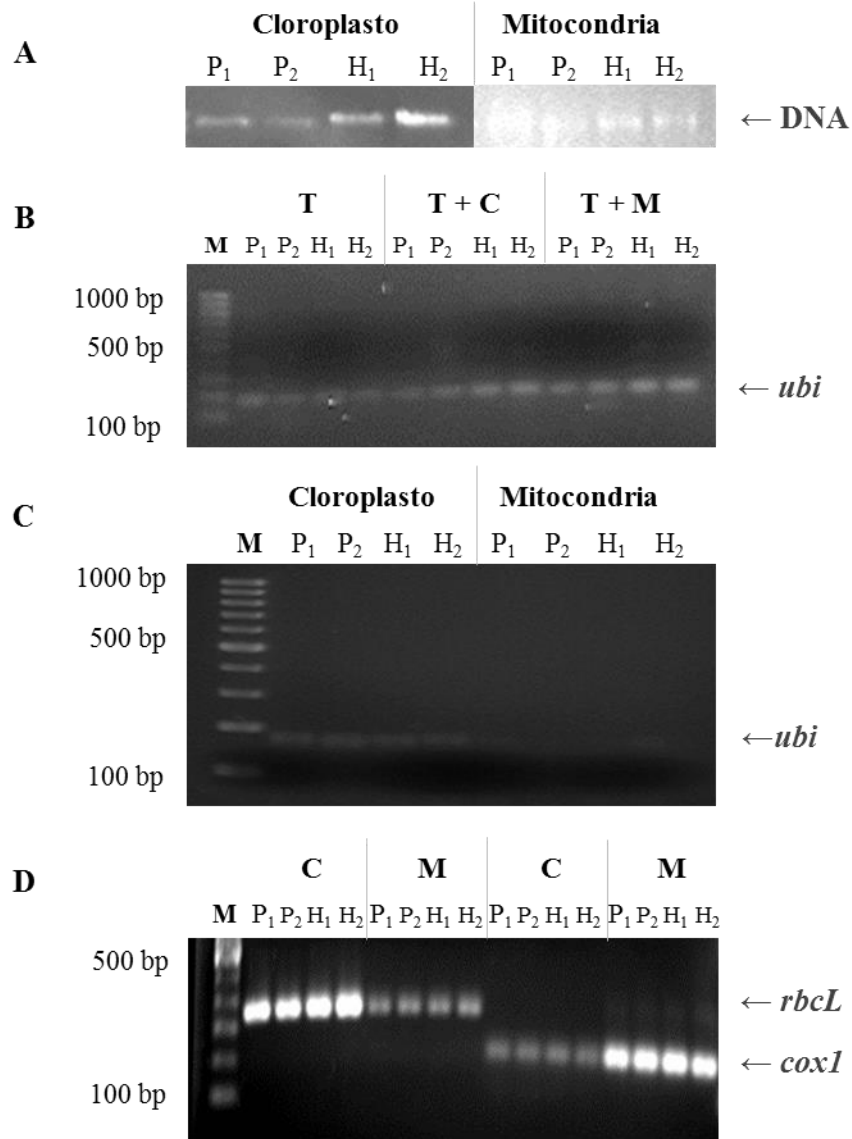


Figura 3.2. Verificación de la integridad y pureza del ADN extraído de cloroplastos y mitocondrias mediante genes constitutivos de núcleo, cloroplasto y mitocondria. A. Integridad del ADN, B. Contaminación de ADN dado por la amplificación del gen ubiquitina (*ubi*) constitutivo en núcleo en: T– ADN Total, T + C – ADN total combinando con ADN de cloroplasto, T + M – ADN total combinado con ADN de mitocondria. C. Prueba de contaminación cruzada debida a la presencia de *ubi* en ADN de cloroplastos y mitocondrias. D. Amplificación de los genes rubisco subunidad grande (*rbcL*) y citocromo oxidasa (*cox1*) constitutivos en cloroplasto y mitocondria, en ADN de cloroplasto (C) y mitocondria (M). P₁: línea endogámica 4, P₂: línea endogámica 6, H₁: Híbrido 4 × 6; H₂: Híbrido 6 × 4, M: marcador de peso molecular.

siempre proporcionará mejores rendimientos. Las cantidades de ADN obtenidas con los protocolos modificados cubren y sobrepasan con amplio margen las necesidades de ADN para cualquier análisis genético estándar por exigente que éste sea, con la calidad requerida.

En comparación con el protocolo de referencia, el protocolo miniaturizado para la extracción de cpADN emplea como muestra 1 % de tejido (500 mg de fruto fresco), 0.05 % de amortiguador de extracción, 0.13 % de amortiguador de lavado y 40 % de amortiguador de dilución. En el caso de la microtécnica para la extracción de mtADN, como muestra se utiliza 0.5 % de tejido, 0.66 % de amortiguador de extracción y 12.5 % de amortiguador de lavado.

La reducción en costos de reactivos al procesar 100 muestras es de hasta 160 veces para la microtécnica de extracción de ADN de cloroplastos, y de 8 veces al extraer ADN de mitocondrias (Cuadro 3).

Cuadro 3.3. Reducción en el uso de reactivos y costos totales al incrementar el número de muestras.

Organelo	Protocolo	Tejido (g)	Cantidad de amortiguador (mL)				Costo 100 muestras*
			Extracción	Lavado	Dilución	Lisis	
Cloroplasto	Referencia	50 g	2000	400	5	5	12965
	1ª reducción	5.0 g	100	20	5	1	1156
	2ª reducción	2.0 g	20	10	2	0.5	453
	Miniaturización	0.5 g	1	1	2	0.5	73
Mitocondria	Referencia	100 g	150	8	-	-	796
	1ª reducción	0.5 g	1	1	2	0.5	96

*Costo en dólares (1 \$ USD=15 pesos mexicanos, referencia 2015)

Se logró la amplificación de los iniciadores diseñados para la secuencia de genes constitutivos de núcleo, cloroplasto y mitocondria. Su uso en las extracciones de ADN respectivas permitió determinar que mediante los protocolos propuestos la contaminación de ADN de núcleo es reducida en cloroplastos e inexistente en mitocondrias (Figura 3.2B-C); sin embargo, la separación no es absoluta entre ADN de cloroplasto y de mitocondrias, ya que en ambos se amplificaron tanto *rbcL* como *cox1* (Figura 2D), genes de rubisco y citocromo oxidasa de cloroplastos y mitocondrias, respectivamente (Figura 3B). Este tipo de contaminación cruzada también la han reportado Bathgate *et al.* (1985), Diekmann *et al.* (2008), Gillman *et al.* (2007), Jo *et al.* (2011), Shi *et al.* (2012), y se atribuye a la plasticidad en el tamaño de los organelos que está determinada por procesos constantes de fusión y división, lo que impide su separación absoluta por tamaño durante la centrifugación diferencial, específica para cada protocolo.

3.6. CONCLUSIONES

Las microtécnicas generadas condujeron a la extracción de ADN de alta calidad (A_{260}/A_{280} entre 1.75 y 1.8) en cloroplasto y mitocondrias a partir de micro muestras de 0.5 g de fruto de chile manzano.

La amplificación de secuencias de genes constitutivos en cloroplasto y mitocondria comprobó la confiabilidad de la miniaturización como método de extracción de ADNs de herencia materna.

Las microtécnicas de extracción redujeron los costos por el procesamiento de las muestras, evitaron el uso de proteinasas, de percoll o CsCl que requieren de ultracentrífuga, y consiguieron la formación de gradientes sencillos como sacarosa.

Las extracciones de ADN total con el Kit DNazol redujeron el tiempo de extracción sin afectar la integridad y calidad del ADN y además facilitaron, por la preparación de pocas soluciones, la automatización del proceso.

3.7. Literatura citada

- Bathgate, B., M. E. Purton, D. Grierson, and P. W. Goodenough. 1985. Plastid changes during the conversion of chloroplasts to chromoplasts in ripening tomatoes. *Planta* 165:197-204.
- Beavis, A. D. and A. E. Vercesi. 1992. Anion uniport in plant mitochondria is mediated by a Mg⁽²⁺⁾-insensitive inner membrane anion channel. *The Journal of Biological Chemistry* 267:3079-3087.
- Benz, R. 1994. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: a review on mitochondrial porins. *Biochimica et Biophysica Acta* 291:167-196,
- Chung, S., D. S. Decker-Walters, and J. E. Staub. 2003. Genetic relationships within the Cucurbitaceae as assessed by consensus chloroplast simple sequence repeats (ccSSR) marker and sequence analyses. *Canadian Journal of Botany* 81:814-832,
- Diekmann, K., T. R. Hodkinson, E. Fricke, and S. Barth. 2008. An optimized chloroplast DNA extraction protocol for grasses (Poaceae) prove suitable for whole plastid genome sequencing and SNP detection. *PLOs ONE* 3:e2813,
- Douce, R., J. Bourgrignon, R. Brouquisse, and M. Neuburger. 1987. Isolation of plant mitochondria: general principles and criteria of integrity. *Methods in Enzymology* 148:403-415.
- Gillman, J. D., S. Bentolila, and M. R. Hanson. 2007. The petunia restorer of fertility protein is part of a large mitochondrial complex that interacts with transcripts of the CMS-associated locus. *The Plant Journal* 49:217-227,
- Hájek, T., D. Honys, and V. Capkova. 2004. New method of plant mitochondria: isolation and subfractionation for proteomic analyses. *Plant Science* 167:389-395.
- Jansen, R. K., L. A. Raubeson, J. L. Boorhae, C. W. de Pamphilis, T. W. Chumley, R. C. Haberle, S. K. Wyman, A. J. Alverson, R. Peery, S. J. Herman, H. M. Fourcade, J. V. Kuehl, J. R. McNeal, J. Leebens-Mack, and L. Cui. 2005. Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences. *Methods in Enzymology* 395:348-384,
- Jo, Y. D., J. Park, J. Kim, W. Song, C. Hur, Y. Lee, and B. Kang. 2011. Complete sequencing and comparative analyses of the pepper (*Capsicum annuum* L.) plastome revealed high frequency of tandem repeats and large insertion/deletions on pepper plastome. *Plant Cell Reports* 30:217-229,

- Kahlau, S.; S. Aspinall, J. C. Gray, and R. Bock. 2006. Sequence of the tomato chloroplast DNA and evolutionary comparison of solanaceous plastid genomes. *Journal of Molecular Evolution* 63:194-207.
- Lang, E. G. E., S. Mueller, S. Hoernstein, J. Porankiewicz-Asplund, M. Vervliet-Scheebaum, and R. Reski. 2011. Simultaneous isolation of pure and intact chloroplasts and mitochondria from moss as the basis for sub-cellular proteomics. *Plant Cell Reports* 30:205-215,
- Millar, A. H., L. J. Sweetlove, P. Giege, and C. J. Leaver. 2001. Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiology* 127:1711-1727.
- Millar, A. H., A. Liddell, and C. J. Leaver. 2007. Isolation and subfractionation of mitochondria from plants. *Methods in Cell Biology* 80:65-90.
- Mourad, G. and M. L. Polacco. 1988. Mini-preparation of highly purified chloroplast DNA from Maize. *Plant Molecular Biology Reporter* 6:193-199.
- Nikaido, H., E. Y. Rosenberg. 1983. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *Journal of Bacteriology* 153: 241-252.
- O'Hara-Mays, E. P. and J. C. Capwell. 1993. Miniprep for chloroplast DNA isolation. *Microchemical Journal* 47:245-250.
- Pérez G., M. y R. Castro B. 2008. El Chile Manzano. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 128 p.
- Rahman, A. S. and D. J. Huber. 1996. Isolation and physiological properties of intact mitochondria from bell pepper (*Capsicum annuum*) fruit. *Journal of Plant Physiology*, 149:677-682.
- Ravi, V., J. P. Khurana, A. K. Tyagi, and P. Khurana. 2008. An update of chloroplast genome. *Plant Systematics and Evolution* 271:101-122.
- Rowan, B. A. and A. J. Bendich. 2011. Isolation, quantification, and analysis of chloroplast DNA. *Methods in Molecular Biology* 774:151-170.
- Ryzhova, N. N. and E. Z. Kochieva. 2004. Analysis of microsatellite loci of the chloroplast genome in the genus *Capsicum* (Pepper). *Russian Journal of Genetics* 40:892-896.
- Salvi, D., N. Rolland, J. Joyard, and M. Ferro. 2008. Purification and proteomic analysis of chloroplasts and their sub-organellar compartments. *Methods in Molecular Biology* 432:19-36,
- Shi, C., N. Hu, H. Huang, J. Gao, Y.-J. Zhao, and L.-Z. Gao. 2012. An improved chloroplast DNA extraction procedure for whole plastid genome sequencing. *Plos One* 7:e31468.

- Sorenzo, N. J. Provan, and W. Powell, 1999. An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome* 42:158-161.
- Sugiura, M. 1992. The chloroplast genome. *Plant Molecular Biology* 19:149-168.
- Sugiyama, Y. Y. Watase, M. Nagase, N. Makita, S. Yagura, A. Hirai, and M. Sugiura, 2005. The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. *Molecular Genetics and Genomics* 272:603-615.
- Triboush, S. O. N. G. Danilenko, and O. G. Davidenko. 1998. A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower. *Plant Molecular Biology Reporter* 16:183-189.
- Vieira, L. N.; H. Faoro, H. P. Fraga, M. Rogalski, E. M. de Souza, F. de Oliveira, R. Onofre, and M. Guerra. 2014. An improved protocol for intact chloroplasts and cpDNA isolation in conifers. *PLoS ONE* 9:e84792.
- Yang, A. J. and R. M. Mulligan. 1996. Identification of a 4.5 S-like ribonucleo-protein in maize mitochondria. *Nucleic Acids Research* 24:3601-3606.

CAPÍTULO IV

CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES

4.1. Resumen

El picor es una característica distintiva del género *Capsicum* y se debe a los compuestos alcaloides llamados capsaicinoides, de los cuales se conocen 22. Los más representativos son capsaicina y dihidrocapsaina, que constituyen alrededor de 90 % del contenido de alcaloides que confieren el picor a los frutos. En Chile Manzano (*Capsicum pubescens* R. & P.) se ha reportado que dihidrocapsaicina es el capsaicinoide que se encuentra en mayor proporción, en contraste con la mayoría de especies de este género. Este trabajo tiene el propósito de caracterizar la composición de tres capsaicinoides (dihidro-, nordihidro-, y capsaicina), en una población segregante de Chile Manzano generada a partir de dos líneas endogámicas (F_5). De esta manera, en frutos de 76 días, de las líneas endogámicas L4 y L6, sus híbridos de cruce directa y recíproca y su F_2 (formada por 45 individuos derivados de la F_1 directa y 45 de la recíproca), se determinaron sus contenidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se encontró que las líneas progenitoras son contrastantes en picor, que generan heterosis positiva en la F_1 , en las que el alcaloide predominante es capsaicina, y que presentan segregación transgresiva y distribución normal en la F_2 para los contenidos de los tres principales capsaicinoides evaluados.

Palabras clave: Picor del fruto, segregación genética, heterosis.

CAPSAICINOID CONTENT

4.2. Abstract

Pungency is an inherent characteristic to the *Capsicum* genus, and its strength is determined by concentration changes in alkaloids called capsaicinoids. To this date, 22 capsaicinoids are known. The most prevalent are capsaicin and dihydrocapsaicin, which together account for 90 % of pungent alkaloid content in the fruit. In Manzano pepper (*Capsicum pubescens* R. & P.), dihydrocapsaicin has been reported as the most contributing capsaicinoid to pungency. This research characterized capsaicinoid content for dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, and capsaicin in a segregating population of Manzano pepper derived from two inbred lines (F₅). Seventy-six (76) day old fruits from each F₅ line, from their direct and reciprocal cross, and from the F₂-derived population (45 individuals from F₁ and 45 from reciprocal F₁) were sampled to quantify capsaicinoid content by high performance liquid chromatography (HPLC). Parental lines contrasted in pungency, and showed positive heterosis for F₁. Capsaicin contributed the most to pungency. F₂ populations had transgressive segregation and the evaluated capsaicinoids had a normal distribution

Key words: Pungency, genetic segregation, heterosis.

4.3. Introducción

Los capsaicinoides son alcaloides que en cantidades y combinaciones determinadas proporcionan el picor característico a una gama diversa de chiles. Su uso amplio en los ámbitos alimenticio, médico e industrial hace que su demanda aumente año tras año. Por ende, su biosíntesis y regulación continúan siendo objeto de estudio (Aza-González *et al.*, 2011; Blum *et al.*, 2003; Wang y Bosland, 2006; Suzuki e Iwai, 1984), ya que hasta el momento aún no se puede controlar la amplia variación en el grado de picor que existe entre especies y variedades, picor que también es influenciado por efectos ambientales, por la interacción genotipo por ambiente y por el nivel de desarrollo del fruto.

Particularmente en frutos de chile Manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) se conoce que la concentración de capsaicinoides disminuye en el periodo de 58 a 94 días de edad de la planta, lo cual coincide con el inicio de pigmentación del pericarpio y el tiempo óptimo de cosecha, y además que el picor en está regulado principalmente por genes de efectos dominantes más que por genes de efectos aditivos (Cruz-Pérez *et al.*, 2007).

Estudios recientes efectuados mediante métodos genotécnicos con diseños dialélicos en progenies de generaciones F₂ de cruzas directas y recíprocas, han mostrado que la variación en el contenido de capsaicinoides en algunos genotipos de chile Manzano puede explicarse por efectos maternos (EM) positivos o negativos, que alcanzan a representar hasta 45 % de la variabilidad en picor (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2010).

En este contexto, el propósito del presente estudio es confirmar la existencia de efectos maternos en el picor del chile Manzano, mediante cuantificación de los tres principales alcaloides responsables del picor (nordihidro-, dihidro-, capsaicina y capsaicinoides totales) con cromatografía de líquidos, en frutos con ~76 días de desarrollo de dos líneas endogámicas con cinco generaciones de autofecundación

y en sus cruzas F_1 directas y recíprocas, así como en las progenies segregantes F_2 de cada crusa.

4.4. Materiales y métodos

4.2.1. Formación y mantenimiento de las poblaciones de trabajo

Se seleccionaron dos líneas endogámicas de chile Manzano: las líneas 4 y 6, ambas con 5 ciclos de autofecundación y derivadas del híbrido Zongolica x Puebla. A partir de ellas se hicieron las cruzas directa y recíproca ($L_4 \times L_6$ y $L_6 \times L_4$), para dar lugar a dos híbridos F_1 . En etapa de floración los híbridos se autofecundaron y de los frutos de cada crusa se tomaron 50 semillas para formar la F_2 . La población final de cada F_2 se redujo a 45 plantas a causa de problemas fitosanitarios, principalmente mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*). Las plantas progenitoras, su F_1 y la F_2 se sembraron bajo invernadero. El manejo de las plantas se realizó con recomendaciones para producción comercial conforme a lo señalado por Perez y Castro (2008).

4.2.2. Análisis de capsaicinoides

El contenido de dihidro- nordihidro- y capsaicina, los tres principales capsaicinoides en chile Manzano, se determinó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), en frutos completos de tres plantas de cada material genético, todos cosechados a los 76 días de desarrollo contados a partir de la fecha de antesis de 25 o más flores por planta.

Se realizó limpieza poscosecha de los frutos mediante un lavado con agua corriente y jabón y un enjuague con agua destilada, efectuada posterior a su colecta. Cada fruto se fragmentó en rodajas cortadas longitudinalmente, que luego se depositaron en bolsas de plástico con orificios para optimizar su secado en un

liofilizador (Labconco®, Estados Unidos), equipo en el que se dejaron durante 3 días. Posteriormente cada fruto se molió hasta alcanzar la textura de polvo fino.

La extracción se hizo acorde con la metodología descrita por Collins *et al.* (1995), en 1 g de muestra liofilizada y 10 mL de acetonitrilo que se colocaron en baño maría durante 5 h a 60 °C, con inversión del contenido de la solución cada hora. El extracto resultante se filtró con un acrodisco de nailon (45 µm x 25 mm), y en seguida se inyectaron 20 µL en el HPLC.

La determinación en HPLC tuvo las condiciones de corrida siguientes: columna Hypersil ODS® (25 cm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvil de gradiente constituido por acetonitrilo-agua a razón 45:55, flujo de 1.5 mL min⁻¹ y duración de corrida de 20 min.

Los estándares de dihidro- y capsaicina se prepararon en acetonitrilo a concentraciones de 0.25, 0.5 y 1 g mL⁻¹; con ellos se elaboró la curva de calibración del cromatógrafo Agilent® modelo HP-1100 equipado con un detector UV. La nordihidrocapsaicina se calculó a partir del estándar de capsaicina.

Previo al análisis estadístico, las áreas de los picos correspondientes se transformaron mediante las ecuaciones propuestas por el método oficial de la AOAC (1998):

$$N = (P_n/P_s) \times (C_s/W_t) \times (10/0.98) \times 9300$$

$$C = (P_c/P_s) \times (C_s/W_t) \times (10/0.89) \times 16100$$

$$D = (P_d/P_s) \times (C_s/W_t) \times (10/0.93) \times 16100$$

Donde:

N = nordihidrocapsaicina (SHU); C = capsaicina (SHU); D = dihidrocapsaicina (SHU); P_n, P_c y P_d = área del pico para nodihidro-, capsaicina y dihidrocapsaicina,

respectivamente; Ps = área del pico del estándar correspondiente; Cs = concentración de la solución estándar (mg mL⁻¹); Wt = peso de la muestra (g).

En la conversión de unidades se consideró que 1 µg de capsaicinoides g⁻¹ de peso seco = 15 SHU (Wall y Bosland, 1998).

4.2.3. Heterosis

La heterosis con respecto al progenitor femenino se estimó con las medias de cada cruce o progenitor, según el caso, mediante la ecuación siguiente (Fehr, 1987):

$$\text{Heterosis (\%)} = \frac{\text{Híbrido} - \text{Progenitor}}{\text{Progenitor}} \times 100$$

4.2.4. Análisis estadístico

Los contenidos de nordihidro-, dihidro-, capsaicina y capsaicinoides totales de las líneas progenitoras y sus F₁ se analizaron conforme a un diseño completamente al azar, en donde el error de las repeticiones técnicas, aquellas inyectadas en tres ocasiones y que pertenecen a una misma muestra, se anidó dentro de las repeticiones de campo, equivalentes a tres frutos analizados por planta.

Los contenidos de capsaicinoides de los 90 individuos de la F₂ se sometieron a pruebas de normalidad mediante gráficas de la distribución de probabilidad normal y los histogramas de frecuencias. Para decretar normalidad se usó la prueba de Shapiro-Wilk, con la hipótesis nula (H₀) de que los datos en la población siguen una distribución normal.

Se usó el programa estadístico SAS V.9.0 para llevar a cabo un análisis de varianza en las líneas progenitoras y sus cruzas, y el análisis univariante para normalidad en la F_2 . La comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

4.5. Resultados y discusión

El análisis de los componentes del picor en los materiales de chile Manzano en estudio (líneas progenitoras, F_1 de cruce directa, F_1 de cruce recíproca, y progenies F_2) mostró que en todos los casos la capsaicina es el alcaloide de mayor proporción (54 a 68 %) en los frutos, seguida de dihidro- (22 a 37 %) y nordihidro- (6 a 14 %) (Figura 3.1A). El contenido total de estos alcaloides fue significativamente mayor ($p \leq 0.05$) en la línea endogámica 4 (L4) que en la línea 6 (L6), ambas derivadas del híbrido Zongolica \times Puebla, con un picor total medio de 18,996 SHU (Scoville heat units) en L6 y de 31,505 SHU en L4 (Figura 3.1B). Las diferencias estadísticas en las concentraciones de nordihidro-, capsaicina, dihidro- y totales se determinaron a partir de un valor de p igual a 0.0012, 0.0511, 0.0242 y 0.0125, respectivamente.

Los híbridos F_1 de las cruces directa y cruce recíproca fueron superiores a los genotipos progenitores en los contenidos de capsaicinoides. En ambas F_1 destacó el picor total medio de la cruce directa (4 \times 6) con 51,635 SHU, en comparación con la recíproca (6 \times 4) con 34,448 SHU. Tanto en los híbridos como en sus progenitores hubo tendencia similar a registrar diferencias estadísticas en las concentraciones de nordihidro- ($p = 0.0118$), capsaicina ($p = 0.0147$) y totales ($p = 0.0397$); la excepción fue dihidro- ($p = 0.8230$), en cuyo contenido no hubo diferencias entre las cruces en ambos sentidos (Figura 3.1C).

La heterosis (%) en los híbridos fue positiva, con valores más altos en la cruce recíproca para nordihidro-, dihidro- y totales. En el picor total, la heterosis fluctuó desde 64 % para la cruce directa (4 \times 6) hasta 81 % para la recíproca (6 \times 4), (Cuadro 3.1). Estos porcentajes explican el incremento en los capsaicinoides de

los híbridos con respecto a sus progenitores; sin embargo, conviene enfatizar que si bien la heterosis es mayor para el híbrido de cruce recíproca que para el de cruce directa, ello ocurrió en los componentes que aportan en menor proporción al picor y cuyos contenidos de capsaicinoides son menores (nordihidro-, capsaicina y totales) o iguales (dihidro-) al híbrido de cruce directa.

En concordancia con Sánchez-Sánchez *et al.* (2010), las diferencias significativas entre las F₁ en los tres principales capsaicinoides (nordihidro-, dihidro- y capsaicina), se asocian con efectos maternos los cuales pueden representar hasta 45 % de la variación en los genotipos respecto a su picor total. Su determinación se hizo en selecciones e híbridos de chile Manzano (5 poblaciones y 20 cruces) mediante un análisis dialélico con el Método I de Griffing. Esta investigación llevó a los citados autores a plantear que el picor de los frutos está influenciado significativamente por herencia de tipo materna y, en consecuencia, por la expresión de genes extranucleares y a la fecha es la única referencia publicada sobre el tema.

La heterosis positiva en el contenido de capsaicinoides en chile Manzano también ha sido reportada por Cruz-Pérez *et al.* (2007) y Zewdie y Bosland (2000), así como en híbridos de otras variedades de chile (*C. annuum* × *C. frutescens*) por Blum *et al.* (2003) y Ben-Chaim *et al.* (2006), estudios en los que sobresale la generación F₁ por contenidos más altos que el progenitor de mayor picor. En contraste, Martínez-Martínez *et al.* (2014) registró heterosis negativa en chiles nativos de Oaxaca.

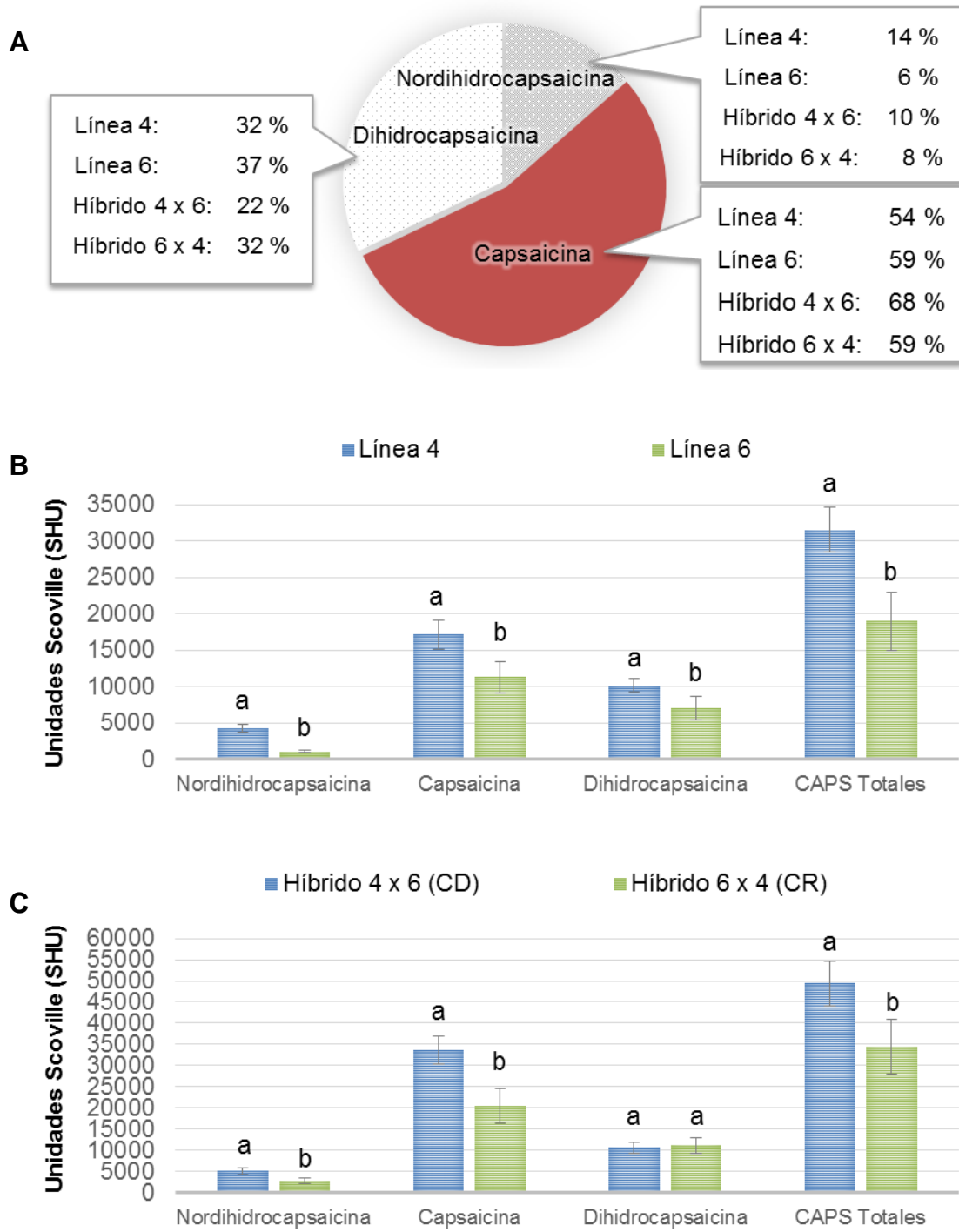


Figura 4.1. Contenido de capsaicinoides (CAPS) en las líneas L4 y L6 y sus F₁. A, Distribución porcentual en progenitores e híbridos con respecto al contenido total de CAPS; B, Contenido de CAPS en las líneas progenitoras; C, Contenido de CAPS en los híbridos F₁ de cruce directa (CD) y de cruce recíproca (CR).

Cuadro 4.1. Heterosis (%) del picor con respecto al progenitor femenino, Línea 4 o Línea 6, en los híbridos de cruce directa (CD) y de cruce recíproca (CR) de Chile Manzano.

Híbrido	Heterosis (%)			CAPS Totales
	Nordihidrocapsaicina	Capsaicina	Dihidrocapsaicina	
4 x 6 (CD)	25.1	105.1	10.5	63.9
6 x 4 (CR)	163.2	81.8	58.8	81.3

CAPS = capsaicinodes totales = nordihidrocapsaicina + capsaicina + dihidrocapsaicina.

En las F_2 los contenidos de capsaicinoides fluctuaron ampliamente entre los 90 individuos de la población, con tendencia hacia concentraciones mayores en relación con sus progenitores, de manera tal que mostraron segregación transgresiva, calificativo que describe la formación de individuos segregantes cuyos valores fenotípicos son menores o superiores respecto con sus fenotipos progenitores (De Vicente y Tanksley, 1993). Los contenidos mínimo y máximo en nordihidro- fueron de 1,041 y 8,367 SHU (Figura 3.2A), en capsaicina de 3,371 y 30,971 SHU (Figura 3.3A), en dihidro- de 2,918 y 20,051 SHU (Figura 3.4A), y en totales de 2,978 y 52,565 SHU (Figura 3.5 A), respectivamente.

De las curvas de distribución de frecuencias obtenidas para cada tipo de capsaicinide evaluado y de su total (Figuras 3.2B, 3.3B, 3.4B y 3.5B), se infiere que las frecuencias del picor en los individuos F_2 siguen una distribución normal por sus formas de campana de Gauss, lo que se confirmó mediante la prueba de Shapiro-Wilk con $p > 0.05$ (Figuras 3.2C, 3.3C, 3.4C y 3.5C).

Son escasos los estudios que describen la distribución de los capsaicinoides en individuos de la F_2 u otras poblaciones de mapeo, como por ejemplo familias y líneas endogámicas recombinantes (RILs). Al respecto, Blum *et al.* (2003), Ben-

Chaim *et al.* (2006), Ribeiro y Da Costa (1990) y Yarnes *et al.* (2014) en poblaciones F_2 , de familias F_3 y RILs, respectivamente encontraron que hubo segregación transgresiva en el picor, tal como aquí se detectó en la F_2 ; sin embargo, no se muestran los resultados para todos los alcaloides. Acorde con Yarnes *et al.* (2014), el contenido de capsaicina en la mayoría de las líneas se distribuyó entre las concentraciones de los progenitores y pocos las excedieron. A diferencia, en nuestra F_2 los contenidos se agruparon en su mayoría hacia los extremos, particularmente hacia mayor concentración.

Los resultados de los análisis de capsaicinoides indican que el fruto de chile Manzano posee mayor contenido de capsaicina que de dihidrocapsaicina, resultado que contrasta con los reportados previamente para esta especie por Cruz-Pérez *et al.* (2007) y Sánchez-Sánchez *et al.* (2010) aun cuando estos autores emplearon metodologías similares de extracción y cuantificación. No obstante, convergen ambos hallazgos en la investigación de Zewdie y Bosland (2001), quienes con un diseño dialélico en líneas de *C. pubescens* con alto y bajo contenido de picor, encontraron que en la mayoría de los materiales dihidrocapsaicina fue el principal alcaloide, aunque en 20 % de los progenitores y en 30 % de sus cruzas F_1 , registraron mayor concentración de capsaicina.

Lo anterior indica variabilidad genética en la acumulación de estos dos capsaicinoides análogos que son los principales componentes del picor en chile Manzano y en general en chile. Bosland (1993) señala que son las diferentes combinaciones las que caracterizan la diversidad del picor en las variedades de chile. En chile Jalapeño, Topuz *et al.* (2011) afirman que es la dihidrocapsaicina el alcaloide de mayor concentración y representa 43 % del total de capsaicinoides, en tanto que el porcentaje para capsaicina fue de 39 %, en nordihidro- de 10 %, en homodihidro- de 4 % y en isodihidro- de 4 %. De acuerdo con estos autores, es importante indicar la variación significativa en el contenido de picor (18,000-34,000 SHU) debida al método de secado del fruto.

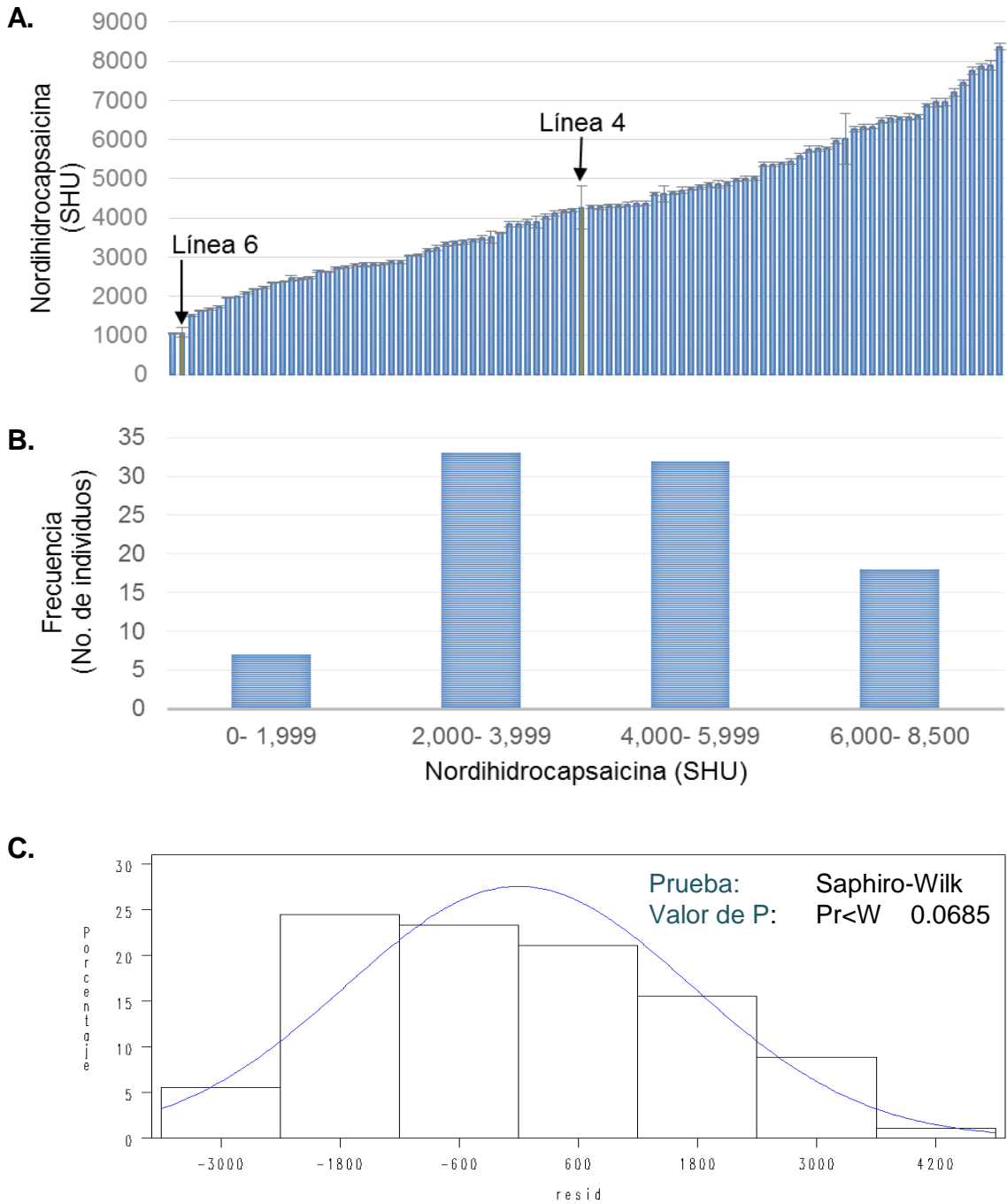


Figura 4.2. Contenido y análisis de nordihidrocapsaicina (NOR) en la F₂. A. Segregación de 90 individuos de la F₂, incluye las líneas progenitoras L4 y L6; B. Escala de frecuencia que agrupa los individuos de la F₂ por sus contenidos de NOR; C. Histograma de distribución normal del contenido de NOR.

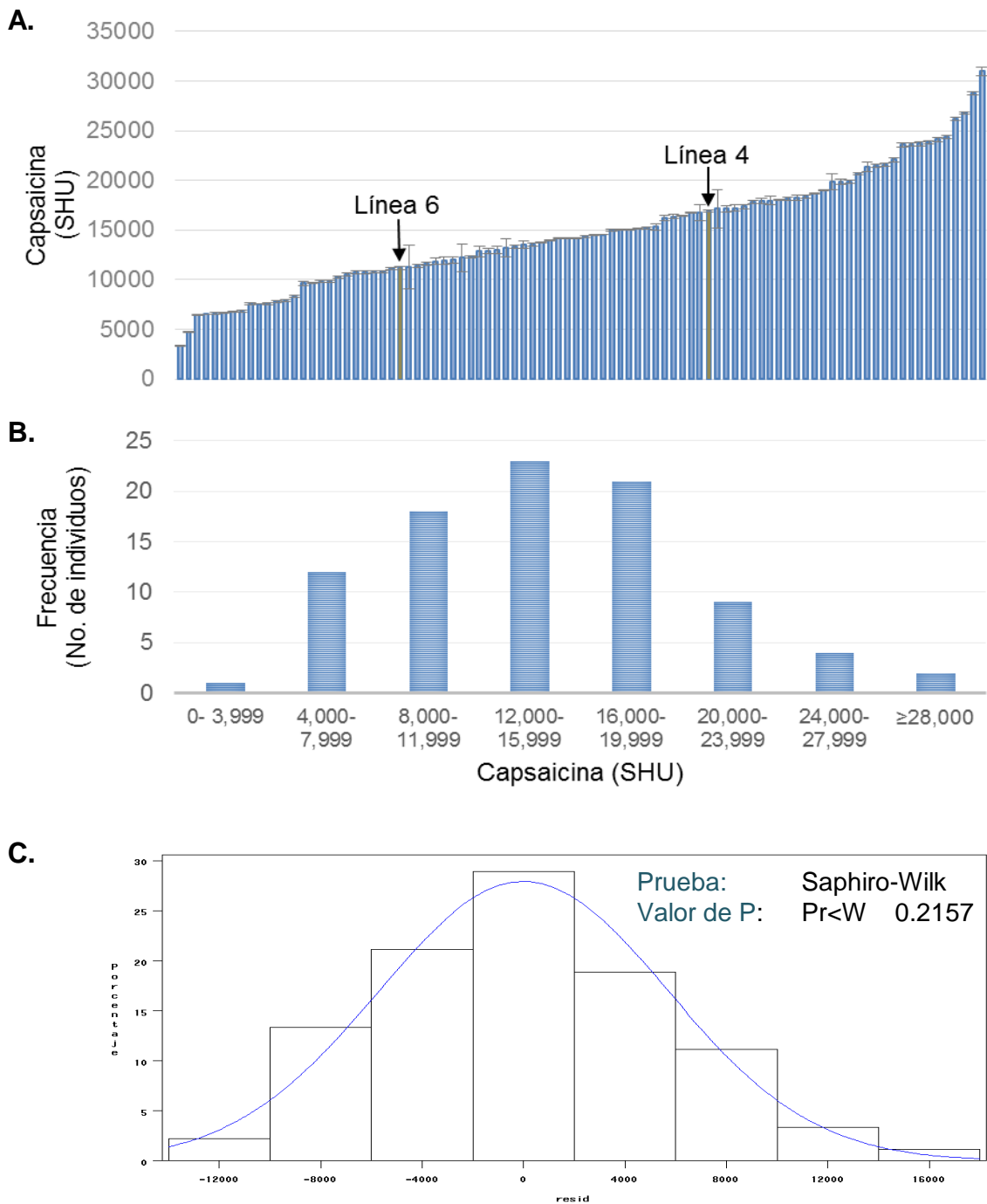


Figura 4.3. Contenido y análisis de capsaicina (CAP) en la F₂. A. Segregación de 90 individuos de la F₂, incluye las líneas progenitoras L4 y L6; B. Escala de frecuencia que agrupa los individuos de la F₂ por sus contenidos de CAP; C. Histograma de distribución normal del contenido de CAP.

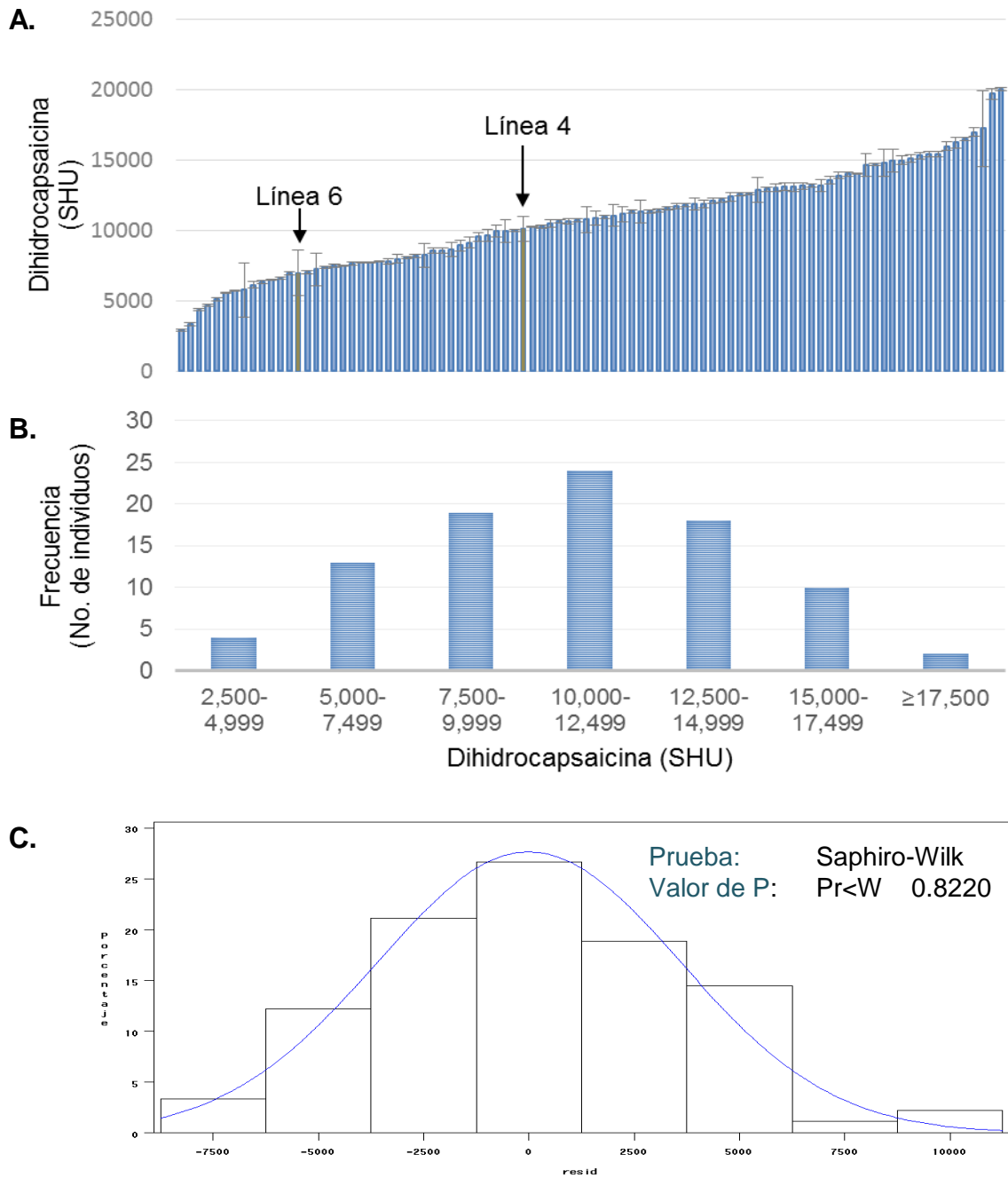


Figura 4.4. Contenido y análisis de dihidrocapsaicina (DICAP) en la F_2 . A. Segregación de 90 individuos de la F_2 , incluye las líneas progenitoras L4 y L6; B. Escala de frecuencia que agrupa los individuos de la F_2 por sus contenidos de DICAP; C. Histograma de distribución normal del contenido de DICAP.

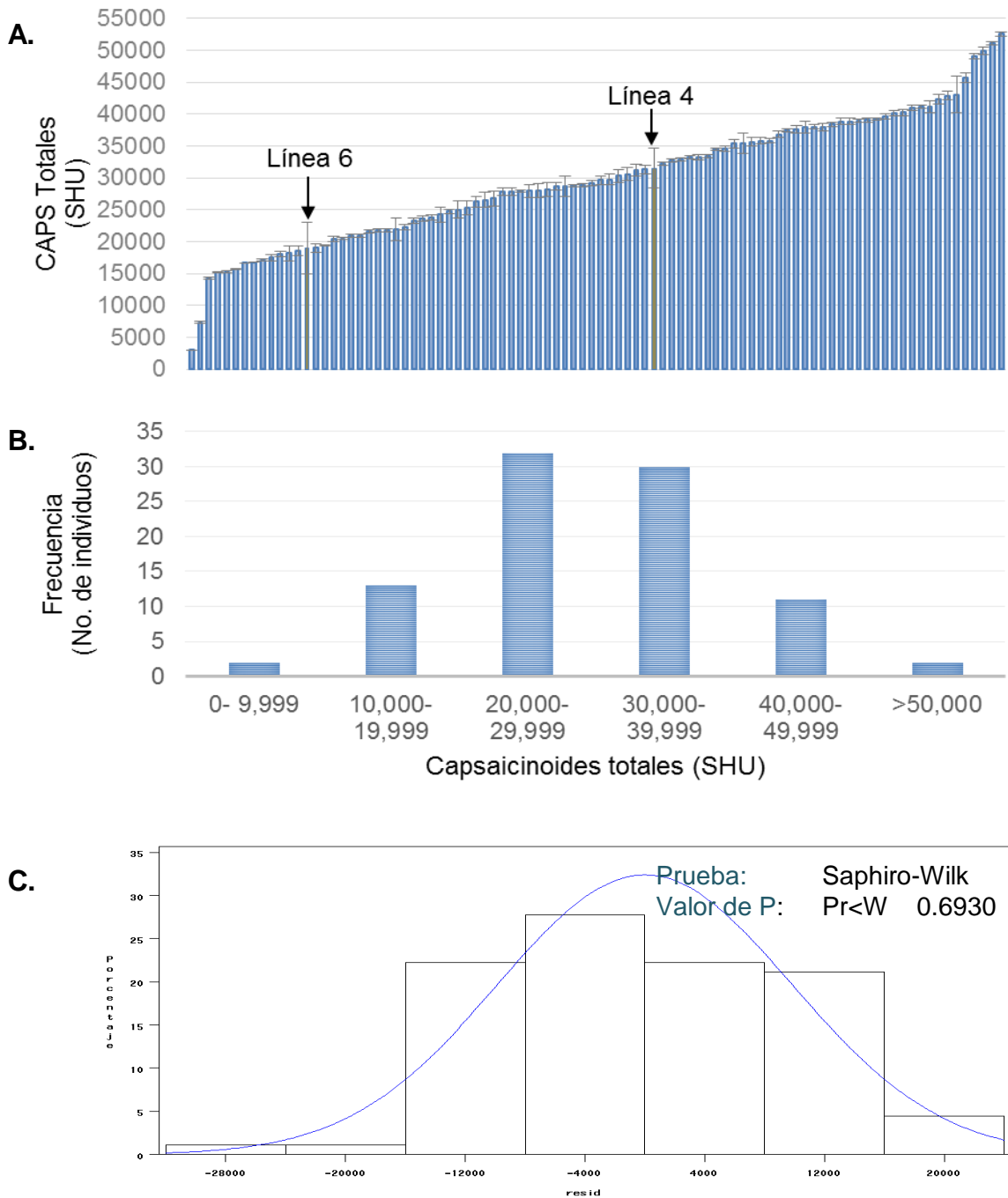


Figura 4.5. Contenido y análisis de capsaicinoides totales (CAPS) en la F₂. A. Segregación de 90 individuos de la F₂, incluye las líneas progenitoras L4 y L6; B. Escala de frecuencia que agrupa los individuos de la F₂ por sus contenidos de CAPS; C. Histograma de distribución normal del contenido de CAPS.

Según Cruz-Pérez *et al.* (2007) y Sánchez-Sánchez *et al.* (2010), las proporciones de esos compuestos se encuentran entre 5 y 10 % para nordihidro-, la cual presenta poco incremento en comparación con los porcentajes aquí obtenidos, entre 30 y 60 % para capsaicina, y entre 50 y 60 % para dihidro-, con respecto al contenido total de capsaicinoides. En diversos chiles, sin incluir Manzano, Giuffrida *et al.* (2013) registraron que capsaicina varía entre 50 % y 83 % del total de capsaicinoides, dihidro- entre 14 % y 39 %, y en su conjunto son responsables del 89 al 98 % del picor.

Las diferentes concentraciones de los alcaloides implicaron contenidos que van desde 17,642 SHU en chile Serrano y chile Tabasco, a 867,189 SHU en chile Habanero. En cruza interespecíficas entre *C. annum* × *C. frutescens*, capsaicina fue también el alcaloide en mayor abundancia, con proporciones que alcanzan 64 % del total de capsaicinoides (Ben-Chaim *et al.*, 2006), similar al porcentaje aquí obtenido para chile Manzano. Estos investigadores sugieren que existen genes específicos para la acumulación de cada componente del picor a causa de la estabilidad de la proporciones en un rango amplio de chiles domesticados. También afirman que incluir el pericarpio al extraer el picor en frutos completos, diluye los capsaicinoides sintetizados por la placenta y ocasiona que exista correlación negativa moderadamente significativa entre el peso del fruto y la acumulación de estos compuestos, variables que por sí solas son independientes.

Desde el año 2013, el récord mundial referente a la variedad con el picor más alto pertenece al chile Carolina Reaper cuyo origen procede de la cruza entre Ghost Chili y Red Habanero. Este chile, cultivado en Carolina del Sur, EE.UU., tiene en promedio 1,569,300 SHU y llega a alcanzar 2.2 millones de SHU (Guinness World Records, 2014), similar al picor que contiene el gas lacrimógeno con 2 millones SHU.

En las poblaciones Zongolica y Huatusco y sus híbridos de cruce directa y recíproca se han registrado contenidos de capsaicinoides totales de 23,591, 17,270, 36,712 y 13,572 SHU, respectivamente (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2010), valores similares a los obtenidos en los progenitores e híbridos de este estudio. Es importante destacar estos datos, ya que fue a partir de la F₂ del híbrido de Zongolica x Huatusco que se originaron las líneas endogámicas usadas como materiales progenitores en esta investigación. Además, las poblaciones mencionadas, Zongolica y Huatusco, formaron parte en los primeros trabajos sobre caracterización y mejoramiento genético de chile Manzano en México (Pérez-Grajales *et al.*, 2004; Pérez-Grajales *et al.*, 2009).

En la presente investigación el contenido diferencial de capsaicinoides en las F₁ muestra la importancia en la elección del progenitor femenino con el propósito de encaminar la obtención de genotipos hacia una mayor o menor concentración en estos compuestos, y confirma hallazgos en trabajos previos sobre efectos significativos en herencia materna para los tres alcaloides en esta especie (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2010). Además, el conocimiento genotécnico que se ha generado en esta especie en relación con heterosis y aptitud combinatoria ha impulsado los programas de mejoramiento para la generación de líneas, como las evaluadas, y variedades con características estables y definidas, cuya variación puede seguirse explotando con éxito con la generación de híbridos que expresen efectos maternos en capsaicinoides cuyos contenidos puedan ser fijados más adelante en poblaciones segregantes y continuar derivando líneas dirigidas a usos específicos.

4.6. Conclusiones

En las líneas progenitoras de Chile Manzano así como sus F_1 y su población segregante F_2 , capsaicina se encuentra en mayor concentración en comparación con dihidrocapsaicina.

Las líneas endogámicas (Línea 4 y Línea 6) son estadísticamente diferentes para los contenidos de nordihidro-, dihidro-, capsainina y capsaicinoides totales, con lo cual se determina que estos genotipos son contrastantes en picor.

Existe heterosis para el picor en la F_1 , y la variación en capsaicinoides totales dependerá del componente de picor (nordihidro-, dihidro-, y capsainina) en que esta variable tenga mayor influencia.

Existen diferencias significativas en el grado de picor entre las cruces directa (Línea 4 × Línea 6) y recíproca (Línea 6 × Línea 4) en cuanto a las concentraciones de nordihidrocapsaicina y capsainina, atribuibles a efectos maternos.

La segregación en los contenidos de capsaicinoides en la población segregante F_2 sigue una distribución normal.

4.7. Lieratura citada

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists International). 1998. Capsaicinoids in capsicum and their extractives. Liquid chromatographic method. Official Methods of Analysis of AOAC International. 2(43): 13–15.
- Aza-González, C., H. G. Núñez-Paleniús, N. Ochoa-Alejo. 2011. Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). Plant Cell Reports 30:695-706.
- Ben-Chaim, A., Y. Borovsky, M. Falise, M. Mazourek, B. C. Kang, I. Paran, and M. Jahn. 2006. QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. Theoretical and Applied Genetics 113:1481-1490.
- Blum E., M. Mazourek, M. O'Connell, J. Curry, T. Thorup, K. Liu, M. Jahn and I. Paran. 2003. Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. Theoretical and Applied Genetics 108:79-86.
- Bosland, P. W., 1993. Breeding for quality in *Capsicum*. Capsicum & Eggplant Newsletter 12: 25-31.
- Collins, M. D., L. Mayer-Wasmund, and P. W. Bosland 1995. Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using high-performance liquid chromatography. HortScience 30:137-139.
- Cruz-Pérez, A. B., V. A. González-Hernández, R. M. Soto-Hernández, M. A. Gutiérrez-Espinosa, A. A. Gardea-Béjar, y M. Pérez-Grajales. 2007. Capsaicinoides, vitamina C y heterosis durante el desarrollo del fruto de chile manzano. Agrociencia 41:627-635.
- De Vicente M.-C. and S.-D. Tanksley 1993. QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. Genetics 134:585-596.
- Fehr, W. R. 1987. Principles of Cultivar Development. Vol. 1. Theory and Technique. Macmillan Publishing Company. New York. 536 p.
- Giuffrida D., P. Dugo, G. Torre, C. Bignardi, A. Cavazza, C. Corradini, and G. Dugo. 2013. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. Food Chemistry 140:794-802.
- Guinness World Records. 2014. Hottest Chili:
<http://www.guinnessworldrecords.com/world-records/hottest-chili>
Fecha de consulta: Abril, 2015
- Martínez-Martínez, R., I. Méndez-Infante, H. M. Castañeda-Aldaz, A. M. Vera-Guzmán, J. L. Chávez-Servia y J. C. Carrillo-Rodríguez. 2014. Heterosis

- interpoblacional en agromorfología y capsaicinoides de chiles nativos de Oaxaca. *Revista Fitotecnia Mexicana* 37:199-207.
- Pérez G., M. y R. Castro B. 2008. El chile manzano. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 128 p.
- Pérez-Grajales, M., V. A. González-Hernández, M. C. Mendoza-Castillo and C. Peña-Valdivia. 2004. Physiological characterization of Manzano hot pepper (*Capsicum pubescens* R & P) landraces. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 129:88-92.
- Pérez-Grajales, M., V. A. González-Hernández, A. Peña-Lomelí and J. Sahagún-Castellanos. 2009. Combining ability and heterosis for fruit yield and quality in Manzano hot pepper (*Capsicum pubescens* R & P) landraces. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15:47-55.
- Ribeiro, A. and C. P. Da Costa. 1990. Inheritance of pungency in *Capsicum chinense* Jacq. (Solanaceae). *Brazilian Journal of Genetics* 13:815-823.
- Sánchez-Sánchez, H., V. A. González-Hernández, A. B. Cruz-Pérez, M. Pérez-Grajales, M. A. Gutiérrez-Espinosa, A. A. Gardea-Béjar y M. A. Gómez-Lim. 2010. Herencia de capsaicinoides en chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.). *Agrociencia* 44: 655-665.
- Suzuki, T and K. Iwai. 1984 Constituents of red pepper species: chemistry, biochemistry, pharmacology and food sciences of the pungent principle of *Capsicum* species. *The Alkaloids* 61: 227-299.
- Topuz, A., C. Dincer, K. S. Özdemir, H. Feng, and M. Kushad. 2011. Influence of different drying methods on carotenoids and capsaicinoids of paprika (Cv., Jalapeno). *Food Chemistry* 129:860-865.
- Wall, M. M. and P. W. Bosland. 1998. Analytical methods for color and pungency of chiles (*Capsicum*). In: *Instrumental methods in Food and Beverage Analysis*. Wetzels D. and G. Charalambous Editors. Elsevier, Amsterdam, Holanda. Pp: 366.
- Wang, D. and P. W. Bosland, 2006. The genes of *Capsicum*. *HortScience* 41: 1169-1187.
- Yarnes, S. C., H. Ashrafi, S. Reyes-Chin-Wo, T. A. Hill, K. M. Stoffel, and A. V. Deynze. 2013. Identification of QTLs for capsaicinoids, fruit quality, and plant architecture-related traits in an interspecific *Capsicum* RIL population. *Genome* 56:61-74.

- Zewdie, Y. and P. W. Bosland. 2000. Evaluation of genotype, environment and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. *Euphytica* 111: 185-190.
- Zewdie, Y. and P. W. Bosland. 2001. Combining Ability and Heterosis for Capsaicinoids in *Capsicum pubescens* Hortscience 36:1315-1317.

CAPÍTULO V

HERENCIA DEL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES EN CHILE MANZANO

5.1. Resumen

En *Capsicum* spp. la asociación significativa de sus contenidos de capsaicinoides con marcadores moleculares en poblaciones segregantes ha permitido establecer regiones génicas que influyen en la variación del picor, aunque éste también es afectado por la interacción con el ambiente y por la etapa de desarrollo del fruto. En Chile Manzano (*Capsicum pubescens* R. & P.) se ha evidenciado mediante métodos genotécnicos la presencia de efectos maternos en el picor al comparar híbridos de cruza directa vs. cruza recíproca hechas entre los mismos progenitores, lo que se atribuye a genes extranucleares de mitocondria o cloroplasto. El objetivo de este trabajo es relacionar regiones de ADN proveniente de núcleo, cloroplasto y mitocondria, con los contenidos de los principales capsaicinoides en frutos de una población segregante F₂ derivada de dos líneas endogámicas F₅ contrastantes en picor. Se encontró un bajo polimorfismo genético entre los progenitores, atribuible a su alto parentesco por ser líneas hermanas. Los marcadores microsatélites de núcleo Hpms1-173 y EPMS_472 se asociaron significativamente ($P \leq 0.05$) con los contenidos de capsaicinoides, donde el primero explicó la variación en capsaicina y picor total en 14 y 8 % (R^2), respectivamente, en tanto que EPMS_472 se relacionó con la variación en todos los componentes del picor evaluados y la explicó en 20, 20, 18 y 21 % (R^2) para nordihidro-, dihidro-, capsaicina y capsaicinoides totales. En cloroplasto también se encontró un marcador (NTCP4) asociado significativamente con la concentración de dihidrocapsaicina ($R^2=0.116$), que implica una correlación de 34 %. Este resultado permite comprobar la herencia materna a nivel molecular, que es algo inferior al promedio de 52 % detectado con métodos genotécnicos, para este mismo alcaloide, en 10 cruza directa y 10 recíprocas derivadas de 5 progenitores. En mitocondria no se detectó polimorfismo con los marcadores seleccionados.

Palabras clave: Herencia materna, marcadores microsatélites del picor, polimorfismo genético.

INHERITANCE OF THE CAPSAICINOID CONTENT IN MANZANO PEPPER

5.2. Abstract

In *Capsicum* spp. significant association of capsaicinoid content with molecular markers has found genomic regions that modify pungency, aside from the environmental effect and developmental stage. Conventional genetic approaches have proved maternal effects for pungency using *Capsicum annum* direct and reciprocal crosses. Results point to genes located in the mitochondria or chloroplast. This work researched association of DNA regions in the nuclei, chloroplast and mitochondria with capsaicinoid content in fruits from a segregating F_2 population derived from two F_5 -inbred lines; the lines contrasted in pungency. A low genomic polymorphism was found between parental lines, probably due to being sister lines. Nuclei microsatellites markers, Hpms1-173 and EPMS_472, associated significantly ($P \leq 0.05$) with capsaicinoid content; the first marker correlates with capsaicin content and total pungency by 14 and 8 % (R^2), respectively. EPMS_472 presence explained content variation of nordihydrocapsaicin, dihydrocapsaicin, capsaicin and total pungency by 20, 20, 18 and 21 % (R^2). NTCP4 marker located to the chloroplast, associated to dihydrocapsaicin ($R^2=0.116$), and implies 34 % correlation. These results corroborate maternal inheritance at the molecular level, even though maternal effects in this research are lower than the 52 % detected with conventional genetics methods for the same alkaloid. No mitochondria polymorphism was detected with the selected markers.

Key words: Maternal inheritance, pungency microsatellite markers, genetic polymorphism.

5.3. Introducción

El picor es una característica compleja, distintiva del género *Capsicum*. Está influenciada tanto por aspectos genéticos, ambientales, la interacción del genotipo por el ambiente y por la etapa de desarrollo del fruto (Estrada *et al.*, 1997; Gurung *et al.*, 2011; Zewdie y Bosland, 2000). Su presencia es controlada por el gen mayor *Pun1*, de herencia génica dominante, que codifica para la transferasa acil conocida como AT3 (Blum *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2013; Stewart *et al.*, 2005). Deleciones en su región promotora de 2.5 kb ocasiona que no se transcriba ni se traduzca la proteína en *C. annuum* (Stewart *et al.*, 2005) ó en su primer exón de 4 pb, crea un codón prematuro de finalización en *C. chinense* (Stewart *et al.*, 2007), ó en el extremo 3', la pérdida de 70 aminoácidos en su proteína en *C. frutescens* (Stellari *et al.*, 2010). Otros genes menores como también regiones genéticas asociadas con esta característica son de herencia cuantitativa (Garcés-Claver *et al.*, 2007).

Trabajos en este sentido describen regiones de ADN con asociación significativa con la expresión del picor a las cuales es atribuida su variación. Los estudios de este tipo requieren la evaluación de la segregación genotípica en poblaciones de mapeo para la identificación de QTL's (Loci de la característica cuantitativa por sus siglas en inglés), y posteriormente de su ubicación cromosómica, que se consigue a través de marcadores moleculares polimórficos y la construcción de mapas de ligamiento (Collard *et al.*, 2005). Algunas investigaciones involucran también la localización de genes que participan en la ruta de síntesis, cercanos a los QTLs identificados (Yi *et al.*, 2006; Ben-Chaim *et al.*, 2006).

En la evaluación del picor, que es causado por un grupo de 22 compuestos alcaloides llamados capsaicinoides, se determinan los contenidos de los compuestos más representativos como capsaicina y dihidrocapsaina que totalizan el 90% y en ocasiones nordihidrocapsaicina con 5 % adicional, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). La exploración

genotípica en los individuos ocurre a través de marcadores moleculares; los más comúnmente reportados por las ventajas que conlleva su uso son los marcadores microsatélites, los cuales se extienden a un rango amplio de especies, entre ellas las del género *Capsicum*. Con todo lo anterior, a partir de las poblaciones inter e intra específicas segregantes de mapeo se han identificado en: a) el cromosoma 7, un QTL que explica la variación fenotípica en dihidro- y capsaicina en 34 y 38 %, respectivamente (Blum *et al.*, 2003); b) los cromosomas 2, 4 y 7, 6 QTLs que explican la variación en capsaicina, dihidro- y totales en 27, 25 y 21 %, respectivamente (Ben-Chaim *et al.*, 2006); c) el cromosoma 3, un QTL que explica la variación para dihidro- en 13 y 16 %, el cromosoma 4, un QTL para nordihidro- cuya variación fenotípica se explica en 11 y 26 %, y además 3 QTLs para capsaicina que explican la variación en 40 y 48 % y los cromosomas 5, 6, 7, 10 y 11, QTLs para la variación en nordihidro- (Yarnes *et al.*, 2013).

En Chile Manzano (*C. pubescens*), las investigaciones sugieren que genes de efectos aditivos más que de efecto dominante regulan el picor del fruto, y principalmente, que los efectos maternos influyen hasta 45 % en la variación de los capsaicinoides totales, lo cual no se había reportado con anterioridad (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2010). Análisis a partir de la identificación de QTLs, hasta la fecha no se ha realizado en esta especie, ya que todos los estudios genéticos a partir de marcadores moleculares se han hecho principalmente en las especies de *Capsicum annum*, *C. chinense* y *C. frutescens*.

En la actualidad se ha logrado relacionar a nivel molecular la variación en crecimiento, la producción de metabolitos secundarios y regiones regulatorias de la expresión génica con efectos maternos (Nichols *et al.*, 2007; Garg *et al.*, 2012; McAdam *et al.*, 2013). En humanos se conoce que la expresión de microRNAs en la placenta regula la expresión génica (Morales-Prieto *et al.*, 2014). En plantas la herencia uniparental se ha encaminado a explicar mecanismos evolutivos de adaptación en ambientes determinados (Bendich, 2013; Galloway, 2005; Vivas *et al.*, 2013); aspectos conceptuales sobre la herencia de cloroplastos y mitocondrias

(Nagata, 2010), efectos sobre caracteres como el tamaño de la semilla, del embrión, de la plántula y en etapas posteriores durante su ciclo de vida (Galloway, 2009; Han *et al.*, 2008), la generación de modelos estadísticos con mayor ajuste para su estimación (Foolad y Jones, 1992; Hoyle y Ezard, 2012; Kujiper *et al.*, 2014; Mosjidis *et al.*, 1988), así como modos de herencia: maternal, paternal o biparental mediante fluorescencia (Kuroiwa *et al.*, 1993).

El estudio de la herencia materna en el ADN de organelos celulares que tienen la capacidad de transmitirla, tal vez conlleve a encontrar regiones génicas que dirijan la expresión de alguna característica de interés, y en Chile Manzano podría explicar el contenido diferencial de capsaicinoides que se ha detectado entre cruza híbrida F₁ (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2010).

Hasta el momento no existen investigaciones en las que se asocien marcadores moleculares a regiones de ADN de cloroplastos y de mitocondrias que influyan sobre estos compuestos, por lo tanto, el objetivo que aquí se plantea es detectar polimorfismos en regiones de ADN de cloroplastos, mitocondrias y nuclear del Chile Manzano, y establecer posibles relaciones con las concentraciones de capsaicinoides en dos progenitores, sus cruza F₁ directas y recíprocas y en individuos segregantes de las generaciones F₂ directas y recíprocas, e identificar QTLs que tengan una asociación significativa con el grado de picor.

5.4. Materiales y métodos

5.2.1. Material vegetal

Se usó una población segregante F₂ de 90 individuos, formada por la autofecundación de la cruce directa y recíproca de dos líneas endogámicas de Chile Manzano contrastantes en picor, línea 4 (L4) y línea 6 (L6). Las líneas progenitoras se derivaron de la caracterización y el mejoramiento de las poblaciones criollas mexicanas Zongolica y Puebla. La endogamia en ellas se generó mediante cinco ciclos de autofecundación. El manejo se hizo en invernadero de acuerdo con recomendaciones de Pérez y Castro (2008).

El material de análisis se integró de tres frutos por genotipo, cada uno de ellos en madurez fisiológica con 76 días de desarrollo aproximadamente. Frutos de la F₂ provinieron de 45 individuos derivados de la autofecundación de la cruce directa y de 45 de la recíproca. Los frutos se lavaron, pesaron y procesaron para la extracción de capsaicinoides.

5.2.2. Extracción de ADN

Se desarrollaron microtécnicas de aislamiento de cloroplastos y mitocondria para la extracción del ADN en estos organelos, y se usó el kit comercial DNAzol® (Invitrogen™) para el ADN nuclear. El tejido se tomó de la parte superior del pericarpio y se requirieron de 500 mg de tejido fresco para cada protocolo generado y de 300 mg de tejido liofilizado y molido para la extracción con el kit DNAzol siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.2.3. Determinación de capsaicinoides

Se siguió la metodología propuesta por Collins *et al.* (1995) con algunas modificaciones. Frutos liofilizados se molieron hasta alcanzar la textura de polvo

fino. Se 1 g de tejido tomó por genotipo y se le adicionaron 10 mL de acetonitrilo. La mezcla se mantuvo durante 5 h a 60 °C, agitando la solución cada hora. El sobrenadante se filtró a través de acodiscos de nylon, y 20 µL de la extracción fueron inyectados en el cromatógrafo HP 1100 (Agilent®, USA) equipado con detector de UV. Se usó una columna Hypersil ODS® (25 cm x 4.6 mm, 5 µm), con las condiciones siguientes: fase móvil de gradiente constituido por acetonitrilo-agua a razón 45:55, flujo de 1.5 mL min⁻¹ y duración de corrida de 20 min. La curva de calibración se elaboró con estándares de capsaicina y dihidrocapsaicina preparados en acetonitrilo a concentraciones de 0.25, 0.5 y 1 g mL⁻¹. Las áreas de los picos correspondientes se transformaron mediante las ecuaciones propuestas por el método oficial de la AOAC (1998).

5.2.4. Elección de alelos informativos

Marcadores microsatélites se seleccionaron para el análisis alélico de los materiales. Los iniciadores evaluados fueron específicos para cada organélo y se distribuyeron de la siguiente manera: 107 pares para núcleo, 18 pares para cloroplasto y 7 pares para mitocondria. Se analizaron primero las líneas progenitoras y en aquellas con posibles secuencias polimórficas, la comprobación se hizo mediante la amplificación de estas secuencias en las F₁.

Las pruebas de PCR se variaron en la temperatura de alineamiento de los iniciadores, hasta lograrse la amplificación de los mismos. La mezcla por reacción consistió en 40 ng de ADN, amortiguador de PCR 1x, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de DNTPs, 0.2 U de ADN polimerasa (Go Taq, Promega®) y 20 pM de cada iniciador, para un volumen final de 25 µL. El programa de PCR fue aplicado en un termociclador MaxyGene™ II (Axygen®, USA), el cual tuvo las condiciones siguientes: 95 °C por 3 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 50 a 63 °C por 30 s (la temperatura dependió del iniciador en cuestión), 72 °C por 40 s, y 72 °C durante 10 min.

Los fragmentos generados, iniciando la amplificación con microsatélites del núcleo, se cargaron en geles de poliacrilamida 8 % de 20 x 20 cm, formados por la mezcla de 8 mL de acrilamida-bisacrilamida 29:1 40 %, 8 mL de Tris-borato-EDTA (TBE) 5x, 24 mL de agua destilada-dehionizada, 158 µL de persulfato de amonio (APS) 25 % y 23 µL de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED). Se usó TBE 1x como amortiguador en la corrida, la cual tuvo duración de 2 h a la potencia de 300 V. Los geles se tiñeron con solución de nitrato de plata 2 %; sin embargo, la visualización del bandeo resultante, con el tamaño del gel y el tiempo de corrida mencionados, no fue adecuado para observar diferencias. Por tal motivo se optó por usar cámaras de mayor tamaño conocidas también como de secuenciación.

Los cambios incluyeron la preparación de geles de poliacrilamida a 6 % de 50 x 40 cm, constituidos por la mezcla de 12 mL de acrilamida-bisacrilamida 19:1 40 %, 16 mL de TBE 5x, 52 mL de agua HPLC, 280 µL de APS 25 % y 40 µL de TEMED. Se usó TBE 1x como amortiguador en la corrida, la cual tuvo duración de 4 h a la potencia de 100 W. El revelado se hizo con nitrato de plata 2 %. En las líneas progenitoras hubo patrón de bandeo similar para la mayoría de los marcadores usados en núcleo. En aquellos marcadores donde se observaron diferencias, el tamaño de la banda varió en pocos pares de base (bp) de difícil apreciación. A partir de los geles se seleccionaron 14 iniciadores con posibles secuencias microsatélites en núcleo (Cuadro 3.1).

La confirmación del polimorfismo observado requirió la síntesis de los iniciadores agregando la modificación de fluorescencia 6-FAMTM (MacroGen, Korea), HEXTM (MacroGen, Korea) y ROX (Sigma, USA) en el extremo 5' de la secuencia forward (F). Los productos de PCR se analizaron en un secuenciador Genetic Analyzer 3130[®] (Applied Biosystems, USA), para verificar las diferencias alélicas observadas en los geles. La mezcla de amplificación y el programa de PCR fue igual al descrito previamente; sin embargo, para algunos de los iniciadores hubo cambios en la temperatura de alineamiento. Para la reacción de electroforesis capilar se usó la mezcla de 2 µL del producto de PCR, 7.75 µL de

una solución de formamida y 0.25 µL de marcador de peso Size Standar LIZ[®] 500 (Applied Biosystems). Esta reacción se desnaturalizó y se le aplicó choque térmico a 96 °C y -20 °C respectivamente durante 3 min, en cada caso. Se utilizó el polímero POP7[™] como soporte de separación, el filtro G5 y la matriz DS-33 para la detección de los iniciadores mediante las etiquetas fluorescentes en azul (6-FAM), verde (HEX) y rojo (ROX), y del marcador de peso interno en naranja (LIZ).

Las secuencias microsatélites obtenidas se visualizaron con el programa GeneMapper V.9.0. En los casos en que se detectó polimorfismo en núcleo y cloroplasto, se efectuó la evaluación de sus progenies segregantes (F₂). A partir del origen parental de los alelos en cada uno de los marcadores, en la F₂ se le asignaron los valores 2 y 0 a individuos homocigóticos (AA y aa) y 1 a los heterocigóticos (Aa).

5.2.5. Análisis estadístico

Para detectar la asociación entre los contenidos de nordihidro-, dihidro-, capsicina o capsaicinoides totales y la secuencia microsatélite polimórfica se hicieron análisis de varianza (ANOVA) con diseño completamente al azar usando el programa estadístico SAS V.9.0, en los 90 individuos de la F₂ considerando como variables dependientes los contenidos de capsaicinoides y como independientes a cada uno de los marcadores bajo estudio. El porcentaje de variación fenotípica explicada por el QTL ligado al marcador estuvo dada por el coeficiente de determinación (R²) reportado en el ANOVA.

5.2.6. Análisis y construcción del mapa de ligamiento

En cromosomas donde hubo al menos dos marcadores asociados significativamente con contenidos de nordihidro-, dihidro-, capsicina, o capsaicinoides totales, con ubicación conocida derivada de investigaciones

previas a este estudio, se hizo un análisis de ligamiento y se determinó la posición relativa de los marcadores y su distancia dentro del cromosoma mediante la construcción del mapa correspondiente con el programa IClmapping V. 4.0.

Cuadro 5.1. Iniciadores microsatélites seleccionados con marcaje fluorescente.

	Locus	Iniciadores	Etiqueta	
Núcleo	1 AA840763	F -tgctattgatgaatacgtgtgg	R -cctgtcacaaggaagtcttgatcg	Hex
	2 AF208834	F -tgcaccaaggtccagtaaggttg	R -ccaaccaccatggttcatacaag	Hex
	3 CM007	F -tgttcctctctcttctatcg	R -ccggagataagatcttgataa	6-Fam
	4 Hpms 1-117	F -acccaaattgccttgttgat	R -aatccataacctatcccataaa	Hex
	5 Hpms 1-166	F -ctccttcggaaatgcatgatgg	R -cagcactttgattccagaactctg	Hex
	6 Hpms 1-168	F -gccccgatcaatgaattcaac	R -tgatttttgggtggagagaaaaacc	6-Fam
	7 Hpms 1-173	F -tgctgggaaagatctcaaaagg	R -atcaaggaagcaaaccaatgc	Hex
	8 HpmsCaSIG19	F -catgaatttcgtcttgaaggtccc	R -aagggtgatcgtacgcagcctta	Hex
	9 EPMS377	F -gacagtcttcaagaactagagagag	R -tggagcaaacacagcagaac	6-Fam
	10 EPMS402	F -gccttctttcatcttccc	R -ctggcaaccaagtcttagc	Hex
	11 EPMS472	F -attgtgatagcaaccctgg	R -cacagatgagggcacaaatg	Hex
	12 EPMS497	F -tacacacaccatcgggaaag	R -cagtttagccgagttttccg	6-Fam
	13 EPMS694	F -ctagtacgagcaggggagg	R -ccagatcccgtttgacta	Hex
	14 EPMS747	F -cattggcaggttggttctct	R -tggaattggaactcaagca	Hex
Cloroplasto	15 NTCP9	F -ctccaagctaacgatgc	R -ctgtcctatccattagacaatg	6-Fam
	16 NTCP14	F -aatccgtagccagaaaaataaa	R -ccgatgcatgtaatggaatc	6-Fam
	17 NTCP4	F -ttggattagattgtagtcca	R -atccactcatttatcacaatg	6-Fam
	18 NTCP18	F -ctgttctttccatgaccctc	R -ccacctagccaagccaga	6-Fam
	19 NTCP25	F -ttagtcaggtatttccatttc	R -ctttcataggaatctttcaca	Hex
	20 NTCP27	F -ataaatacagaaccgcgtaa	R -tgcttagagttggacacagaat	Hex
	21 NTCP39	F -gtcacaattggggtttgaaata	R -gacgatactgtaggggaggtc	Hex
	22 CCMP10	F -tttttttagtgaacgtgtca	R -ttcgtcgdcgtagtaaatag	6-Fam
	23 GRASS1	F -ggaaaaaykggtaactattcc	R -gaaacaaagaatatcactactg	Hex
	24 GRASS2	F -ttatttattcaagctatttcgg	R -aatacttctgtcatttttcc	6-Fam
	25 GRASS3	F -tggttgattgtatcctaacc	R -gaagcagcagcaattagtgg	6-Fam
	26 GMCP2	F -tctagtgattatagactatctt	R -ggaaagttatcataaaatggg	Hex
	27 GMCP1	F -tcgattctatgccctactt	R -agactcccaagtttctcagtcg	Hex
	28 CCSS12	F -ccaaaaacttgagatccaactac	R -ttccatagattcgatcgtggtta	Hex
29 CCSSR-13	F -agtctgaaaccragkggattatt	R -tagtcattagtaaagccgargtsa	6-Fam	
30 CCSSR-14	F -gggtataatggtagatgcc	R -gccgtagtaaataggagagaaa	6-Fam	
31 CCSS17	F -cacaccaatccatcccgaact	R -ggtgcgttccgrggtgta	Hex	
32 CCSSR-20	F -ccgcaratattgaaaaacwacaa	R -gctaarcaaawgtctctgctcc	Hex	
Mitocondria	33 WMT1	F -gggccgactacaagactacg	R -ttagcgaacaggcgtttaca	Hex
	34 NAD3-1	F -ttcccatgaatggaagaag	R -attgattcgatgtaggcatcg	6-Fam
	35 A14-1	F -tgggggtcttcattcactct_	R -gaagggcttatcgcttcc	Hex
	36 T11-2	F -tcgtcaagaaagatcgagca	R -gagcttcgccccttgtattg	6-Fam
	37 T12-1	F -gtgggatcaactgctcgttt	R -gatttatgaaagcccggatga	Hex
	38 T12-3	F -tggttgatcaatctccgcttt	R -cccataatcatccaacaca	6-Fam
	39 T12-4	F -agccagatcgtctgaagcat	R -ccacaacctactgcacga	Hex

5.5. Resultados y discusión

5.3.1. Polimorfismo en ADN nuclear

Las 107 secuencias de microsatélites amplificadas en el núcleo revelaron escaso polimorfismo entre el ADN de las líneas progenitoras L4 y L6 (Figura 5.1). La cercanía estrecha de las bandas del orden de algunos pb dificultó discernir diferencias entre los progenitores; sin embargo, producto de la interpretación en el patrón de bandeo en geles de poliacrilamida, que por su tamaño (50 × 40 cm) se destinan a secuenciación, se seleccionaron 14 iniciadores microsatélites del núcleo.

La amplificación de los productos de PCR por electroforesis capilar en el secuenciador de ADN se hizo en 11 de estos iniciadores. El tamaño de las secuencias obtenidas (Cuadro 5.2) varió dentro del rango reportado en otros chiles como *C. annuum*, *C. chinense* y *C. frutescens* (Lee *et al.*, 2004; Nagy *et al.*, 2007).

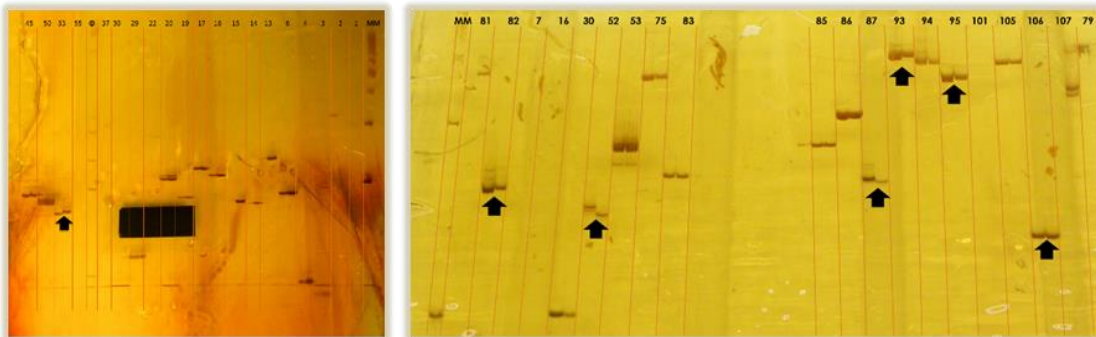


Figura 5.1. Patrón de bandeo de microsatélites en el núcleo y elección de loci polimórficos.

Cuadro 5.2. Descripción de las secuencias microsatélites del núcleo amplificadas por electroforesis capilar.

Nombre	Microsatélite	Temperatura de alineamiento (°Tm)	Tamaño esperado (pb)	Tamaño observado (pb)
AA840763	(GAA) _{6imp}	63	179	165
AF208834	T ₇ A ₁₁	62	201	209
CM007	(AG) ₆	60	103	98
Hpms1-117	(AT) ₉ (GT) ₁₄	53	189	169
Hpms1-166	(GA) ₁₃ AA(AT) ₂	59	132	133
Hpms1-168	(TA) ₁₇ (GA) ₁₂	50	208	170
Hpms1-173	(GA) ₁₆ (TG) ₂	60	163	166 y 168
EPMS_377	(AG) ₁₁	62	134-161	150
EPMS_402	(CCT) ₃ (CTT) ₆ (CCT)	55	197-216	171
EPMS_472	T ₁₆	60	289-320	289 y 290
EPMS_497	G ₁₄	58	240-250	247

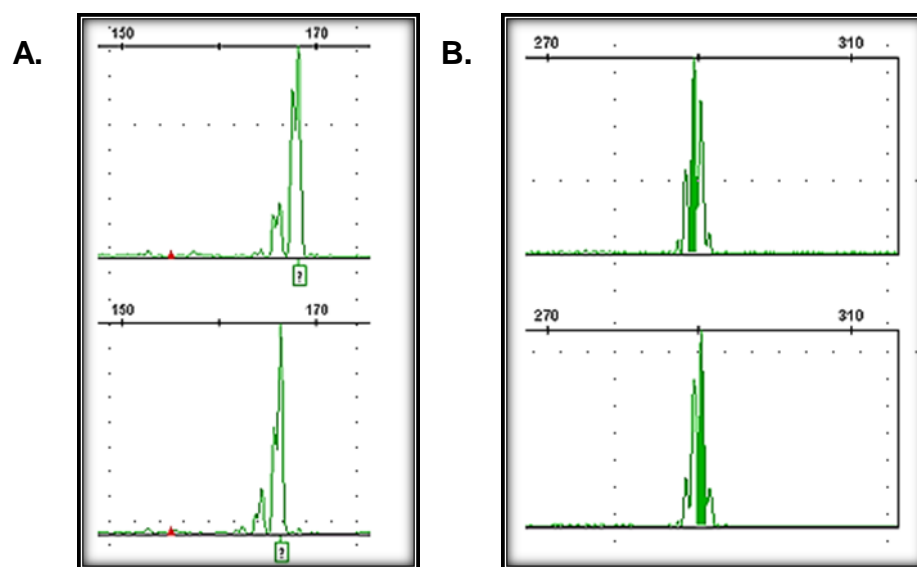


Figura 5.2. Secuencias microsatélites polimórficas del núcleo usando como molde ADN de líneas endogámicas de Chile Manzano, L4 en la parte superior y L6 en la inferior. Amplificación de los iniciadores: A, HPMS 1-173; B, EPMS-472.

En dos de las secuencias microsatélites amplificadas se validaron diferencias de 1 ó 2 pb entre las líneas L4 y L6, correspondientes a los iniciadores Hpms1-173 y EPMS_472 (Figura 5.2, Cuadro 5.2). Estos marcadores se localizan en el cromosoma 3 de Chile, y han sido previamente mapeados en poblaciones derivadas de las cruzas de *C. annuum* × *C. chinense*, *C. annuum* × *C. frutescens* y *C. annuum* × *C. annuum* (Figura 5.3).

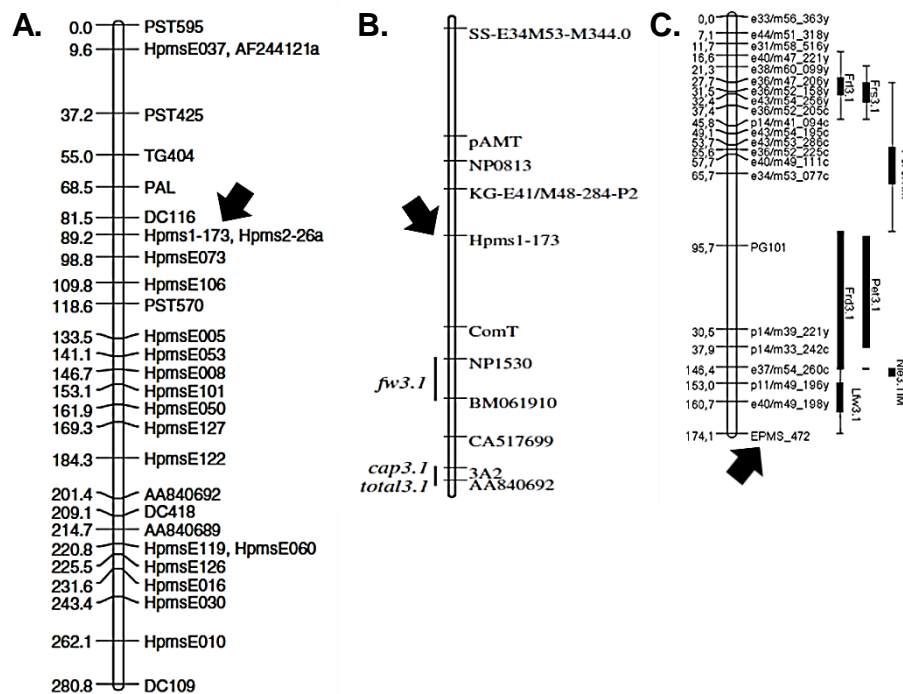


Figura 5.3. Ubicación de los microsatélites nucleares Hpms1-173 y EPMS-472 en el cromosoma 3. Mapas generados por: A, Yi *et al.* (2006), B, Ben-Chaim *et al.* (2006); C, Barchi *et al.* (2009).

Los resultados aquí obtenidos en relación a pequeñas diferencias entre los ADN de las líneas progenitoras fueron los esperados a causa de la relación fraternal de hermanos entre estas líneas cuya elección se originó de una población segregante del híbrido Zongolica × Puebla, principalmente por presentar características deseables en el fruto como calidad (tamaño, peso, etc.) y

productividad. En consecuencia el polimorfismo bajo viene dado por semejanzas en los atributos seleccionados al momento de derivar las líneas y su parentesco. No obstante, como muestran los resultados, estas diferencias son posible de encontrar siempre y cuando exista seguridad del contraste en la característica de interés a través de la detección previa tal como se hizo en este estudio al evaluar el picor en los progenitores y exista una disponibilidad alta de marcadores, mayor a la aquí propuesta, o en sustitución se empleen metodologías de secuenciación.

Hasta el momento han sido dos los estudio en Chile donde se analizan los polimorfismos resultantes en poblaciones RILs derivadas de cruza entre la misma especie en *C. annuum*, la cual es conocida por abarcar la variabilidad más alta entre las 5 especies domesticadas que son *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. bacatum* y *C. pubescens*. Uno de ellos, realizado por Dwivedi *et al.* (2013), inició la evaluación de la población a partir de 290 microsatélites, 9 SCARs y 30 RAPD pero para la construcción del mapa de ligamiento reportan 39 SSRs, 1 SCAR y 5 RAPDs. Barchi *et al.* (2009) evaluaron 32,125 combinaciones de marcadores por característica y mapearon 250 marcadores del núcleo. Lo anterior señala la importancia en la cantidad de marcadores cuando los padres seleccionados para derivar la población de mapeo pertenecen a la misma especie de Chile.

5.3.2. Polimorfismo en ADN no nuclear

Las secuencias microsatélites en el ADN de cloroplastos y mitocondrias se evaluaron directamente por electroforesis capilar en el secuenciador. La amplificación del microsatélite NTCP-4 específico para cloroplasto resultó ser polimórfica entre las líneas progenitoras L4 y L6, de entre un total de 14 iniciadores evaluados (Cuadro 5.3). Este marcador se ubica en la región intergénica *trnK/rps16* (Figura 5.5).

En el ADN mitocondrial no se encontraron secuencias microsatélites polimórficas en los 7 iniciadores específicos al ADN de este organelo.

Cuadro 5.3. Descripción de las secuencias microsatélites de cloroplastos y mitocondrias amplificadas por electroforesis capilar.

Organelo	Nombre	Microsatélite	Temperatura de alineamiento (°Tm)	Tamaño esperado (pb)	Tamaño observado (pb)
Cloroplasto	NTCP9	T ₁₀	60	237	236
	NTCP14	T ₁₁	50	152	151
	NTCP4	A ₁₂	61	162	163 y 164
	NTCP18	T ₁₁	58	186	187
	NTCP25	A ₁₃	53	190	186
	NTCP27	T ₁₀	55	166	163
	NTCP39	T ₁₃	61	156	164
	CCMP10	T ₁₄	61	103	114
	GRASS3	T ₈ y T ₉	56	77	96
	CCSSR12	A ₈	55	249	249
	CCSSR13	T ₉	54	264	264
	CCSSR14	T ₁₄	57	200	213
	CCSSR17	A ₁₃	56	236	239
	CCSSR20	A ₈	54	311	311
	Mitocondria	WMT1-F	T ₁₀	54	109
NAD3-1		G _N	54	150	163
T11-2			55	153	158
T12-1			54	168	170
T12-3			57	195	204
T12-4			57	203	204

El tamaño del fragmento en los microsatélites evaluados correspondió con lo reportado en otras investigaciones. En el marcador NTCP4 fue de 163 y 164 pb (Figura 5.4)

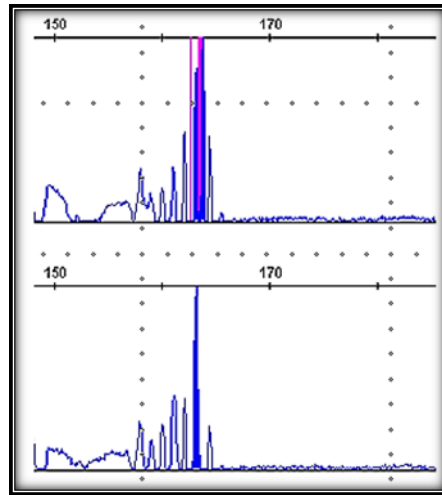


Figura 5.4. Amplificación de la secuencia microsatélite polimórfica NTCP4 constitutivo de cloroplasto usando como molde ADN de este organelo de las líneas endogámicas de Chile Manzano, L4 en la parte superior y L6 en la inferior.

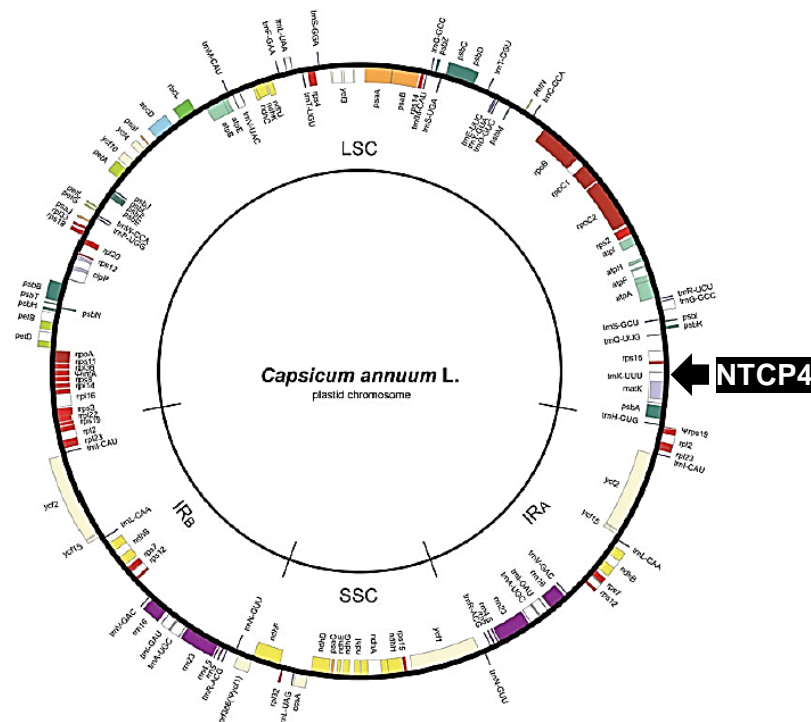


Figura 5.5 Ubicación del marcador microsatélite NTCP-4, polimórfico en la región intergénica *trnK/rps16* del ADN de cloroplasto en *Capsicum annuum* L. Mapa reportado por Jo *et al.* (2011).

5.3.3. Análisis de QTLs

Se encontraron asociaciones significativas entre los marcadores polimórficos y los principales componentes del picor del fruto de chile Manzano a partir del análisis de marcadores individuales. Estos resultados facultaron la identificación de QTLs en el núcleo que afectan los contenidos de nordihidro-, dihidro-, capsaicina y de capsaicinoides totales de forma tal que su variación fenotípica total puede ser explicada en 20, 34, 18 y 29 % por ambos marcadores, respectivamente. También se determinó que los QTLs presentan efectos de dominancia significativos. En el cloroplasto, la F_2 presentó en cada mitad de sus individuos el alelo correspondiente al progenitor femenino de la cruce directa y recíproca de la F_1 , como implica su herencia materna, lo anterior pone en evidencia que no existe segregación y por tanto falta de individuos heterocigotos, requisito para el análisis de QTL. No obstante, al analizar los 45 individuos homocigotos derivados de la L4 y la L6, respectivamente con sus correspondientes contenidos de picor se registró asociación significativa, por lo que este alelo corresponde a una región del ADN de cloroplasto que puede influir en el contenido de dihidrocapsaicina y en este estudio explica su variación en 12 % (Cuadro 5.4).

Cuadro 5.4. Grado de asociación estadística entre los contenidos de los principales capsaicinoides y dos marcadores QTL en chile manzano.

Origen	Marcador	Capsaicinoides				
			Nordihidro-	Capsaicina	Dihidro-	CAPs totales
Nuclear	Hpms1-173	p	0.2029	0.0017	0.4984	0.0254
		R^2	0.0360	0.1363	0.0159	0.0810
	EPMS_472	p	0.0136	0.0139	0.0210	0.0103
		R^2	0.202	0.201	0.184	0.214
Cloroplasto	NTCP4	p	0.0680	0.2627	0.0275	0.0864
		R^2	0.0810	0.0312	0.1158	0.0717

p : Significancia estadística; R^2 : coeficiente de determinación que explica la proporción de varianza en el carácter de interés explicada por el marcador en cuestión.

Como fue mencionado, estudios previos reportan la ubicación en el cromosoma 3 del marcador *HPMS1-173*; sin embargo, esta es la primera investigación que detecta su asociación significativa con contenidos de capsaicinoides, específicamente con capsaicina y picor total del fruto. Tal y como lo menciona Mauricio (2001), cada nueva población de mapeo representa una oportunidad de localizar QTLs .

Ben-Chaim *et al.* (2006), en una población de familias F_3 obtenida de la cruce de *Capsicum annum* NuMex RNaky y *C. frutescens* BG2814-6, con 396 individuos, 728 marcadores y 2 ambientes, identificaron QTLs en los cromosoma 3, 4 y 7 y relacionaron la co-localización del QTL del cromosoma 3 asociado a capsaicina y picor total (*cap3.1* y *total3.1*, respectivamente) con el gen candidato 3A2 (Figura 5.3 B) para hidroxibutirato deshidrogenasa, el cual sugieren podría desempeñar un papel en el catabolismo de valina. Los autores mencionan que el QTL en el cromosoma 7 es el mismo que previamente detectó Blum *et al.* (2003). Por su parte, Yarnes *et al.* (2013) identificaron 12 QTLs en una población de RILs derivada de los mismos progenitores seleccionados por Ben-Chaim *et al.* (2006),

uno de los cuales ubicaron al inicio del cromosoma 3, y al contrario de lo aquí obtenido y lo reportado por Ben-Chaim *et al.* (2006), este QTL se asoció con el contenido de dihidrocapsaicina; los restantes QTLs relacionados a capsaicinoides se ubicaron en los cromosomas 4, 6, 7, 10 y 11.

De acuerdo con los mapas de ligamiento existentes en Chile es posible que los efectos del marcador *HPMS1-173* puedan tener su fuente en la cercanía de uno o más genes que codifican enzimas con función conocida en la biosíntesis de capsaicinoides como PAL (fenilamonio liasa), pAMT (aminotransferasa) y COMT (Cafeoil-CoA 3-O-metil transferasa) (Figura 5.3), y recientemente, CCR (Cinamoil CoA reductasa), como punto de control del ácido p-cumárico hacia rutas biosintéticas específicas, como producción de capsaicinoides y de lignina (Reddy *et al.*, 2014). Es importante destacar el hecho que no hay interconversión entre los alcaloides capsaicina y dihidrocapsaicina, por lo que se asume que los efectos regulatorios son únicos en la expresión de enzimas involucradas en su ruta metabólica de síntesis (Iwai *et al.*, 1979).

Por otra parte, el hallazgo de polimorfismo y la posterior identificación de un alelo en el ADN de cloroplasto asociado con el contenido de dihidrocapsaicina representa la principal contribución en el presente trabajo. Como se ha comprobado en décadas de estudio, la secuencia de ADN es altamente conservada en este organelo, por lo que su utilidad se dirige en principio a establecer relaciones de filogenia y evolución entre especies. La probabilidad de encontrar diferencias disminuye a medida que el análisis incluye individuos de la misma especie y, llega a ser casi nula entre líneas que comparten un mismo progenitor.

Sin embargo, cabe resaltar que resultados genotécnicos obtenidos previamente con el método I de Griffing en 25 materiales genéticos (cinco progenitores y sus 20 cruzas posibles, 10 de la crusa directa y 10 de la recíproca) sugieren que existen efectos maternos en dihidro- (51.6 %), nordihidro- (20.4 %) y

capsaicina (44.8 %) que forman parte en la acumulación de capsaicinoides y llegan a representar 45 % de la variación total del picor (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2010), resultado que ahora es comprobado a nivel molecular.

Debe señalarse también que los materiales usados por Sánchez-Sánchez *et al.* (2010) tenían la dihidrocapsaicina como componente principal del picor, que es justo la característica donde se encontró asociación significativa. En las líneas aquí evaluadas, sus F₁ y F₂, la dihidrocapsaicina (22-37%) estuvo en menor concentración que capsaicina (54-68 %), por lo que en nuestros resultados es menor el porcentaje de la variación fenotípica explicada.

Acorde con el coeficiente de determinación, el marcador microsatélite polimórfico *NTCP4* explica 34 % ($r = \sqrt{R^2} = 0.34$) la concentración de dihidrocapsaicina, en tanto la herencia materna detectada con métodos genotécnicos llega a alcanzar hasta 45 % de la variación, porcentajes no muy lejanos que reafirman la importancia del progenitor femenino como fuente de variación en el picor de los frutos de Chile Manzano.

Existen entre 100 y 150 genes en el ADN de cloroplasto, clasificados en genes ribosomales, para ARN de transferencia, polipéptidos del tilacoide (5 complejos: fotosistema I, fotosistema II, antena para captación de luz –codificada por el núcleo-, citocromo b/f y H⁺-ATPasa), subunidad grande de la Rubisco, estructurales del sistema genético y de secuencias de replicación autónoma que en su conjunto abarcan entre 120 y 190 kb (Jo *et al.*, 2011; Sugiura, 1987). El marcador polimórfico aquí detectado se ubica en la región entre los genes de la unidad ribosomal 30 S (*rps16*) y de transferencia *trnK*, que a su vez contiene el gen *matK*. Este último se usa con frecuencia en estudios filogenéticos por su tasa de mutación relativamente (Hausner *et al.*, 2006), se le atribuye también la función de maturasa porque procesa y genera espaciamiento entre los intrones del grupo II que pertenecen a los genes *trnK*, *atpF*, *trnI*, *trnA*, *rpl2*, y *rps12 cis* (Barthet y Hilu,

2007). Estudios más detallados deben conducirse para conocer la manera en que esta región afecta la variación en el contenido de dihidrocapsaicina.

5.3.4. Mapa de ligamiento

A partir de los datos fenotípicos de los capsaicinoides en la F₂ se obtuvo una frecuencia de recombinación de 0.5, lo que indica que los marcadores microsatélites *Hpms1-173* y *EPMS_472*, no están ligados. La distancia genética entre ellos fue de 84.24 cM (centi morgans o unidades mapa) (Figura 5.6). A partir de los datos obtenidos no fue posible reportar valores de LOD (como un estadístico de prueba para sustentar el ligamiento) debido a la escasez de marcadores polimórficos con distancias menores a 30 cM, respecto a nuestros marcadores asociados al picor. Valores LOD iguales o superiores a 3 permiten confirmar estadísticamente la presencia de QTLs que influyen en la expresión de la característica objeto de estudio.

Se han construido numerosos mapas de ligamiento, para la ubicación de marcadores moleculares y genes que influyen en características de interés económico, particularmente en Chile estos mapas existen para características como floración, arquitectura de la planta y relativas al fruto, entre ellas forma, longitud, diámetro, peso y grosor del pericarpio (Barchi *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2003; Yarnes *et al.*, 2013; Yi *et al.*, 2006).

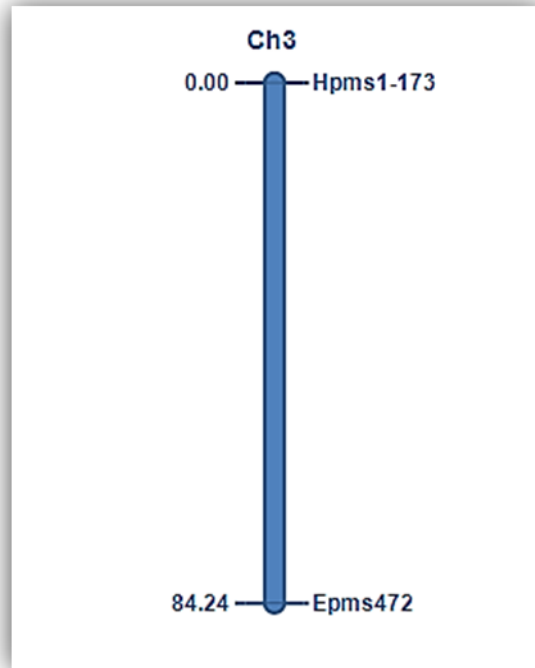


Figura 5.6. Mapa de ligamiento del cromosoma 3, donde se ubican los marcadores *Hpms1-173* y *EPMS_472* generado a través del programa ICIMapping.

5.6. Conclusiones

Se detectaron polimorfismos en las líneas endogámicas L4 y L6 de Chile Manzano en los marcadores *HPMS1-173* y *EPMS-472* ambos localizados en el cromosoma 3 del núcleo, y en el marcador *NTCP-4* del cloroplasto.

Se identificaron dos QTLs mediante asociaciones significativas entre el contenido de capsaicinoides y los marcadores microsatélites, uno de ellos con herencia nuclear y el otro de herencia materna. El QTL nuclear explica la variación en los contenidos de capsaicina y capsaicinoides totales en 14 % y 8 %, respectivamente, en tanto el QTL en cloroplasto explica 12 % de la variación en el contenido de dihidrocapsaicina.

5.7. Literatura citada

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists International). 1998. Capsaicinoids in capsicum and their extractives. Liquid chromatographic method. Official Methods of Analysis of AOAC International. 2(43): 13–15.
- Barchi, L., V. Lefebvre, A.-M. Sage-Palloix, S. Lanteri, and A. Palloix. 2009. QTL analysis of plant development and fruit traits in pepper and performance of selective phenotyping. *Theoretical and Applied Genetics* 118:1157-1171.
- Barthet, M., M. and K. W. Hilu. 2007. Expression of *matk*: functional and evolutionary implications. *American Journal of Botany* 94:1402-1412.
- Ben-Chaim, A., Y. Borovsky, M. Falise, M. Mazourek, B. C. Kang, I. Paran, and M. Jahn. 2006. QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics* 113:1481-1490.
- Bendich, A. J. 2013. DNA abandonment and the mechanisms of uniparental inheritance of mitochondria and chloroplasts. *Chromosome Research* 21:287-296.
- Blum E., M. Mazourek, M. O'Connell, J. Curry, T. Thorup, K. Liu, M. Jahn and I. Paran. 2003. Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics* 108:79-86.
- Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer and E. C. K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169-196.
- Collins, M., M. Wasmund, and P. W. Bosland. 1995. Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using high performance liquid chromatography. *Hort. Sci.* 30: 137-139.
- Dwivedi, N., R. Kumar, R. Paliwal, R. Kumar, S. Kumar, M. Singh, and R. K. Singh. 2013. QTL mapping for important horticultural traits in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal Plant Biochemistry Biotechnology* 24:154-160.
- Estrada, B., F. Pomar, J. Díaz, F. Merino, and A. Bernal, 1997. Evolution of capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* cv. Padrón at different growth stages after flowering. *Capsicum Newsletter* 16:60-64.
- Foolad, M. R. and R. A. Jones. 1992. Models to estimate maternally controlled genetic variation in quantitative seed characters. *Theoretical and Applied Genetics* 83:360-366.

- Galloway, L. F. 2005. Maternal effects provide phenotypic adaptation to local environmental conditions. *New Phytologist* 166: 93-100.
- Garcés-Claver, A., M. S. Arnedo-Andrés, J. Abadía, R. Gil-Ortega, and A. Alvarez-Fernandez. 2006. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in capsicum fruits by liquid chromatography-electrospray/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:9303-9311.
- Garg, P., C. Borel, A. J. Sharp. 2012. Detection of parent-of-origin specific expression quantitative trait loci by cis-association analysis of gene expression in trios. *PLoS ONE* 7:e41695.
- Gurung, T., S. Techawongstien, B. Suriharn, S. Techawongstien. 2011. Impact of environments on the accumulation of capsaicinoids in *Capsicum* spp. *HortScience* 46:1-6.
- Han, K., H.-J. Jeong, J. Sung, Y. S. Keum, M.-C. Cho, J.-H. Kim, J.-K. Kwon, B.-D. Kim, B.-C. Kang. 2013. Biosynthesis of capsinoid is controlled by the Pun1 locus in pepper. *Molecular Breeding* 31:537-548.
- Han, L., H. Xu, J. Zhu, and X. Lou. 2008. Analysis of genetic effects of nuclear-cytoplasmic interaction on quantitative traits: genetic models for seed traits of plants. *Theoretical and Applied Genetics* 116:769-776.
- Hausner, G., R. Olson, D. Simon, I. Johnson, E. R. Sanders, K. G. Karol, R. M. McCourt and S. Zimmer. 2006. Origin and evolution of the chloroplast *trnK* (*matK*) intron: a model for evolution of group II Intron RNA structures. *Molecular Biology and Evolution* 23:380-391.
- Hoyle, R. B. and Ezard, T. H. G. 2012. The benefits of maternal effects in novel and in stable environments. *Journal of the Royal Society Interface* 9:2403-2413.
- Iwai, K., T. Suzuki, and H. Fujiwake. 1979. Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at different growth stages after flowering. *Agricultural and Biological Chemistry* 43:2493-2498.
- Jo, Y. D., J. Park, J. Kim, W. Song, C.-G. Hur, Y.-H. Lee, and B.-C. Kang. 2011. Complete sequencing and comparative analyses of the pepper (*Capsicum annuum* L.) plastome revealed high frequency of tandem repeats and large insertion/deletions on pepper plastome. *Plant Cell Reports* 30:217-229.
- Lee, J. M., S. H. Nahm, Y. M. Kim, and B. D. Kim. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 619-627.

- Kuijper, B., R. A. Johnstone, and S. Townley, 2014. The evolution of multivariate maternal effects. *Plos Computational Biology* 10:e1003550.
- Kuroiwa, T., T. Kawazu, H. Uchida, T. Ohta, and H. Kuroiwa. 1993. Direct evidence of plastid DNA and mitochondrial DNA in sperm cells in relation to biparental inheritance of organelle DNA in *Pelargonium zonale* by fluorescence/electron microscopy. *European Journal of Cell Biology* 62:307-313.
- McAdam, E. L., J. S. Freeman, S. P. Whittock, E. J. Buck, J. Jakse, A. Cerenak, B. Javornik, A. Kilian, C.-H. Wang, D. Andersen, R. E. Vaillancourt, J. Carling, R. Beatson, L. Graham, D. Graham, P. Darby and A. Koutoulis. 2013. Quantitative trait loci in hop (*Humulus lupulus* L.) reveal complex genetic architecture underlying variation in sex, yield and cone chemistry. *BMC Genomics* 14:360 DOI:10.1186/1471-2164-14-360.
- Morales-Prieto D. M., S. Ospina-Prieto, A. Schmidt, W. Chaiwangyen, and U. R. Markert. 2014. Elsevier trophoblast research award lecture: origin, evolution and future of placenta miRNAs. *Placenta* 35:39-45.
- Mosjidis, J. A., J. G. Waines, D. M. Yermanos, and A. A. Rosielle. 1988. Methods for the study of cytoplasmic effects on quantitative traits. *Theoretical and Applied Genetics* 77:195-199.
- Nagata, N. 2010. Mechanisms for independent cytoplasmic inheritance of mitochondria and plastids in angiosperms. *Journal of Plant Research* 123:193-199.
- Nagy, I., A. Stigel, Z. Sasvari, M. Roder, and M. Ganal. 2007. Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome* 50:668-688.
- Nichols, K. M., K. W. Broman, K. Sundin, J. M. Young, P. A. Wheeler, and G. H. Thorgaard. 2007. Quantitative trait loci x maternal cytoplasmic environment interaction for development rate in *Oncorhynchus mykiss*. *Genetics* 175: 335-347.
- Pérez G., M. y R. Castro B. 2008. El chile manzano. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 128 p.
- Rao, G. U., A. Ben-Chaim, Y. Borovsky, and I. Paran. 2003. Mapping of yield-related QTLs in pepper in an interspecific cross of *Capsicum annuum* and *C. frutescens*. *Theoretical and Applied Genetics* 106:1457-1466.
- Reddy, U. K., A. Almeida, V. L. Abburi, S. B. Alaparthy, and D. Unsel. 2014. Identification of gene-specific polymorphisms and association with capsaicin pathway metabolites in *Capsicum annuum* L. collections. *PLoS ONE* 9: e86393.

- Sánchez-Sánchez, H., V. A. González-Hernández, A. B. Cruz-Pérez, M. Pérez-Grajales, M. A. Gutiérrez-Espinosa, A. A. Gardea-Béjar, y M. A. Gómez-Lim. 2010. Herencia de capsicinoides en chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.). *Agrociencia* 44:655-665.
- Stellari, G. M., M. Mazourek, and M. M. Jahn. 2010. Contrasting modes for loss of pungency between cultivated and wild species of *Capsicum*. *Heredity* 104:460-471.
- Stewart, C. Jr., B. C. Kang, K. Liu, M. Mazourek, S. L. Moore, E. Y. Yoo, B. D. Kim, I. Paran, and M. M. Jahn. 2005. The *pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *The Plant Journal* 42:675–688.
- Stewart, C. Jr., M. Mazourek, G. M. Stellari, M. O'Connell, M. Jahn. 2007. Genetic control of pungency in *C. chinense* via the *pun1* locus. *Journal of Experimental Botany* 58:979-991.
- Sugiura, M. 1987. Structure and function of the tobacco chloroplast genome. *Botanical Magazine of Tokyo*. 100:407:436.
- Vivas, M., R. Zas, L. Sampedro, and A. Solla. 2013. Environmental maternal effects mediate the resistance of Maritime Pine to biotic stress. *PLoS ONE* 8:e70148.
- Yarnes, S. C., H. Ashrafi, S. Reyes-Chin-Wo, T. A. Hill, K. M. Stoffel, and A. Van Deynze. 2013. Identification of QTLs for capsaicinoids, fruit quality, and plant architecture-related traits in an interspecific *Capsicum* RIL population. *Genome* 56:61-74.
- Yi, G., J. M. Lee, S. Lee, D. Choi, and B.-D. Kim. 2006. Exploitation of pepper EST–SSRs and an SSR-based linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* 114:113-130.
- Zewdie, Y. and P. W. Bosland. 2000. Evaluation of genotype, environment and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. *Euphytica* 111: 185-190.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIÓN GENERAL

En la presente investigación se postuló que hay genes extranucleares, en cloroplasto o mitocondria, que afectan el contenido de capsaicinoides del Chile Manzano, como lo sugerían estudios previos hechos en este mismo laboratorio mediante métodos genotécnicos (diseños dialélicos). Para probar la hipótesis se analizó mediante marcadores microsatélites ADN extraído de núcleo (total), cloroplastos y mitocondrias, de frutos de la progenie F₂ derivada de dos tipos de cruza F₁ entre dos líneas endogámicas de esta especie, L4 y L6: de la cruza directa L4 x L6 y de la cruza recíproca L6 x L4.

A pesar de que el ADN de cloroplastos y mitocondrias se considera altamente conservado por no estar sujeto a la recombinación genética, el estudio confirmó la existencia del marcador microsatélite NTCP4 en el ADN de cloroplasto, y que este marcador está estadísticamente asociado ($R^2 = 0.116$; $P \leq 0.05$) con la concentración de dihidrocapsaicina en el fruto, que equivale a una correlación de 34 % ($r = \sqrt{R^2} = 0.34$). De acuerdo con el mapa genético del cloroplasto de *Capsicum*, este marcador se ubica entre los genes de la unidad ribosomal 30S (*rps16*) y de transferencia *trnK*, en el cual se encuentra a su vez el gen MatK. Se requieren estudios posteriores para identificar un intermediario temprano relacionado con la ruta de biosíntesis de la dihidrocapsaicina.

Con lo anterior se comprueba la hipótesis con relación a la existencia de polimorfismos en el ADN de cloroplasto que permite diferenciar genéticamente las líneas progenitoras de Chile Manzano (L4 y L6), y sobre todo explicar la herencia materna previamente detectada, que en dihidrocapsaicina en promedio representa 52 % del picor del fruto en esta especie.

También se confirmó la existencia de heterosis positiva en el picor de cruza F1 entre las dos líneas de Chile Manzano. Dicha heterosis fue de 93 % para capsaicina, de 35 % para dihidrocapsaicina, de 94 % para nordihidrocapsaicina, y de 73 % para el picor total (suma de los tres capsaicinoides). Esta heterosis se atribuye a genes del núcleo, ya que son resultados de recombinación genética.

- 1- Las asociaciones significativas de el marcador microsatélite NTCP4 de cloroplasto y los marcadores microsatélites Hpms1-173 y EPMS_472 de núcleo, con los contenidos de capsaicinoides, permiten explicar hasta en 22 % ($R^2 = 0.22$) la variación genética en el picor del fruto entre los individuos de la F₂. Estos marcadores, aunque cuentan con ubicación génica conocida, no habían sido asociados al picor.
- 2- Por su parte, el análisis químico permitió determinar que en estos materiales genéticos la capsaicina fue el alcaloide más abundante en la población, con 60 % del total, mientras que en otros estudios hechos en Chile Manzano se ha reportado a dihidrocapsaicina como el más abundante. Además se encontró que tanto los tres capsaicinoides evaluados como el picor total siguieron una distribución normal en los 90 individuos de la F₂.
- 3- Adicionalmente, para el desarrollo de esta investigación se generó un protocolo para el aislamiento de cloroplastos y mitocondrias en micro-muestras de 0.5 g del pericarpio de frutos, que permitió la extracción de ADN en calidad y cantidad suficientes (14.51 µg de ADN en cloroplasto y $A_{260}/A_{280} = 1.8$ y 19.44 µg de ADN en mitocondria $A_{260}/A_{280} = 1.75$), cuya amplificación se verificó a partir de marcadores constitutivos de cada organelo. En ADN extranuclear se obtuvieron valores de eficiencia superiores (20 µg cpADN g⁻¹ de tejido fresco inicial para cloroplastos, y de 33 µg mtADN g⁻¹ de tejido fresco inicial para mitocondrias.) en comparación con otros protocolos que empleaban cantidades mayores a las aquí sugeridas como tejido inicial.