



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Detección de transcritos involucrados en la
síntesis de valina y fenilalanina en tejido
placentario de *Capsicum chinense* Jacq. mediante
la técnica de amplificación isotérmica mediada por
horquillas (LAMP)**

Tesis que presenta

Raúl Alejandro Manzanilla Rivas

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

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



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Raúl Alejandro Manzanilla Rivas, titulado “Detección de transcritos involucrados en la síntesis de valina y fenilalanina en tejido placentario de *Capsicum chinense* Jacq. mediante la técnica de amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP)” fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Miranda Ham, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, Agosto de 2017.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____
Q.F.B. Raúl Alejandro Manzanilla Rivas

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “Estudio de las enzimas involucradas en la asimilación de nitrógeno en placentas de chile habanero y su relación con la síntesis de fenilalanina y capsaicina. Análisis de su regulación” (CONACYT, proyecto 168545) bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Miranda Ham.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada (Registro de becario 589298, No. de apoyo 422140) a lo largo de esta etapa de mi formación académica.

Agradezco al CICY por todo el tiempo que me brindó sus instalaciones y al personal de apoyo de esta institución los cuales pusieron a mi disposición los todos los elementos necesarios para la realización de este trabajo.

A la Dra. María de Lourdes Miranda Ham, por la confianza brindada a lo largo de mi estancia en su equipo de trabajo donde siempre conté con su apoyo en todos los sentidos para llegar a esta etapa de mi formación académica y como ser humano.

A la M. en C. Lizbeth Castro Concha, por su incondicional apoyo, orientación y paciencia durante la realización de este trabajo donde además de compartir su invaluable experiencia académica y experimental.

Al Dr. Efraín Ramírez Benítez, por su completo apoyo y confianza en la realización de este proyecto, en el cual siempre conté con su disposición y completo respaldo.

Al Dr. Enrique Castaño de la Serna, por su paciencia, su disposición a transmitirme su experiencia y su inigualable forma de inducir en mí la autocrítica la cual ha sido fundamental en mi formación académica y personal.

Al Dr. Fray Martín Baas Espinola, por su siempre oportuna y constante instrucción en todas las etapas de mi trabajo experimental. Por su sincera, oportuna y acertada crítica, pero sobre todo por su incondicional amistad.

A la Dra. Wendy Ancona Escalante, por su constante instrucción y ayuda durante mi proceso inicial de aprendizaje en esta area.

Al M. en C. David Gongora Espinola, por su apoyo durante la realización de la etapa experimental de este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio 8 y compañeros de Unidad de Bioquímica y Biología Molecular en Plantas, por su aceptación, amistad y respaldo durante las diferentes etapas de este ciclo.

Agradezco a todos los que me enseñaron lo que aspiro llegar a ser, asi como a todos aquellos que me mostraron lo que no me gustaría ser.

“La sencillez es el camino a la grandeza”

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES	2
1.1 GÉNERO <i>Capsicum</i>	2
1.2 <i>Capsicum chinense</i>	3
1.3 ASPECTOS BOTÁNICOS	4
1.4 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	5
1.5 METABOLISMO SECUNDARIO	5
1.5.1 CAPSAICINOIDES	8
1.6 SÍNTESIS DE FENILALANINA	9
1.7 SÍNTESIS DE VALINA	10
1.8 AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	12
1.9 DISEÑO DE CEBADORES	13
1.10 <i>Bst</i> POLIMERASA	14
1.11 MÉTODO LAMP	14
1.12 RT-LAMP UTILIZANDO TEMPLADO DE ARN	18
1.13 DETECCIÓN DE PRODUCTOS	18
1.14 TOLERANCIA DE LA REACCIÓN LAMP A INHIBIDORES Y SUSTANCIAS BIOLÓGICAS	19
1.15 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD	20
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	23
2.2 METODOLOGÍA	23
2.2.1 DISEÑO DE CEBADORES	23

2.2.2 EXTRACCIÓN DE ARN	25
2.2.3 TRATAMIENTO CON ADNasa I	26
2.2.4 SÍNTESIS DE ADNc	26
2.2.5 AMPLIFICACIÓN POR PCR	27
2.2.6 AMPLIFICACIÓN LAMP	28
2.2.7 DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN LAMP	29
2.2.7.1 ELECTROFORESIS	29
2.2.7.2 POR CALCEÍNA	29
CAPÍTULO III: RESULTADOS	31
3.1 EXTRACCIÓN DE ARN	31
3.2 DISEÑO DE LOS CEBADORES LAMP	33
3.3 DETERMINACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS CEBADORES	34
3.4 AMPLIFICACIÓN LAMP	39
3.5 SENSIBILIDAD DE LA AMPLIFICACIÓN LAMP	45
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	47
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	51
BIBLIOGRAFÍA	58

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Ruta propuesta para la biosíntesis de los capsaicinoides en el género <i>Capsicum</i>	8
Figura 1.2 Ruta biosintética de aminoácidos aromáticos en plantas.....	11
Figura 1.3 Síntesis de aminoácidos de cadena ramificada.....	13
Figura 1.4 Esquema de la disposición de los diferentes cebadores diseñados para la reacción LAMP.....	19
Figura 1.5 Estrategia experimental.....	24
Figura 3.1 Integridad de los ARN totales extraídos de placentas de <i>C. chinense</i>	32
Figura 3.2 Síntesis de fragmentos de ADT y ALS utilizando los cebadores externos F3-B3.....	35
Figura 3.3 Amplificación de ADT utilizando un gradiente de concentración de Mg^{2+}	36
Figura 3.4 Amplificación de ADT utilizando diferentes temperaturas de alineamiento.....	37
Figura 3.5 Amplificación de ADT y ALS, utilizando cebadores externos F3-B3...38	
Figura 3.6 Amplificación de ADT y ALS, utilizando los cebadores internos FIP-BIP.....	39

Figura 3.7 Amplificación LAMP de ADT, cebadores para ADT y 0.8 M betaína....	41
Figura 3.8 Amplificación LAMP de ADT a diferentes temperaturas de reacción...	42
Figura 3.9 Amplificación LAMP de ADT.....	43
Figura 3.10 Amplificación LAMP de ALS a diferentes temperaturas de reacción..	44
Figura 3.11 Amplificación LAMP de ALS.....	45
Figura 3.12 Amplificación por PCR de punto final de ADT.....	46
Figura 3.13 Amplificación LAMP de ADT empleando diluciones decrecientes de ADNc de <i>C. chinense</i>	47
Figura 3.14 Amplificación por PCR de punto final de ALS empleando diferentes concentraciones de ADNc de <i>C. chinense</i>	48
Figura 3.15 Amplificación LAMP de ALS empleando diluciones decrecientes de ADNc de <i>C. chinense</i>	49

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Principales capsaicinoides encontrados en <i>Capsicum spp.</i> y sus cantidades relativas.....	10
Cuadro 2.1 Cebadores diseñados para la reacción LAMP para las secuencias correspondientes a los genes que codifican para ADT y ALS con algunas de sus características fisicoquímicas.....	26
Cuadro 2.2 Cebadores diseñados para el PCR de punto final para las secuencias correspondientes a los genes que codifican para ADT y ALS con algunas de sus características fisicoquímicas.....	27
Cuadro 3.1 Concentración y características de los ARN totales extraídos.....	31
Cuadro 3.2 Concentración y características de los ADNc sintetizados.....	32

ABREVIATURAS

3SR	Replicación de secuencias auto-sustentadas
ACL	Proteína acarreadora de grupos acilo
ADT	Arogenato deshidratasa
ALS	Acetolactato sintasa
BCAT	Aminotransferasa de los aminoácidos ramificados
BIP	Cebadores internos anti-sentido
Ca3H	Cumarato 3 hidroxilasa
Ca4H	Ácido cinámico 4 hidroxilasa
CAPs	Capsaicinoides
CGMMV	Virus del mosaico verde moteado del pepino
COMT	Ácido caféico O-metiltransferasa
CM	Corismato mutasa
CMV	Virus del mosaico del pepino
CS	Capsaicinoide sintasa
dsDNA	ADN cadena doble
DEPC	Diethyl pirocarbonato
DST	Desaturasa
FAT	Tioesterasa
FAS	Ácido graso sintasa (complejo multienzimático)
FIP	Cebadores internos sentido
g	Gramo
IvDH α	Isovalerato deshidrogenasa- α
Kas	β -cetoacil sintasa
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por loops
μ M	Micromolar
mM	Milimolar

M	Molar
NASBA	Amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos
nm	Nanómetro
PAL	Fenilalanina amonio liasa
pAMT	Presunta aminotransferasa de la vainillina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Phe	Fenilalanina
PVY	Virus Y de la papa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa- RetroTranscriptasa
SDA	Amplificación de desplazamiento de hebra
ssDNA	ADN cadena sencilla
T _m	Temperatura media de fusión
TMV	Virus del mosaico del tabaco
ToCV	Virus de la clorosis del tomate
ToMV	Virus del mosaico del tomate
Val	Valin

RESUMEN

El tejido placentario de los frutos de *Capsicum chinense* Jacq. posee la maquinaria metabólica para sintetizar no sólo los capsaicinoides, compuestos que le confieren particulares características sensoriales y organolépticas, sino también sus aminoácidos precursores, valina y fenilalanina. En estudios previos, se demostró la presencia de los transcritos de los genes de las enzimas involucradas en la síntesis de estos compuestos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) *in situ*. Debido a la baja abundancia de los transcritos correspondientes a estas enzimas en las placentas, es deseable contar métodos más sensibles de detección, como la amplificación isotérmica mediada por loops (LAMP por loop-mediated isothermal amplification of DNA), la cual es entre 10 y 100 veces más sensible que la PCR. Su gran sensibilidad y especificidad se deben al uso de al menos cuatro cebadores que reconocen seis distintas regiones del ADN blanco.

Además de las características antes mencionadas, en esta técnica no es necesario el uso de termociclador, ya que la amplificación se lleva a cabo bajo condiciones isotérmicas con una gran eficiencia. Adicionalmente, los productos amplificados pueden ser detectados mediante turbidimetría, electroforesis o su unión a colorantes fluorescentes, como la calceína-Mn.

En el presente trabajo, se desarrolló y estandarizó un protocolo para la amplificación de secuencias de los genes que codifican para las enzimas arogenato deshidratasa (ADT) y acetolactato sintasa (ALS) por medio de la técnica LAMP, abriendo así el campo de su utilización para la detección de genes involucrados en rutas metabólicas presentes en tejidos vegetales.

ABSTRACT

Placental tissues from *Capsicum chinense* Jacq. possess the metabolic machinery to synthesize not only capsaicinoids, compounds that confer peppers their particular flavor, aroma and pungency, but also of their amino acidic precursors, valine and phenylalanine. Previous studies have demonstrated that transcripts for genes coding enzymes involved in their synthesis are present in this tissue through *in situ* polymerase chain reaction (PCR).

Since these transcripts are present in minimal quantities in the placentas, it is necessary to employ sensitive detection methods, such as the loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP), whose sensitivity ranges are 10 to 100 times higher than conventional PCR. Its high sensitivity can be ascribed to the use of at least four primers that recognize six distinct regions in the studied gene.

In addition to the above mentioned characteristics, it can also be said that in order to amplify the desired sequences, the use of a thermocycler is not required. Produced fragments can be detected through turbidity, electrophoresis or their coupling with fluorescent dyes, such as calcein-Mn,

In this work, a protocol for amplification of sequences of genes coding for ascorbate dehydrogenase (ADT) and acetolactate synthase (ALS) through LAMP was developed, opening its area of usage to detect genes involved in different metabolic pathways present in plant tissues.

INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Capsicum* son conocidas por la producción de frutos con características organolépticas particulares como el picor, debido al contenido de un tipo particular de alcaloides en el tejido placentario llamados capsaicinoides. Existen más de 20 diferentes tipos de capsaicinoides, entre los cuales la capsaicina y dihidrocapsaicina representan más del 90% de su contenido total. Los diferentes capsaicinoides son producto de la condensación de dos intermediarios provenientes de dos rutas metabólicas diferentes. Por un lado, la vainillilamina se forma a partir de la fenilalanina, la cual proviene de la ruta de síntesis de los aminoácidos aromáticos en la que la arogenato deshidratasa (ADT) constituye un punto de control determinante. Por otra parte, el 8-metil-6-nonenoil-CoA proviene de la valina, un aminoácido de cadena ramificada. La reacción de condensación del piruvato catalizada por la acetolactato sintasa (ALS) es fundamental para dirigir la síntesis hacia la formación de esta familia de aminoácidos. Se han publicado una cantidad importante de métodos de amplificación de secuencias que codifican genes involucrados en la ruta de síntesis de metabolitos secundarios en plantas, como, por ejemplo: PCR, RT-PCR, NASBA, SDA, entre otras. La técnica de amplificación isotérmica mediada por horquillas (loops) LAMP por su acrónimo en inglés; loop-mediated isothermal amplification of DNA), reportada por Notomi en el año 2000, representa una opción diferente para la amplificación y detección de secuencias que corresponden a genes de interés. La técnica LAMP utiliza entre 4 y 6 cebadores por cada secuencia, lo que le confiere características como sensibilidad, especificidad y fácil realización que la distiguen de las otras técnicas de amplificación disponibles. La sensibilidad de la técnica LAMP puede ser aprovechada para la detección de los transcritos que se encuentran en baja concentración que codifican para las

enzimas involucradas en la síntesis de los precursores de capsaicina en el tejido placentario de *Capsicum chinense* Jacq.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 GÉNERO *Capsicum*

El género *Capsicum* incluye plantas que producen frutos picantes y no picantes de gran importancia económica. Estos frutos poseen distintivas propiedades sensoriales, como son el aroma, color y sabor (Harishchandra *et al.*, 2012). México es el país del mundo que posee la mayor variedad genética de *Capsicum*; esta riqueza se debe, en gran parte, a la diversidad de climas y suelos, pero también a las prácticas tradicionales de cultivo que efectúan los pequeños productores, al utilizar las semillas de los frutos seleccionados de las plantas nativas (Fernández *et al.*, 2007). Dada la extensión del territorio y la variación de las condiciones ambientales, las diferentes regiones han desarrollado sus propias variedades. Por ejemplo, aún cuando en la península de Yucatán, los cultivares indígenas de *C. annum* están presentes, el chile habanero (*C. chinense*) es ampliamente preferido.

El chile habanero en Yucatán incluye variedades que difieren en color, tamaño y contenido de capsaicinoides (CAPs) (Castro-Concha *et al.*, 2014). En la ecología, una función de los CAPs es la de disuadir el ataque de mamíferos a las plantas que producen chiles picantes, pues al unirse estos compuestos a un termoreceptor localizado en las fibras nerviosas, genera una sensación incómoda de calor excesivo (Mazourek *et al.*, 2009).

Los chiles han sido usados como moneda, especia vegetal, medicina, así como para inducir sensaciones espirituales. Además, fue utilizado como tributo durante

el imperio Inca, donde los chiles eran utilizados como moneda de cambio. Su importancia durante las temporadas de cosecha en la América precolombina se confirma en las crónicas de Fray Bernardino de Sahagún (1569), donde relata la venta de una enorme diversidad de frutos en diferentes presentaciones en los mercados aztecas (DeWitt *et al.*, 1999).

Las investigaciones de los componentes químicos encontrados en el chile comenzaron a principios del siglo XIX. En 1846, Thresh cristalizó el ingrediente activo en los chiles, y lo llamó capsaicina. Nelson y Dawson determinaron la estructura de la capsaicina a principios del siglo XX (Barceloux *et al.*, 2009).

1.2 *Capsicum chinense*

El primer registro botánico de la especie en el Caribe apareció en el libro “*A Gardener’s and Botanist’s Dictionary*”, publicado por Phillip Miller en 1768, quien la identificó como *Capsicum angulofum* y describió como un chile del Caribe, con hojas arrugadas y fruto en forma de gorra o cachucha. Entre 1754 y 1759, el médico holandés Nikolaus von Jacquin hizo una expedición al Caribe con el fin de recolectar plantas para el emperador Francisco I y presentó una descripción del *C. chinense* en su libro “*Hortus Botanicus Vindobonensis*”, publicado en 1776. Fue Jacquin quién le dio la nomenclatura taxonómica de “chinense” o “sinense” a la especie. En su libro escribió que había “tomado el nombre de la planta de su sitio de origen”. La realidad es que Jacquin nunca estuvo en China en una excursión para recolectar plantas, mientras que su estancia y recolección de plantas en el Caribe está bien documentada. La nomenclatura “chinense” ha resultado un enigma en la literatura botánica, ya que no hay una explicación viable de esta calificación (Heiser *et al.*, 1964).

El chile es un producto que distingue a la gastronomía mexicana de las demás, siendo una hortaliza que nos confiere identidad cultural. Tiene su origen en las regiones tropicales y subtropicales de América. México es uno de los principales centros de origen y domesticación del género *Capsicum*, en particular de la especie *C. annuum*, como lo indican los vestigios arqueológicos de semillas encontradas en el valle de Tehuacán, Puebla, con una antigüedad de 8500 años. Se reconocen cinco especies domesticadas del género *Capsicum*: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* y *C. pubescens*, y más de veinte de tipo silvestre (Cazares *et al.*, 2005).

1.3 ASPECTOS BOTÁNICOS

Es una planta herbácea perenne con ciclo anual; su altura es variable, pudiendo oscilar entre los 75 y 120 cm. Tiene un tallo grueso, erecto y robusto, con crecimiento semideterminado. Sus hojas son simples, lisas, alternas y de forma lanceolada, de tamaño variable, lo mismo que su color, el cual puede presentar diferentes tonalidades de verde dependiendo de la variedad. Tiene una raíz de tipo pivotante, que profundiza de 0.40 a 1.20 m, con un sistema radicular bien desarrollado (Fernández *et al.*, 2007).

El fruto del chile habanero es una baya hueca en forma de trompo, con entre dos y ocho hojas modificadas que constituyen el aparato reproductor femenino de la flor. El fruto es muy picante y aromático, su color antes de alcanzar la madurez es verde; sin embargo, cuando el fruto madura presenta tonalidades que pueden ser de color amarillo, rojo, naranja, morado o café. Las paredes que dividen el interior del fruto son incompletas y en el extremo inferior, se unen para formar unas estructuras membranosas, comúnmente denominadas venas, las cuales se

insertan en la placenta, la cual posee una apariencia esponjosa de color blanco amarillento (Heiser *et al.*, 1964).

1.4 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Al chile habanero le corresponde la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta o Angiospermatophyta

Clase: Magnoliopsida o Dicotyledoneae

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Capsicum*

Especie: *Capsicum chinense* Jacq.

1.5 METABOLISMO SECUNDARIO

De forma general, los metabolitos secundarios son compuestos de baja masa molecular que no participan en el crecimiento y desarrollo del organismo que los produce ya que no tienen papeles fundamentales en los procesos de asimilación, respiración, transporte y diferenciación. No obstante, tienen importancia ecológica, ya que participan en los procesos de adaptación al entorno. Algunas de estas interacciones son el establecimiento de simbiosis con otros organismos, como la atracción de insectos polinizadores y dispersores de semillas. Otra peculiaridad de los metabolitos secundarios es la de encontrarse en una sola especie o en un grupo taxonómico relacionado a ésta, como es, por ejemplo, la capsaicina que se encuentra únicamente en las plantas del género *Capsicum* (Taiz *et al.*, 1998). Con frecuencia, su producción es limitada, y esto depende principalmente de la especie que lo sintetiza, así como del estado fisiológico de la planta. Estos compuestos poseen un patrón de acumulación tejido-específico (Verpoorte *et al.*, 2002).

Algunos de estos metabolitos secundarios tienen características estructurales y actividades biológicas particulares, lo que permite su clasificación en diferentes grupos. Uno de los grupos más conocidos son los alcaloides o “compuestos aparentemente básicos” (“alkali-like”). Éstos son comúnmente compuestos aromáticos con nitrógeno heterocíclico y con actividad fisiológica en organismos diferentes a los que los producen. Los alcaloides son clasificados con base en su precursor molecular en común, basándose en la ruta biosintética utilizada para la síntesis de la molécula. Desde el punto de vista estructural, los alcaloides se dividen en tres tipos: alcaloides verdaderos, protoalcaloides y pseudoalcaloides. Los alcaloides verdaderos y los protoalcaloides provienen de aminoácidos,

mientras que los pseudoalcaloides no se derivan de estos compuestos (Aniszewski *et al.*, 2007). Los CAPs se encuentran conectados con las rutas metabólicas de los aminoácidos, son derivados de precursores o productos de aminoácidos y pueden también ser el resultado de reacciones de aminación y transaminación.

La formación de conjugados acilo de vainillilamina o alcoholes vainillínicos con varios tipos de alquenos y ácidos alcanóicos es un rasgo único en las plantas del género *Capsicum*. La vainillilamina, núcleo aromático de la molécula, proviene de la fenilalanina (Ochoa-Alejo y Salgado-Garciglia, 1992), mientras que la parte alifática, o cadena acil graso, de los aminoácidos valina o leucina (Suzuki *et al.*, 1981) (Figura 1.1). Los frutos del chile se caracterizan por la presencia de conjugados vainillínicos del tipo amida, ausente o reemplazados por sus éster-isómeros no picosos en el caso de los capsinoides en el chile dulce (Fattoruso *et al.*, 2008).

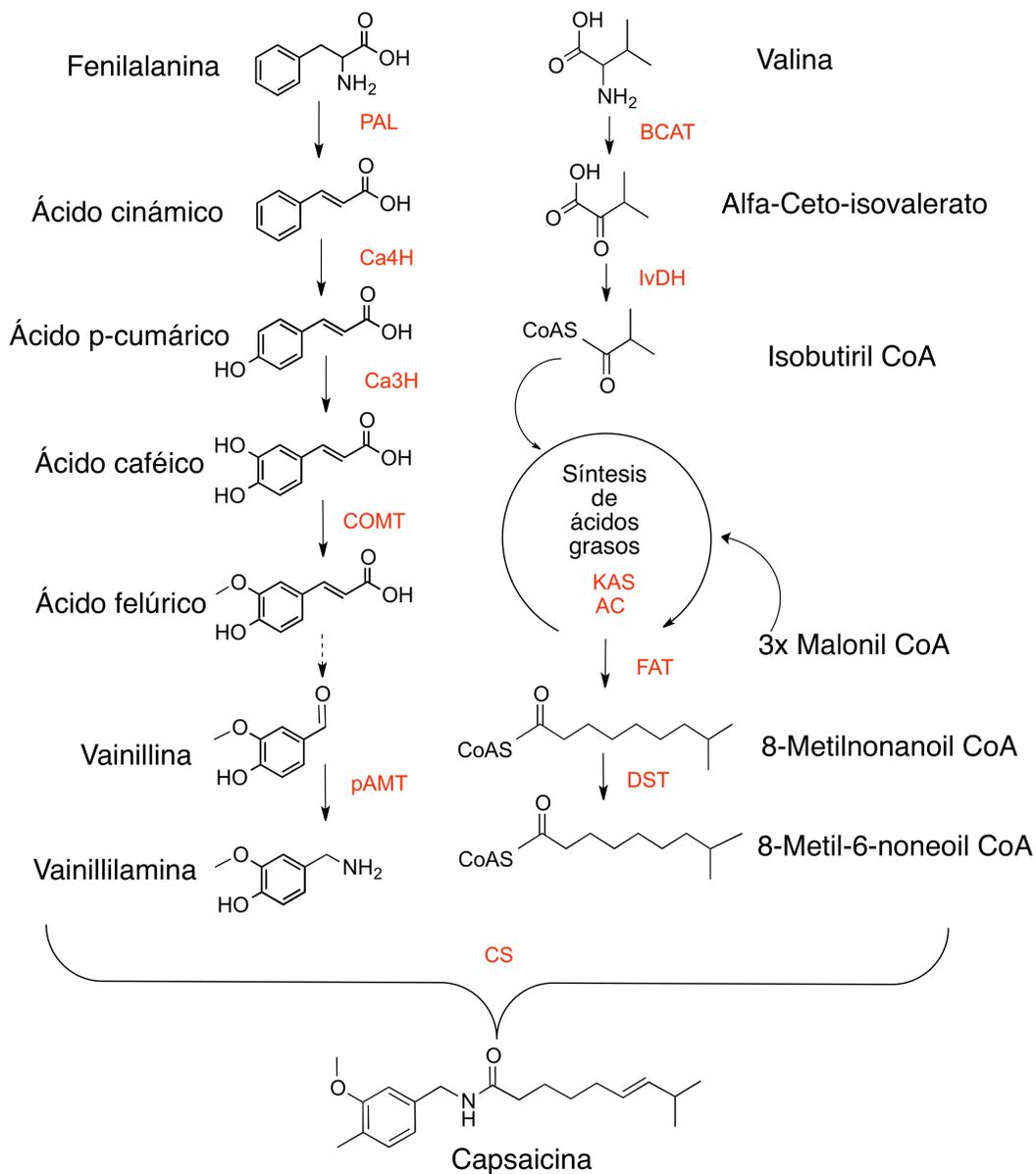
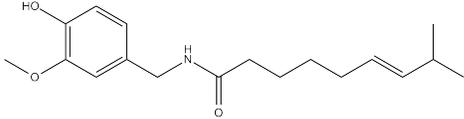
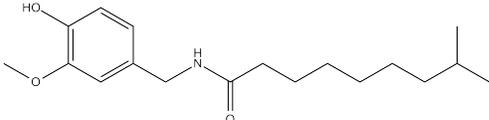
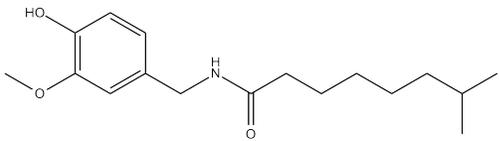
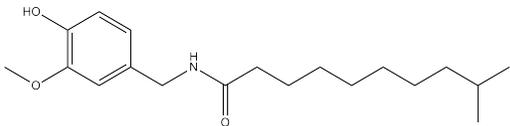
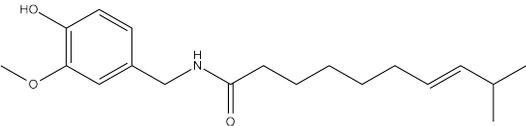


Figura 1.1 Ruta propuesta para la biosíntesis de los capsaicinoides en el género *Capsicum*. **PAL**, fenilalanina amonio liasa; **Ca4H**, ácido cinámico 4 hidroxilasa; **Ca3H**, cumarato 3 hidroxilasa; **COMT**, ácido caféico O-metiltransferasa; **pAMT**, presunta aminotransferasa de la vainillina; **BCAT**, aminotransferasa de los aminoácidos ramificados; **IvDH α** , isovalerato deshidrogenasa; **Kas**, β -cetoacil sintasa; **ACL**, proteína acarreadora de grupos acilo; **FAT**, tioesterasa; **DST**, desaturasa; **CS**, capsaicinoide sintasa. La flecha punteada representa reacciones por caracterizar (Vázquez *et al.*, 2007).

1.5.1 CAPSAICINOIDES

Químicamente, la capsaicina y sus análogos pueden definirse como amidas ácidas derivadas de la condensación de la vainillilamina y una cadena acil graso, de longitud entre 9 y 11 carbonos (Curry *et al.*, 1999). Aún cuando existen más de diez diferentes estructuras de CAPs, la capsaicina y dihidrocapsaicina representan más del 90% del contenido total (Cuadro 1.1.). Éstos sólo difieren en una insaturación presente en el carbono 9 de la cadena acil graso (González *et al.*, 2010). La biosíntesis, así como la acumulación de CAPs, están determinadas por factores genéticos y ambientales, que dan lugar a diferencias en el grado de picor (González *et al.*, 2010; Monforte *et al.*, 2010). Entre los beneficios reportados en el consumo de capsaicina resaltan la estimulación de la actividad metabólica y el incremento en la oxidación de ácidos grasos. En humanos, este vanilloide puede suprimir las sensaciones orexigénicas (apetito-estimulantes). Este compuesto puede exhibir propiedades antitumorales y funcionar como vasodilatador, facilitando la dispersión del calor. Estudios de morbilidad sugieren que el consumo de comidas picantes que contienen chile puede aumentar la longevidad (Smutzer *et al.*, 2016).

Cuadro 1.1 Principales capsaicinoides encontrados en *Capsicum spp.* y sus cantidades relativas (Susuki *et al.*, 1981).

Nombre	Cantidad Relativa	Estructura
Capsaicina	69%	
Dihidrocapsaicina	22%	
Nordihidrocapsaicina	7%	
Homodihidrocapsaicina	1%	
Homocapsaicina	1%	

1.6 SÍNTESIS DE FENILALANINA

La ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos está presente en todas las plantas. La L-fenilalanina (Phe) no es sólo un bloque de construcción para la síntesis de proteínas, sino también un precursor de más de 8000 compuestos fenólicos que constituyen entre 30 y 45% de la materia orgánica de las plantas y tiene un profundo impacto en el crecimiento, desarrollo, reproducción y defensa al estar incluida en componentes estructurales, que proveen a la planta de soporte mecánico, barreras contra ataques y otros compuestos con múltiples utilidades. A pesar del importante papel de la Phe en la fisiología y metabolismo de las plantas,

el conocimiento de su biosíntesis y regulación continúa fragmentado. La Phe se deriva del corismato, el producto final de la ruta del shikimato. El corismato es convertido por la corismato mutasa (CM) a pefenato. El pefenato sufre una transaminación a arogenato, el cual es luego deshidratado y descarboxilado a Phe por la arogenato deshidratasa (ADT, EC 4.2.1.91) (Figura 1.2).

En el género *Capsicum*, la expresión en placenta de los genes de la ruta de los fenilpropanoides está correlacionada positivamente con la acumulación de CAPs, hecho que fundamenta el origen fenilpropanoide de la fracción de vainillina (Díaz *et al.*, 2004). Castro-Concha y colaboradores reportaron las actividades de las enzimas involucradas en la síntesis de Phe, CM y ADT durante el desarrollo del fruto. Se establecieron dos picos en la actividad de ADT: uno en una etapa temprana (10-17 DPA) y otro más en una fase tardía (35-37 DPA) (Castro-Concha *et al.*, 2016).

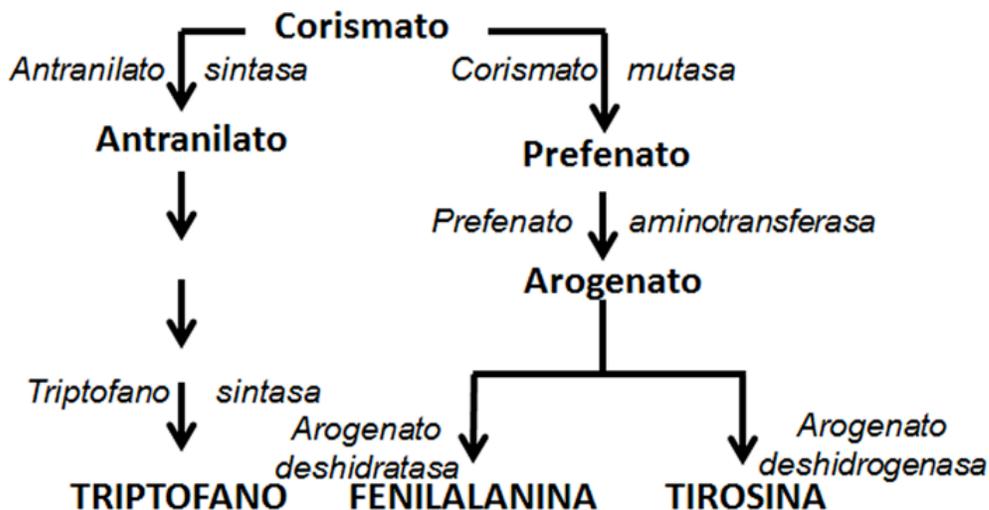


Figura 1.2 Ruta biosintética de aminoácidos aromáticos en plantas.

1.7 SÍNTESIS DE VALINA

La acetolactato sintasa (ALS o AHAS; EC 2.2.1.6) es la enzima común en la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada y cataliza dos reacciones paralelas: la condensación de dos moles de piruvato para formar acetolactato y la condensación de un mol de piruvato con un mol de 2-oxobutirato para formar acetohidroxitirato. La ALS está regulada por retroalimentación negativa por los aminoácidos de cadena ramificada: valina (Val), leucina e isoleucina (Eberlein *et al.*, 1997; Figura 1.3). La cadena lateral acilo (ácido 8-metil-6-nonenoico) se forma a partir de Val. Este aminoácido es inicialmente desaminado por la enzima transferasa de los aminoácidos ramificados (BCAT, EC 2.6.1.42), dando lugar al α -cetoisovalerato. Posteriormente, este último se convierte en isobutiril-CoA, por acción de la isovalerato deshidrogenasa (IVDH, EC 1.3.99.10); el isobutiril-CoA es procesado por el complejo multienzimático ácido graso sintasa (FAS, EC 2.3.1.85), que lo convierte en 8-metil-6-nonenoil-CoA. FAS está compuesto por tres proteínas: la α -cetoacil sintetasa (KAS, EC 2.3.1.41), que cataliza la condensación de grupos malonilo con isobutiril-CoA; una proteína acarreadora de grupos acilo (ACL, EC 2.3.1.39), que se encarga de transportar los grupos malonilo y una tioesterasa (FAT, EC 3.1.2.1 y 3.1.2.2), que libera al ácido graso sintetizado. En este proceso se pierde una molécula de CO₂ en cada ciclo de condensación de grupos malonilo y la cadena acil graso es liberada después del tercer ciclo de condensación. Inmediatamente, se sintetiza el ácido graso 8-metil-6-nonenoil-CoA, a través de la enzima acil-CoA sintasa, a partir del ácido 8-metil-6-nonenoico (Aluru *et al.*, 2003). Finalmente, de la convergencia de las dos rutas, se obtiene la capsaicina. El último paso es catalizado por una aciltransferasa llamada capsaicinoide sintasa (Stewart *et al.*, 2007; Figura 1.1).

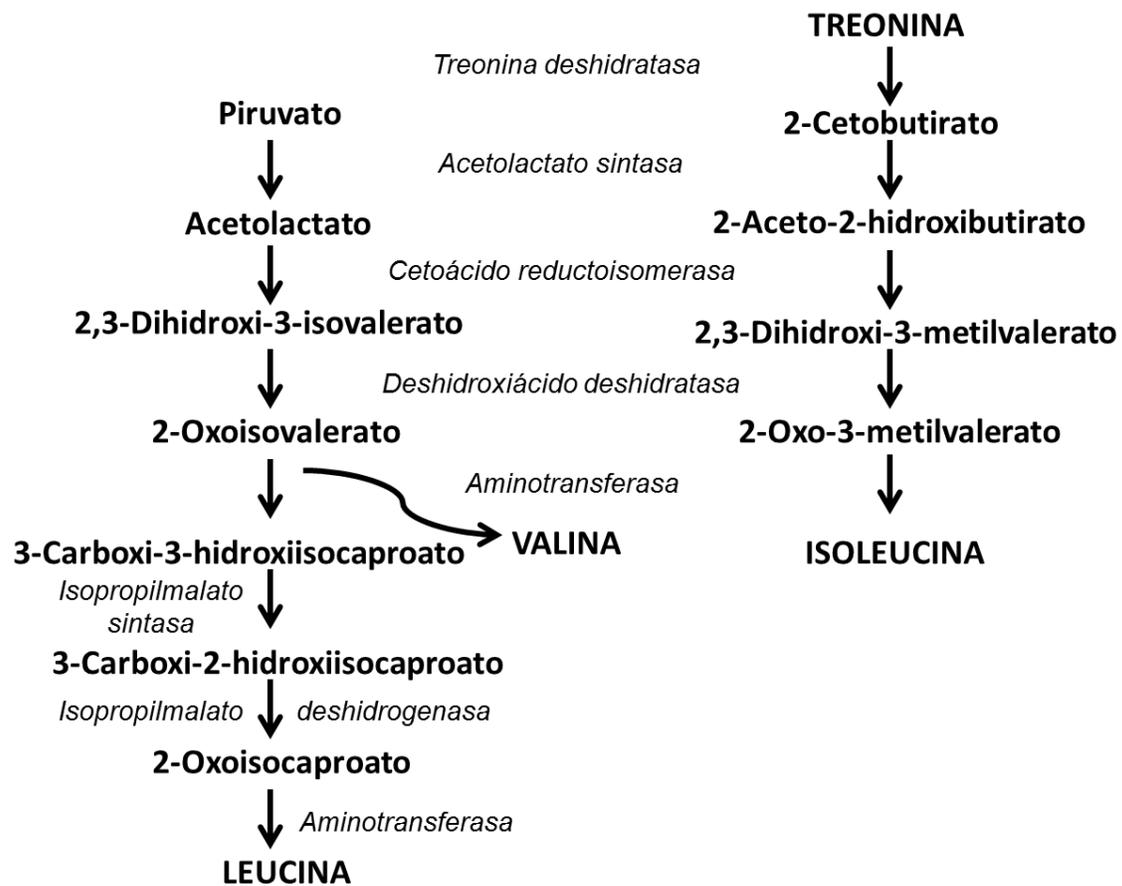


Figura 1.3 Síntesis de aminoácidos de cadena ramificada.

1.8 AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se han desarrollado muchos métodos para la amplificación de ácidos nucleicos, entre los que se incluyen a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), replicación de secuencias auto-sustentadas (3SR) y amplificación por desplazamiento de hebra (SDA). La reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) es la más utilizada en sus diferentes variedades: transcripción inversa (RT-PCR), PCR anidado (nested PCR) y PCR múltiple (multiplex PCR) (Parida *et al.*, 2008). Debido a su aparente

simplicidad, se utiliza como una aproximación estándar en biotecnología y laboratorios de diagnóstico médico. De cualquier forma, la técnica de PCR posee desventajas intrínsecas, como el requerimiento de un termociclador, especificidad insuficiente y una relativa baja eficiencia de amplificación. Tomando en cuenta estas desventajas, se han desarrollado nuevas técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (Mori *et al.*, 2001).

La amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP) fue reportada por primera vez en 2000 y desde entonces, ha sido objeto de múltiples mejoras. Esta metodología utiliza la *Bst* polimerasa en lugar de la *Taq* Pol comúnmente utilizada en PCR, ya que puede despalar las hebras del ADN, lo cual le permite generar productos con estructuras variables en tamaño, así como la formación de estructuras secundarias, producto de la auto-interacción de los amplicones. Estos productos pueden ser visualizados de forma directa, ya que al formarse grandes cantidades de pirofosfato de magnesio se genera turbidez en el tubo de reacción, o bien, de forma indirecta por medio de la adición de calceína unida a manganeso, la cual cuando se une al magnesio produce un compuesto fluorescente al ser expuesto a la luz UV.

Los esfuerzos en investigación y desarrollo de la tecnología LAMP se han enfocado en dos grandes áreas. Una es su aplicación práctica en el diagnóstico clínico, incluyendo su papel en el mejoramiento de ensayos ya existentes. Han sido desarrolladas reacciones para detectar una gran diversidad de patógenos y su eficiencia ha sido comparada con otras reacciones, como la PCR. La segunda área es la investigación sobre una mayor simplificación del ensayo LAMP. los esfuerzos actuales de investigación básica se centran ahora en probar las distintas características de la técnica LAMP debido a su simplicidad y rapidez de uso. es necesaria una amplia mejorade la tecnología LAMP para integrar este método en pruebas genéticas simples que puedan ser utilizadas en el diagnostico en el

momento y lugar requeridos (Mori *et al.*, 2013). Nagamine y colaboradores (Nagamine *et al.*, 2002) reportaron la reducción del tiempo de la reacción LAMP a menos de la mitad de la reacción original, gracias a la adición de un par de cebadores extras (Yang *et al.*, 2009).

En los siguientes apartados se presentan los principales aspectos a considerar para la aplicación de esta tecnología, desde el diseño de cebadores hasta el montaje de la reacción.

1.9 DISEÑO DE CEBADORES

Los cebadores para las reacciones LAMP pueden ser escogidos para cualquier secuencia blanco de ácidos nucleicos, pudiendo ser altamente específicos (detectar un solo blanco) o universales (detectando muchas secuencias blanco relacionadas). El diseño de los cebadores puede ser llevado a cabo manualmente, pero resulta más eficiente el uso de los softwares disponibles, como por ejemplo: PrimerExplorer v4 (Eiken Chemical), LAMP Designer (Primer Biosoft), etc.

El diseño de un conjunto de cebadores altamente sensibles y específicos es crucial para el desempeño de la amplificación por LAMP. La selección de la secuencia de interés para el diseño de los cebadores es realizada utilizando la plataforma Primer Explorer (LAMP primer designing support software program, Net Laboratory, Japan, <http://venus.netlaboratory.com>), después de considerar la composición de bases, el contenido de GC y la formación de estructuras secundarias (Liu *et al.*, 2012).

Existen ciertas características que deben ser consideradas en el diseño de los cebadores para LAMP. Algunas son las siguientes:

-
- Los cebadores internos no pueden contener regiones ricas en AT en ambos extremos terminales.
 - El contenido de GC debe ser de entre 50 y 60%.
 - En el caso de secuencias ricas en GC, la temperatura de fusión debe ser de entre 60-65°C. En el caso de secuencias ricas en AT, ésta debe ser de entre 55-60°C.
 - Los cebadores diseñados no deben formar estructuras de bucle o loops secundarias.

1.10 *Bst* POLIMERASA

Ésta es un ADN polimerasa termofílica moderada que tiene un intervalo de temperatura óptima entre 37-70°C. Fue aislada por primera vez por Stenesh y Roe en 1972. Kaboev *et al.* (1981) purificaron a la *Bst* ADN polimerasa, que posee una masa molecular de 76 kD con actividades de exonucleasa 5'-3' y 3'-5'. Dado que la proporción de actividades exonucleasa/polimerasa es muy baja, se considera que la actividad de exonucleasa encontrada podría tratarse de una posible contaminación (Aliota *et al.*, 1996).

Esta enzima polimeriza cadenas de ADN con la particular capacidad de desplazar la hebra, es decir la capacidad de separar los enlaces existentes en los nucleótidos que componen la cadena de ADN. Son ejemplos de este tipo de enzimas la *Bst* polimerasa y la *Bsm* polimerasa, aisladas de *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus smithii*, respectivamente. Ambas enzimas tienen la propiedad única de desplazamiento de la hebra y catalizan la polimerización de ADN 5'-3', pero no tiene actividad exonucleasa 5'-3' (Dhama *et al.*, 2014). La actividad 5'-3' degrada la cadena dúplex en el extremo 5'. Esto le permite a la polimerasa de *E. coli* remover los cebadores de los segmentos de Okazaki y

reemplazarlos con ADN. La 5'-3' exonucleasa también permite la escisión de lesiones, como dímeros de timina, durante la reparación del ADN (Aliota *et al.*, 1996).

1.11 MÉTODO LAMP

LAMP es un método de amplificación de ácidos nucleicos bajo condiciones isotérmicas que da lugar a grandes cantidades de ADN que pueden alcanzar más de 45 µg de ADN por 50 µL de reacción (Nagamine *et al.*, 2001). Este método puede amplificar secuencias de interés presenten en diez o menos copias en un período de una hora (Notomi *et al.*, 2000).

Se fundamenta en la síntesis auto-cíclica por desplazamiento de la hebra de ADN, realizada por una ADN polimerasa con una alta actividad de desplazamiento de cadena, y el diseño de un par de cebadores internos y otro par de externos (Notomi *et al.*, 2000). En los pasos iniciales de la reacción LAMP, todos los cebadores son utilizados, pero posteriormente, durante la reacción de ciclación, sólo los internos se emplean para la síntesis por desplazamiento de cadena. Los cebadores internos (llamados cebador cuesta arriba FIB y cebador cuesta abajo BIP, respectivamente) están formados cada uno por dos secuencias distintas, complementarias a las secuencias en sentido y anti-sentido a la del ADN blanco. Los cebadores internos FIP están compuestos por las secuencias F1c y F2, mientras que los BIP lo están por las secuencias B1c y B2 (Figura 1.4). Por otro lado, los cebadores externos son complementarios a la región representada como F3c y B3c, respectivamente. Esta composición de cebadores permite formar la estructura inicial para la amplificación exponencial (Notomi *et al.*, 2000). El desempeño de la reacción radica en el diseño de los cebadores, los cuales deben poseer características muy específicas de complementariedad y número de bases.

Los cebadores se diseñan con base en ocho regiones del gen de interés: F3c, F2c, F1 y FLP en el extremo 3' y el B1, B2, B3 y BLP en el extremo 5'. Además de lo ya mencionado para el diseño de los cebadores es importante considerar que la distancia entre el final 5' de F2 y B2 debe ser de 120-180 pb, y entre F2 y F3, es de 0-20 pb. Lo mismo debe ser considerado para B2 y B3 (Dhama *et al.*, 2014).

La rápida progresión secuencial de la reacción de amplificación de LAMP contribuye a la alta eficiencia de amplificación. Los productos de amplificación poseen una estructura basada en repeticiones invertidas, en donde cadenas idénticas se encuentran conectadas en direcciones opuestas y estructuras en forma de coliflor (Asian Pac *et al.*, 2015). Aunado a la resistencia de las enzimas utilizadas a la presencia de posibles inhibidores de la reacción de amplificación en la muestra, es factible simplificar los procesos de extracción de ácidos nucleicos. La reacción LAMP, en general, es relativamente resistente a los efectos de inhibidores presentes en las especies analizadas. Aún cuando los métodos de extracción de ácidos nucleicos utilizados son los mismos que se han utilizado en reportes previos, una simple técnica de procesamiento puede asegurar la presencia del material genético a analizar (Notomi *et. al* 2015).

Al combinar aspectos como simplicidad, rapidez y precisión, la metodología LAMP está siendo empleada en un rango amplio de aplicaciones clínicas, alimentarias y ambientales. Estudios evaluando la sensibilidad de LAMP sugieren que ésta es hasta diez veces más alta comparada con la técnica de amplificación convencional de PCR (Zhou *et al.* 2014). Aún con los escasos requerimientos y condiciones en esta metodología deben ser considerados dos aspectos: primero, debe tenerse especial cuidado para evitar la contaminación con productos previamente amplificados. Se sugiere que este método para la detección de genes puede ser más accesible no sólo en el campo de la medicina, sino también en otras áreas aún no exploradas, como el monitoreo ambiental, la evaluación de alimentos y la

agricultura (Tomita *et al.*, 2008). Dado el alto rango de amplificación, cualquier traza de estructuras de ADN/LAMP con forma de multímeros será fácilmente reamplificada, llevando a la formación de falsos positivos, y segundo, todos los reactivos deben ser mantenidos en hielo durante su manejo previo al tratamiento de las muestras a 60-75°C, con el fin de evitar un inicio no específico de la reacción y amplificación multimérica de los cebadores. Por esta razón, sería importante desarrollar un “hot start” LAMP, los cuales existen para PCR, para facilitar el proceso de la reacción en condiciones mínimas (Peyrefitte *et al.*, 2008).

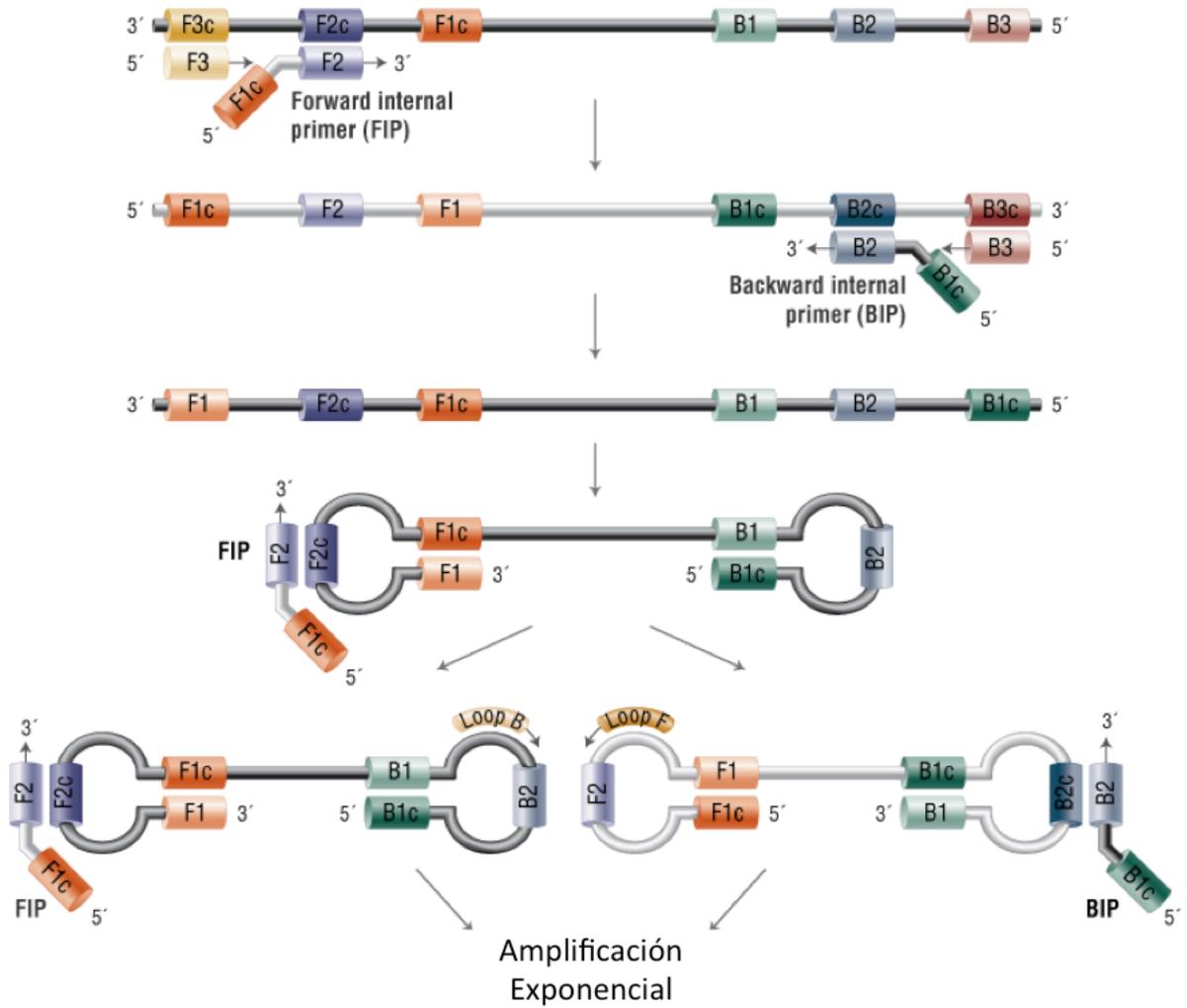


Figura 1.4 Esquema de la disposición de los diferentes cebadores diseñados para la reacción LAMP.

1.12 RT-LAMP UTILIZANDO TEMPLADO DE ARN

Un beneficio de la técnica LAMP es su inherente compatibilidad con la transcripción inversa (RT). Por una parte, el buffer utilizado en la técnica LAMP contiene una alta concentración de magnesio óptimo para la actividad de retro-transcriptasa. Así también los productos de amplificación de LAMP son cortos (<200 pb), obviando la necesidad de tiempos prolongados de incubación para sintetizar largos segmentos de ADNc. Estos factores hacen innecesario la desnaturalización del ADNc molde, permitiendo una reacción RT-LAMP en un solo paso, en donde una mezcla conteniendo ARN molde, transcriptasa inversa, la *Bst* polimerasa y los cebadores pueden ser incubada a la temperatura de reacción (Notomi *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la *Bst* polimerasa posee actividad de retro-transcriptasa (RT), aunque esta actividad es variable y mucho menor a la RT nativa. De cualquier manera, enzimas de tipo *Bst* modificadas mediante bioingeniería (ej. *Bst 2.0*, *Bst 3.0*, New England Biolabs) han incrementado su actividad de retro-transcriptasa y pueden ser utilizadas sin la adición de la enzima RT. Los cebadores para la RT-LAMP son diseñados tomando las mismas consideraciones tomadas para moldes de ADN (Tanner *et al.*, 2014).

1.13 DETECCIÓN DE PRODUCTOS

La forma más común y simple de detectar los productos amplificados es a simple vista. En las reacciones LAMP y RT-LAMP, el ADN es sintetizado en grandes cantidades (>50X el rendimiento de PCR), generando iones pirofosfato (pirofosfato de magnesio) como un producto alterno insoluble, que da lugar a turbidez en el tubo de reacción (Bhat *et al.*, 2013). El grado de turbidez puede ser medido por diferentes métodos y ofrece determinaciones indirectas para cuantificar los productos (Mori *et al.*, 2001). Un sistema de detección indirecta involucra la adición de una forma iónica de manganeso y calceína al tubo de reacción, lo cual produce un complejo fluorescente (Bhat *et al.*, 2013). El manganeso se une fuertemente al pirofosfato formado, y el magnesio es liberado para formar un complejo con la calceína, la cual produce un complejo fluorescente verde brillante, luego de ser excitado con luz visible o UV (Fischbach *et al.*, 2015). En la luz visible, el color cambia de naranja a amarillo-verdoso, el cual puede ser visto a simple vista luego de una amplificación exitosa. La reacción de LAMP puede ser monitoreada en tiempo real mediante fluorescencia, turbidez, luminiscencia o colorantes sensibles a metales (Tanner *et al.*, 2014).

Una alternativa a las técnicas indirectas son los métodos directos de detección de los productos LAMP mediante el uso de colorantes que se intercalan en las cadenas dobles de ADN. SYBR Green I emite una débil señal de fluorescencia en presencia de una cadena simple de ADN (ssDNA), pero emite una fuerte en presencia de una doble cadena de ADN (dsDNA) y es por esto, que es un candidato ideal para ser utilizado como método de detección de los productos amplificados por técnicas LAMP (Fischbach *et al.*, 2015; Keizerweerd *et al.*, 2014). La presencia del pirofosfato permite de igual manera la evaluación visual de los productos de la reacción en una electroforesis en gel de agarosa (Fukuta *et al.*, 2003).

1.14 TOLERANCIA DE LA REACCIÓN LAMP A INHIBIDORES Y SUSTANCIAS BIOLÓGICAS

Desde el desarrollo de la técnica de PCR para la detección molecular, han sido utilizadas y reportadas varias modificaciones, incluyendo el PCR cuantitativo en tiempo real ó qPCR. Existen trabajos que estiman los beneficios de LAMP cuando es comparada con PCR, y se ha encontrado una mayor tolerancia a inhibidores y sustancias biológicas en la técnica LAMP. Esto sugiere que la extracción de ADN podría ser omitida al utilizar la técnica LAMP. Lo anterior supone un ahorro en el tiempo y costo para la detección de secuencias de ácidos nucleicos (Kaneko *et al.*, 2006). De cualquier forma, como cualquier método de amplificación de ácidos nucleicos es sensible a la presencia de inhibidores en la muestra, como, por ejemplo, calcio, ácidos húmicos, y altas cantidades de sangre, suero u orina. LAMP es una buena opción para detectar la amplificación en muestras impuras, pero deben ser tomadas consideraciones sobre la naturaleza de la muestra. La extracción de ácidos nucleicos es un paso importante en la mayoría de los protocolos, y es recomendada para las reacciones LAMP en que se utilizan muestras clínicas y agronómicas (Tanner *et al.*, 2014). Se han reportado posibles variaciones en la temperatura de amplificación que mantienen resultados consistentes en un rango de 57 a 67°C, manejando un tiempo de incubación de 60 minutos, mientras que por debajo de ese rango de temperatura se observó un decremento en la sensibilidad y se reporta una nula amplificación a una temperatura de 48°C (Francois *et al.*, 2011).

1.15 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

La sensibilidad de la RT-LAMP ha sido evaluada mediante el uso de diluciones seriadas del ARN de plantas de sandías infectadas con el virus del mosaico verde moteado del pepino (CGMMV), en donde se presentaron reacciones positivas desde diluciones de 7.2 ng/μL. Se establecieron comparaciones entre RT-LAMP y RT-PCR, indicando que RT-LAMP es 100 veces más sensible que RT-PCR (Li *et al.*, 2013). Se han descrito pruebas de especificidad utilizando extractos de ARN obtenidos de plantas de tomate infectadas con el virus de la clorosis del tomate (ToCV), comparándolo con aquellos obtenidos de plantas infectadas con otros virus como el virus del mosaico del pepino (CMV), el virus del mosaico del tabaco (TMV), el virus Y de la papa (PVY) y el virus del mosaico del tomate (ToMV). Los productos de la reacción LAMP fueron digeridos utilizando una enzima de restricción para confirmar su especificidad (Zhao *et al.*, 2015).

1.16. RECAPITULACIÓN DE LOS ANTECEDENTES.

De lo anterior se desprende que la LAMP ofrece ventajas para la detección de ARN presentes en un bajo número de copias como es el caso de los transcritos involucrados en la ruta de síntesis de los precursores de la capsaicina en *C. chinense*. Si bien la abundancia de éstos ya se ha estimado anteriormente, el empleo de la LAMP permite una menor necesidad de instrumentación (termociclador) y su naturaleza isotérmica permite además ser potencialmente más eficientes y menos agresivas en el caso de posibles trabajos *in situ*, en los que se podría prevenir el deterioro del tejido durante el proceso de amplificación. Por ello, en este trabajo se propone que la sensibilidad presentada por esta técnica de amplificación LAMP representa una excelente alternativa en el caso de la necesidad de detectar de forma sensible y específica secuencias relacionadas en el metabolismo primario y secundario en plantas.

OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia de transcritos de dos enzimas marcadoras de la síntesis de los aminoácidos precursores de la capsaicina en placentas de *C. chinense* Jacq. mediante técnicas de amplificación isotérmica mediada por horquillas (loops).

OBJETIVOS PARTICULARES

Establecer los parámetros óptimos para la amplificación y detección de los transcritos de genes que codifican para las enzimas acetolactato sintasa (ALS) y arogenato deshidratasa (ADT) en extractos placentarios de *Capsicum chinense* Jacq., utilizando la técnica de amplificación LAMP.

Evaluar la sensibilidad de la técnica de amplificación LAMP comparándola con la técnica de amplificación por PCR.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental se muestra en la figura 1.7. En breve, ésta consiste en la obtención y selección de los frutos, así como la extracción del tejido placentario. A continuación, se realizó la extracción del RNA de este tejido, para ello se utilizó el protocolo de Rubio-Piña y Vázquez-Flota. Se sintetizó el ADNc partiendo del ARN extraído para utilizarlo como molde o templado para las siguientes pruebas de amplificación. Se seleccionaron para este análisis los transcritos correspondientes a las secuencias que corresponden a los genes de ADT y ALS por ser determinantes en la ruta de síntesis de los precursores de los capsaicinoides.

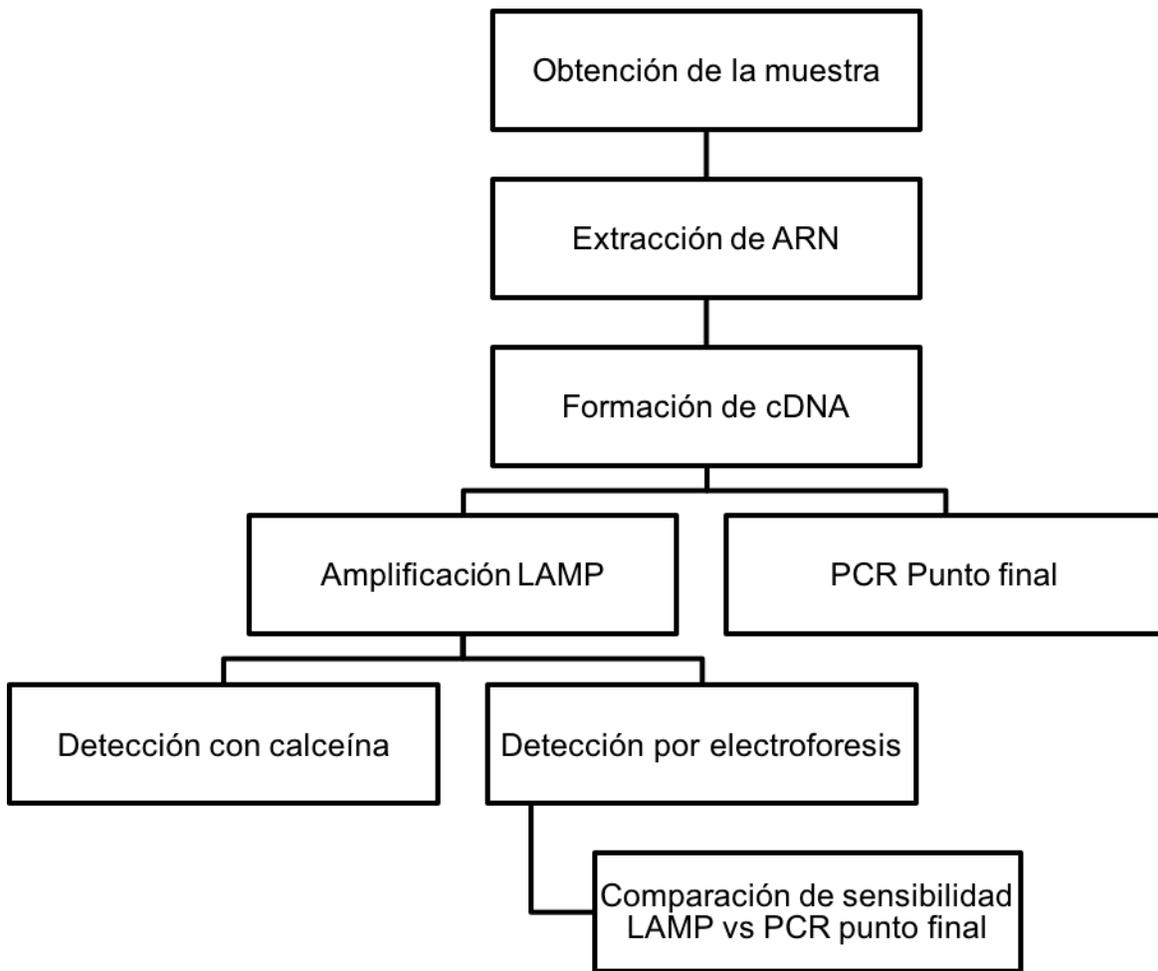


Figura 1.7 Estrategia experimental.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se emplearon frutos de plantas de la variedad naranja crecidas bajo condiciones de invernadero en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Los chiles se cosecharon de 25 a 30 días post-antesis (DPA) y fueron trasladados al laboratorio para su procesamiento.

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 Diseño de cebadores

Se diseñaron cebadores para la amplificación LAMP con base en las secuencias reportadas en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> para la arogenato deshidratasa (EU616545.1) (*Capsicum annuum* putative arogenate dehydratase mRNA) y acetolactato sintasa (EU616547.1) (*Capsicum annuum* putative acetolactate synthase mRNA), obteniendo las secuencias de oligonucleótidos presentadas en el cuadro 2.1.

Cuadro 2.1 Cebadores diseñados para la reacción LAMP para las secuencias correspondientes a los genes que codifican para ADT y ALS con algunas de sus características fisicoquímicas.

Gen	Cebador	Longitud (pb)	Tm (°C)	Contenido GC (%)	Secuencia
<i>adt4</i>	FIP	39	70.3°C	59.0	5'-CCG GCT GCT GAG AAA CAA CCT CGA GCT GAT TGG CAG AGC-3'
	BIP	41	68.7°C	51.2	5'-AAC TGG TGG TGC TGG TGA GAT TTC GGA ACC AGA TCC AGA CT-3'
	F3	19	56.1°C	57.9	5'-CCG GCG AGT TAC AAC TTC G-3'
	B3	19	56.1°C	52.6	5'-AGC GGC TTA GGG AGA TTG T-3'
<i>als1</i>	FIP	39	71.4°C	59.0	5'-ATG CAC ACA CCA GGG AAC CCC TGC CAC GTC ATG AGC AAG-3'
	BIP	42	70.2°C	57.1	5'-GCT ACG AAT CTC GTT AGC GGG CCC TGA CCC GTA ATA GCC ACT-3'
	F3	19	55.1°C	52.6	5'-CAG GCA TTG ACT CGT TCG A-3'
	B3	19	57.1°C	57.9	5'-ACC AAT CAT CCT CCT CGG C-3'

Los cebadores empleados en la PCR de punto final cuando se comparó la sensibilidad de este método con el de amplificación LAMP se diseñaron con base en las mismas secuencias utilizadas para el diseño de los cebadores LAMP (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2 Cebadores diseñados para el PCR de punto final para las secuencias correspondientes a los genes que codifican para ADT y ALS con algunas de sus características fisicoquímicas.

Gen	Cebador	Longitud (pb)	Tm (°C)	Secuencia
<i>adt4</i>	F	20	64.5°C	5'-AACCAATAATTCCACGAACG-3'
	R	21	66.6°C	5'-CATTTGCATCGTCCACTAGCC-3'
<i>als1</i>	F	22	69.5°C	5'-TGCCATCCCTCCACAATATGCT-3'
	R	19	68.3°C	5'-TCTTCCAACAGCCGCACCT-3'
Actina	F	20	57.6°C	5'- AAGATTTGGCATCATACTT-3'
	R	21	61.2°C	5'- CTGGCATAAAGAGACAACACC-3'

2.2.2 Extracción de ARN

Se pulverizó 1 g de tejido congelado con nitrógeno líquido y 250 mg de polivinilpirrolidona (PVPP) hasta obtener un polvo fino. Se transfirió el polvo a tubos Eppendorf estériles y se añadieron 5 mL del amortiguador de extracción [38% (v/v) fenol, 0.8 M tiocianato de guanidina, 0.4 M tiocianato de amonio, 0.1 M acetato de sodio pH 5, 5% (v/v) glicerol, 0.1% (p/v) rojo fenol]. Se agitaron vigorosamente en un vortex y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Se eliminó el material insoluble del homogeneizado por centrifugación (14,000 x g durante 10 min a 25°C), se transfirió el sobrenadante resultante a nuevos tubos estériles y se agregó 1 mL de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se agitó el tubo vigorosamente durante 15 seg e incubó a temperatura ambiente durante 2 min.

Después, se separaron las fases mediante centrifugación a 14,000 x g durante 10 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se repitió la extracción con cloroformo: alcohol isoamílico. Posteriormente, se depositó la fase acuosa en un tubo nuevo y se mezcló con 0.625 volúmenes de 8 M LiCl. Se incubó a 4°C durante toda la noche. El ARN total fue separado por centrifugación a 17,000 x g durante 30 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, luego se lavó cuidadosamente el sedimento, en primer lugar, con 3 mL de 3 M LiCl y luego, con 1 mL de etanol al 70%. Se centrifugó la muestra a 17,000 x g a 4°C durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se secó el sedimento a temperatura ambiente. El sedimento fue resuspendido en 300 µL de agua tratada con DEPC.

Una vez separado el ARN por precipitación, se adicionaron 0.1 volúmenes de 3 M acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol al 100% e incubó a -80°C durante 1 h. Se centrifugó la muestra a 17,000 x g a 4°C durante 20 min. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado dos veces con 1 mL de etanol al 70% a -20°C. Se secó el sedimento a temperatura ambiente y se suspendió en 50-100 µL de agua tratada con DEPC. Se realizó un tratamiento con ADNasa I (Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2008).

2.2.3 Tratamiento con ADNasa I

Con el fin de eliminar el ADN genómico presente en el extracto de ARN se empleó el kit DNase I, RNase free (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

2.2.4 Síntesis de ADNc

El ARN resultante fue utilizado como molde para la generación de ADNc mediante transcripción inversa. Para la síntesis de ADNc, se usó el paquete H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), conforme a las instrucciones del proveedor.

2.2.5 Amplificación por PCR

La mezcla de reacción incluyó 5 μL 10X PCR buffer (Invitrogen) [200 mM Tris-HCl (pH 8.4) y 500 mM KCl], 1 μL 50 mM MgCl_2 [concentración final: 2 mM], 1 μL de 10 mM dNTP's [concentración final: 0.4 mM], 1 μL cebadores sentido [concentración final: 20 pg/ μL], 1 μL de cebadores antisentido [concentración final: 20 pg/ μL], 1 μL ADNc, 0.5 μL Taq polimerasa en un volumen total de 25 μL , utilizando $\text{H}_2\text{O}/\text{DEPC}$ para completarlo.

2.2.6 Amplificación LAMP

Una vez obtenidos los ADNc, éstos fueron amplificados mediante la reacción con la *Bst* polimerasa. Se prepararon soluciones de los cebadores principales 40 μM FIP, 40 μM BIP, 5 μM F3 y 5 μM B3, partiendo de una concentración inicial de 100 μM .

Para preparar la solución 25X de los cebadores principales, se diluyen 40 μL de las soluciones FIP y BIP (100 μM), así como 5 μL de F3 y B3 (100 μM) en 10 μL de $\text{H}_2\text{O}/\text{DEPC}$. Para preparar 100 μL de la solución 25X de los cebadores loop, se diluyeron 10 μL de FL y BL (100 μM) en 80 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{DEPC}$.

La mezcla de reacción se realizó en un tubo de PCR, el cual contenía: 2.5 μL 10X Isothermal Amplification Buffer II (20 mM Tris-HCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 150 mM KCl, 2 mM MgSO_4 , 0.1% Tween®20, pH 8.8@25°C), 2 μL 100 mM MgSO_4 [concentración final: 8 mM], 2 μL 10 mM dNTP's [concentración final: 0.8 mM], 1 μL 40 μM cebadores FIP y BIP [concentración final: 1.6 μM], 1 μL 5 μM cebadores F3 y B3 [concentración final: 0.2 μM], 4 μL 5 M betaína [concentración final: 0.8 mM], 0.25 μL ADNc y 0.25 μL *Bst* polimerasa 3.0 [2 U/ μL], completando a un volumen total de 25 μL con H_2O /DEPC.

Con la finalidad de obtener una mayor especificidad en la detección de las secuencias de interés, se estableció como paso previo a la reacción una etapa de pre-incubación de 5 min a 95°C una vez adicionados todos los componentes de la mezcla de reacción con excepción de la *Bst* polimerasa. Al terminar este periodo, el tubo se puso en hielo durante 2 minutos y se agregó la *Bst* polimerasa para la etapa de incubación.

La mezcla de reacción fue incubada durante 15 min a 64°C en el caso de ADT y 65°C para ALS. Al finalizar este tiempo, el tubo se incubó durante 10 min a 80°C para detener la reacción.

La preparación de las diferentes soluciones se realizó a baja temperatura para evitar una posible amplificación no deseada. Es determinante para la ausencia de falsos negativos que las áreas donde se prepararon los reactivos fueran zonas diferentes a las utilizadas para la preparación de las mezclas de reacción LAMP.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Los resultados se han planteado de la siguiente manera: primero la extracción del material genético que será utilizado en ambas pruebas de amplificación y para comprobar la especificidad de la reacción. Posteriormente se procedió a la síntesis de ADNc para utilizar este como molde o templado para la amplificación de las secuencias que corresponden a los genes de ADT y ALS. Seguido esto, se evaluó la eficiencia de los cebadores diseñados para estas mismas secuencias, tanto los internos (FIP-BIP) así como los externos (F3-B3) para la técnica LAMP mediante PCR de punto final. Una vez comprobada su funcionalidad se procedió a la amplificación de las secuencias que corresponden a los genes de interés de este trabajo bajo la técnica LAMP. Se realizó la detección de los productos mediante electroforesis y mediante la utilización de calceína. Posteriormente se evaluó la sensibilidad de la técnica LAMP comparándola con la técnica de amplificación de PCR de punto final, utilizando cebadores diseñados para esta técnica para las mismas secuencias.

3.1 EXTRACCIÓN DE ARN

Se realizaron extracciones de ARN a partir de tejido placentario de *C. chinense* y de hojas de *B. oleracea* y se determinó, en ambas muestras, tanto su concentración como la presencia de contaminantes. Se observó que el ARN, en los dos casos, se encontraba en una concentración satisfactoria para poder ser utilizado como molde para la síntesis de ADNc.

La relación de absorbancias A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} se utilizan para determinar la presencia de contaminantes fenólicos o proteicos en una muestra. Los rangos aceptables son 1.8 y 2.0 para ADN y ARN, respectivamente. La relación de

absorbancias A_{260}/A_{230} es generalmente mayor a la de A_{260}/A_{280} , por lo que un resultado menor a estos valores, indica la presencia de contaminantes.

Con base en los datos presentados (Cuadro 3.1), se concluye que las muestras de ARN extraídos tenían la calidad adecuada para ser utilizados como moldes para la siguiente fase.

Cuadro 3.1 Concentración y características de los ARN totales extraídos.

Especie	Concentración (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
<i>Capsicum chinense</i>	1578.6	2.11	2.13
<i>Brassica oleracea</i>	2058	2.06	2.08

En la Figura 3.1, se constató la integridad del ARN, que fue utilizado como templado para la síntesis de ADNc, después de haber realizado una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se observó la presencia de las dos bandas mayoritarias de ARNr y la ausencia de “barridos” que podría deberse a la hidrólisis de esta macromolécula.

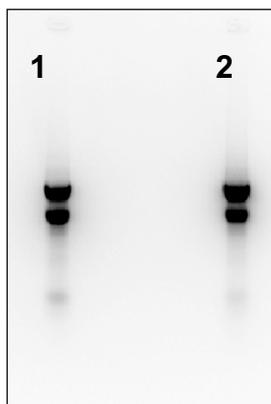


Figura 3.1 Integridad de los ARN totales extraídos de placentas de *C. chinense* (carril 1) y hojas de *B. oleracea* (carril 2).

A partir del material extraído, se procedió a la síntesis de ADNc, el cual fue utilizado como molde para la realización de los experimentos posteriores. En el Cuadro 3.2, se presentan las concentraciones y características de los ADNc obtenidos.

Cuadro 3.2 Concentración y características de los ADNc sintetizados.

Especie	Concentración (ng/ μ L)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
<i>Capsicum chinense</i>	1190.3	1.68	1.98
<i>Brassica oleracea</i>	988.6	1.94	1.94

3.2 DISEÑO DE LOS CEBADORES LAMP

Para la generación de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la técnica LAMP se utilizaron las secuencias reportadas en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para ADT (EU616545.1:1-1284 *Capsicum annuum* putative arogenate dehydratase mRNA, complete cds) y para ALS (EU616547.1_cds_ACF17639.1_1 [protein=putative acetolactate synthase]). Estas fueron ingresadas en la plataforma <https://primerexplorer.jp> para la generación de diferentes propuestas, de entre las cuales se escogieron las parejas de cebadores más adecuadas, tomando en cuenta el criterio de baja formación de dímeros PrimerIDdG/dimmer. Se obtuvieron valores de -1.83 para ADT y -2.27 para ALS, lo que indica una menor probabilidad de la formación de dímeros.

ADT4 EU616545.1				dimer (minimum) dG=-1.83	
label	5'pos	3'pos	Tm	GCrate	Sequence
F3	154	172	60.17	0.58	CCGGCGAGTTACAACTTCG
B3	332	350	60.28	0.53	AGCGGCTTAGGGAGATTGT
FIP					CCGGCTGCTGAGAAACAACC- CGAGCTGATTGGCAGAGC
BIP					AACTGGTGGTGCTGGTGAGATT- TCGGAACCAGATCCAGACT
F2	193	210	59.96	0.61	CGAGCTGATTGGCAGAGC
F1c	233	253	64.93	0.57	CCGGCTGCTGAGAAACAACCT
B2	307	325	59.2 -	0.53	TCGGAACCAGATCCAGACT
B1c	264	285	64.14	0.5	AACTGGTGGTGCTGGTGAGATT

ALS EU616547.1				dimer (minimum) dG=-2.27	
label	5'pos	3'pos	Tm	GCrate	Sequence
F3	215	232	60.49	0.61	GTTTTGCCCTGACGAGC
B3	378	395	60.87 -	0.61	GCGAATACGCCACCTTGC
FIP					GCAAAGACGTCGGTAACCCCT- GAAAAGGCTGCGACGTTCT
BIP					CTGGCGGTGCTTCAGTGGAG- TCATGACGTGGCAGGACAT
F2	236	254	60.18	0.53	GAAAAGGCTGCGACGTTCT
F1c	276	296	64.34	0.57	GCAAAGACGTCGGTAACCCCT
B2	359	377	60.8	0.53	TCATGACGTGGCAGGACAT
B1c	302	321	65	0.65	CTGGCGGTGCTTCAGTGGAG

3.3 DETERMINACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS CEBADORES

En primera instancia, se determinó la funcionalidad de los cebadores diseñados para ADT y ALS. Es por esto, que se utilizaron los cebadores externos F3 y B3 en una PCR de punto final, utilizando como molde el ADNc de *C. chinense* (Figura 3.2). En el caso de actina, utilizada como testigo positivo, se encontró la presencia de una sola banda del tamaño esperado (185 pb). Es de mencionarse que en el caso de ALS se lograron apreciar dos bandas, una de ellas del tamaño esperado (202 pb), pero esto no ocurrió para ADT, donde se observaron múltiples bandas entre 180 y 1000 pb))

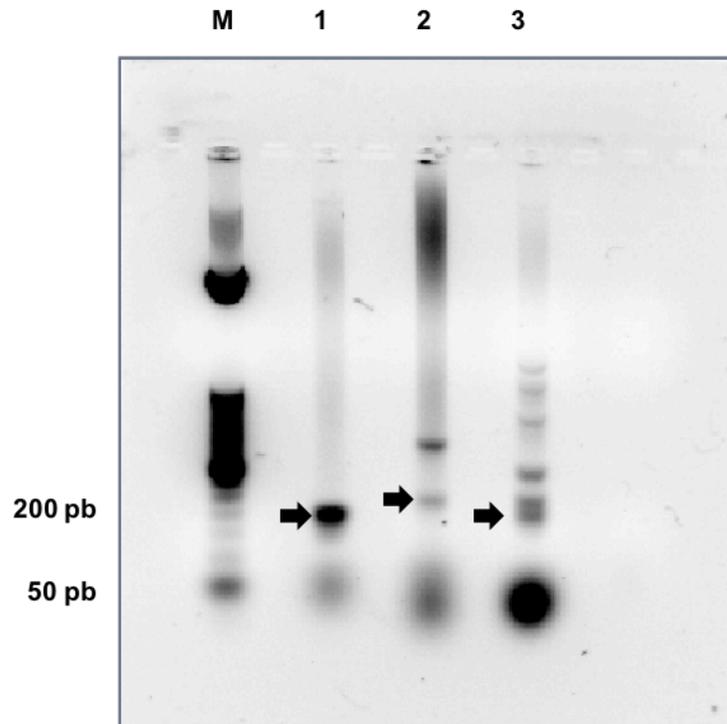


Figura 3.2 Síntesis de fragmentos de ADT y ALS utilizando los cebadores externos F3-B3. M) Marcador 50 pb; 1) Actina (185 pb); 2) ALS (202 pb); 3) ADT (180 pb). Condiciones de

termociclación: activación, 3 min a 94°C; desnaturalización, 45 seg a 94°C; alineamiento, 30 seg a 54°C; extensión, 30 seg a 72°C; extensión final, 10 min a 72°C.

Con base en estos resultados, se decidió enfocarse en la búsqueda de las condiciones óptimas de amplificación de la secuencia que corresponde al fragmento F3-B3 de ADT, en específico a la temperatura de alineamiento y la concentración de Mg^{2+} .

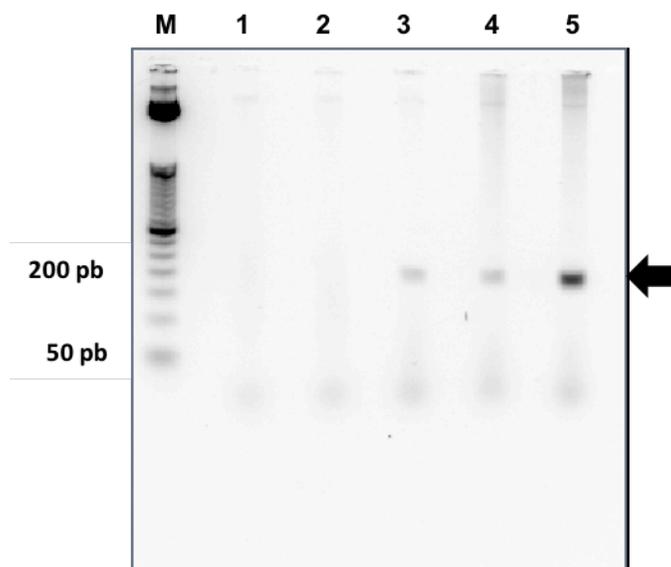


Figura 3.3 Amplificación de ADT utilizando un gradiente de concentración de Mg^{2+} , manteniendo la temperatura de alineamiento a 54°C con los cebadores F3 y B3. M) Marcador 50 pb; 1) Sin $MgCl_2$; 2) 1 mM $MgCl_2$; 3) 2 mM $MgCl_2$; 4) 3 mM $MgCl_2$; 5) 4 mM $MgCl_2$. Condiciones de termociclación: activación, 3 min a 94°C; desnaturalización, 45 seg a 94°C; alineamiento, 30 seg a 54°C; extensión, 30 seg a 72°C; extensión final, 10 min a 72°C.

Se observó una banda con adecuada intensidad y del tamaño esperado de 180 pb, cuando se usó una concentración de 4 mM $MgCl_2$ (Figura 3.3).

Otro factor que se varió fue la temperatura de alineamiento para mejorar la amplificación de la secuencia, manteniendo fijas las otras variables (cebadores, molde y concentración de $MgCl_2$) (Figura 3.4).

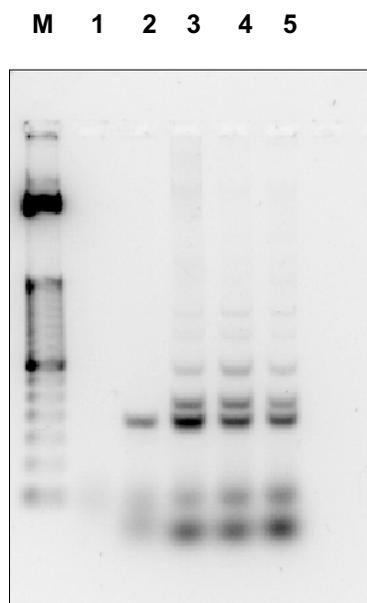


Figura 3.4 Amplificación de ADT utilizando diferentes temperaturas de alineamiento, manteniendo fija la concentración de Mg^{2+} y los cebadores F3 y B3. M) Marcador 50 pb; 1) Sin cebadores; 2) Actina (185 pb); 3) 54°C; 4) 57°C; 5) 60°C. Condiciones de termociclación: activación, 3 min a 94°C; desnaturalización, 45 seg a 94°C; alineamiento, 30 seg a 54-60°C; extensión, 30 seg a 72°C; extensión final, 10 min a 72°C.

No se encontró una mejora en la eliminación de bandas inespecíficas durante la amplificación al aumentar la temperatura de alineamiento (Figura 3.4), por lo que solamente se incrementó el tiempo del ciclo de alineamiento de 30 a 40 segundos, manteniendo las demás variables sin cambios.

Cuando se realizó la amplificación empleando los cebadores externos ahora para ALS y las condiciones determinadas para ADT, se pudieron observar bandas de intensidad y tamaño esperados (202 bp). Por lo anterior, se comprueba la funcionalidad de los cebadores diseñados para la detección de la secuencia que corresponde al gen que codifica para ALS, utilizando las mismas condiciones de amplificación por PCR de punto final.

En la figura 3.5, se presentan los resultados de las PCR para la amplificación de ADT y ALS, usando las condiciones óptimas de amplificación para cada gen.

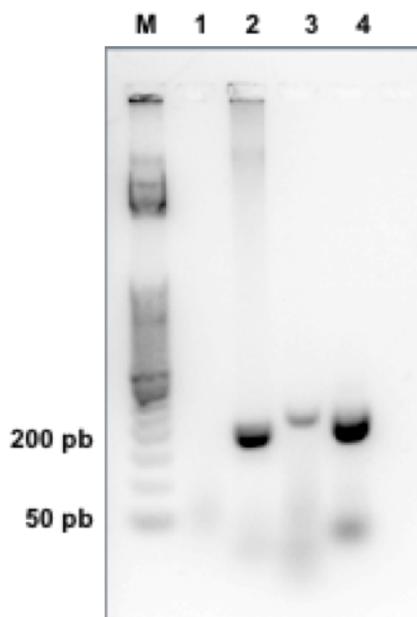


Figura 3.5 Amplificación de ADT y ALS, utilizando cebadores externos F3-B3 en las condiciones determinadas en los experimentos anteriores. M) Marcador 50 pb; 1) Sin cebadores, 2) Actina (185 pb); 3) ALS (202 pb); 4) ADT (180 pb). Condiciones de termociclación: activación, 3 min a 94°C; desnaturalización, 45 seg a 94°C; alineamiento, 40 seg a 54°C; extensión, 30 seg a 72°C; extensión final, 10 min a 72°C.

Después de considerar los criterios para el cálculo de la mejor temperatura de alineamiento para los cebadores FIP y BIP (cebadores internos), se procedió a aumentar esta temperatura a 64°C para ADT y 59°C para ALS y así corroborar su funcionalidad mediante PCR de punto final. Como puede notarse en la Figura 3.6, se logró la amplificación adecuada de las secuencias que corresponden a ADT y ALS, utilizando los cebadores FIP-BIP.

De estos resultados se puede concluir que tanto los cebadores externos F3-B3 como los internos FIP-BIP funcionan adecuadamente al amplificar segmentos de longitudes esperadas para ADTy ALS (180 y 202 pb).

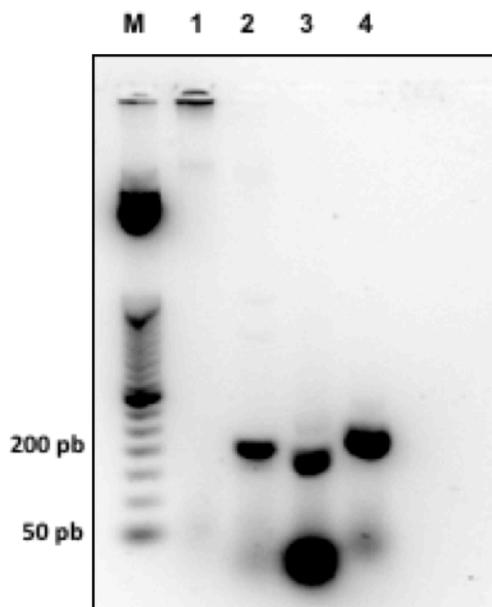


Figura 3.6 Amplificación de ADT y ALS, utilizando los cebadores internos FIP-BIP correspondientes. M) Marcador 50 pb; 1) Sin cebadores; 2) Actina (185 pb); 3) ADT (180 pb); 5) ALS (202 pb). Condiciones de termociclación: activación, 3 min a 94°C; desnaturalización, 45 seg a 94°C; alineamiento, 40 seg a 64°C para ADT y 59°C para ALS; extensión, 30 seg a 72°C; extensión final, 10 min a 72°C.

3.4 AMPLIFICACIÓN LAMP

Una vez evaluada la funcionalidad de los cebadores diseñados para detectar las secuencias de ADT y ALS, por medio de PCR de punto final, se procedió a realizar su amplificación ahora por medio de la técnica de amplificación mediada por loops (horquillas), LAMP.

Los productos de esta reacción, después de ser separados en un gel de agarosa, se presentan como un barrido característico tipo escalera (Figura 3.7), donde cada banda corresponde a segmentos de diversos tamaños, en contraste con las bandas únicas que podrían esperarse en una PCR de punto final.

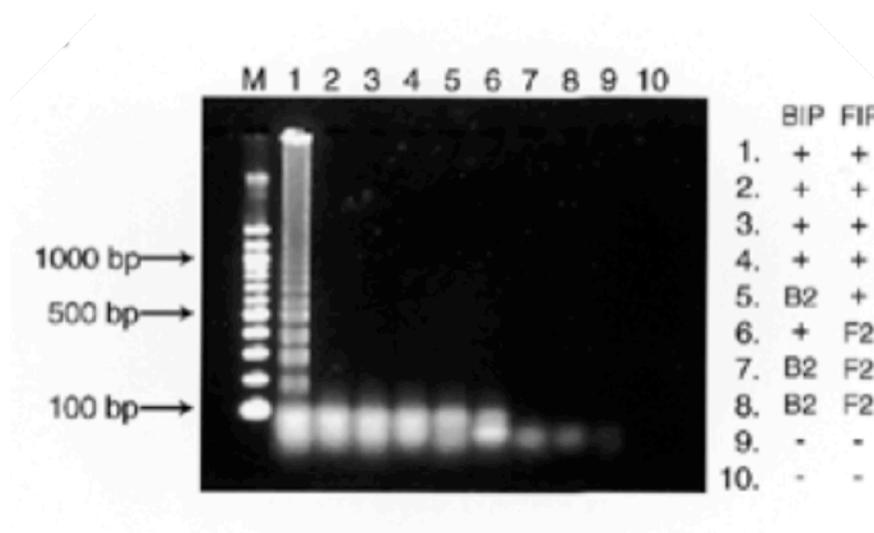


Figura 3.7 Amplificación LAMP presentada en la evaluación de cebadores por Notomi *et al.*, 2000

Un aspecto que debe cuidarse es el grado de astringencia en la interacción de los cebadores con el molde. Esta característica dependerá de la temperatura de alineamiento, la que evitará las interacciones inespecíficas.

La presencia de betaína (N,N,N-trimetilglicina) o sales de tetracil-amonio funcionan mejorando la capacidad de desplazamiento de hebra de la *Bst* polimerasa al

disminuir la T_M de los productos durante el proceso de amplificación. Cuando se evaluaron diferentes concentraciones de betaína para establecer la óptima para mejorar el funcionamiento de la polimerasa, se encontró que la condición recomendable era la adición de 0.8 M betaína a la reacción (Figura 3.7).

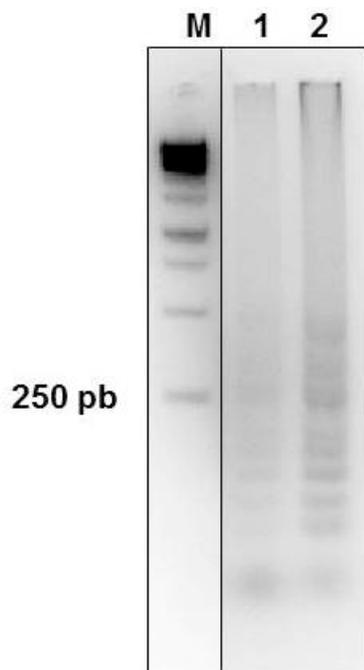


Figura 3.8 Amplificación LAMP de ADT, cebadores para ADT y 0.8 M betaína. M) Marcador 1 Kb; 1) Sin ADNc de *C. chinense* y 2) Con ADNc de *C. chinense*. Temperatura de reacción: 60°C, tiempo de incubación: 15 min.

Con el fin de establecer las condiciones de temperatura óptimas para el funcionamiento de la *Bst* polimerasa en la amplificación de ADT, se probaron temperaturas entre 62 y 66 °C con incrementos de un grado manteniendo fijo el tiempo de incubación en 15 minutos. En total fueron cinco condiciones y de los resultados obtenidos en la Figura 3.8, se eligió la temperatura de 64°C para la reacción.

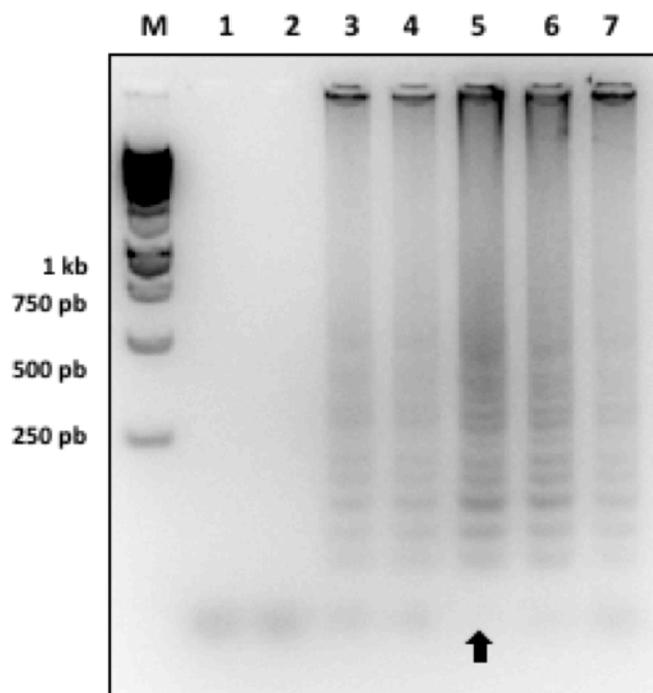


Figura 3.9 Amplificación LAMP de ADT a diferentes temperaturas de reacción, tiempo de incubación 15 minutos. M) Marcador 1 kb, 1) Sin ADNc de *C. chinense*, 62°C; 2) Con ADNc de *B. oleracea*, 62°C; 3) Con ADNc de *C. chinense*, 62°C; 4) con ADNc de *C. chinense*, 63°C; 5) Con ADNc de *C. chinense*, 64°C; 6) Con ADNc de *C. chinense*, 65°C; 7) con ADNc de *C. chinense*, 66°C.

Una vez determinadas las condiciones óptimas para el funcionamiento de la *Bst* polimerasa en la amplificación LAMP de la ADT, se ensayó la detección cualitativa de la acción de esta polimerasa mediante el uso de calceína. La presencia de fluorescencia en este ensayo indicaba que el magnesio se había liberado del pirofosfato formado en la reacción y se había unido a la calceína, siendo éste un método indirecto para probar el éxito de la amplificación.

En el panel A de la Figura 3.9, se puede observar la amplificación de ADT por medio de LAMP en placentas de *C. chinense*. Los productos de la reacción fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa (Fig. 3.9 A). En paralelo, se evaluó la respuesta fluorescente en el tubo donde se llevó a cabo la reacción de amplificación, indicando el correcto funcionamiento de la polimerasa (Fig. 3.9 B).

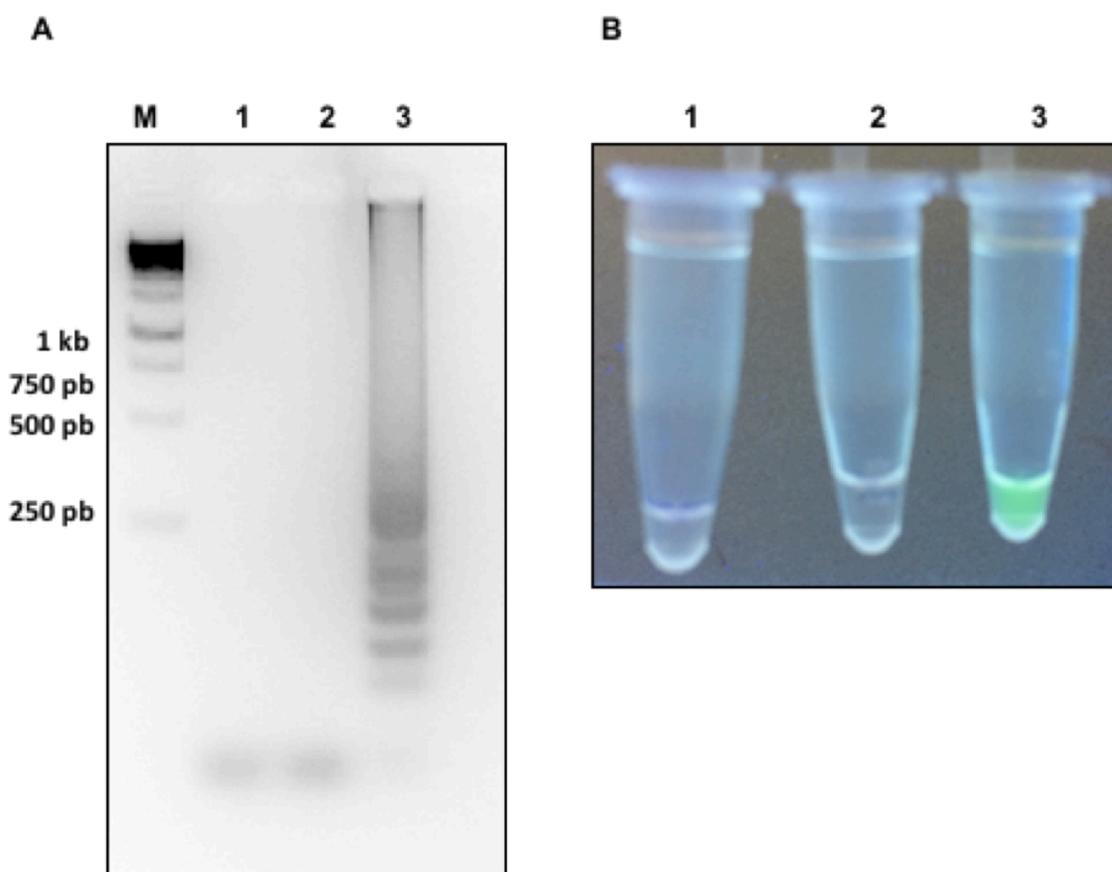


Figura 3.10 Amplificación LAMP de ADT. **Panel A:** M) Marcador 1 kb; 1) Sin ADNc de *C. chinense*; 2) Con ADNc de *B. oleracea*; 3) Con ADNc de *C. chinense*. **Panel B:** Detección de la amplificación con calceína. 1) Sin ADNc de *C. chinense*; 2) Con ADNc de *B. oleracea*; 3) Con ADNc de *C. chinense*. Temperatura de reacción: 64°C, tiempo de incubación: 15 min.

También se determinó la temperatura óptima de reacción para la polimerasa *Bst* utilizando los cebadores para ALS, la cual resultó ser 65°C (Figura 3.10). Así mismo, se comprobó por el método indirecto empleando calceína, la correcta amplificación de ALS (Figura 3.11).

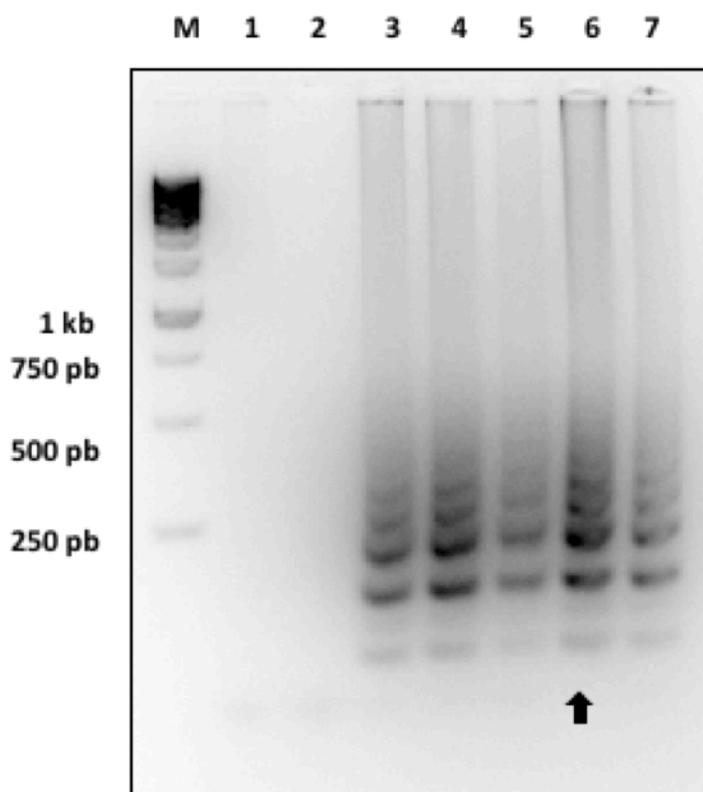


Figura 3.11 Amplificación LAMP de ALS a diferentes temperaturas de reacción, tiempo de incubación 15 minutos. M) Marcador 1 kb, 1) Sin ADNc de *C. chinense*, 62°C; 2) Con ADNc de *B. oleracea*, 62°C; 3) Con ADNc de *C. chinense*, 62°C; 4) con ADNc de *C. chinense*, 63°C; 5) Con ADNc de *C. chinense*, 64°C; 6) Con ADNc de *C. chinense*, 65°C; 7) con ADNc de *C. chinense*, 66°C.

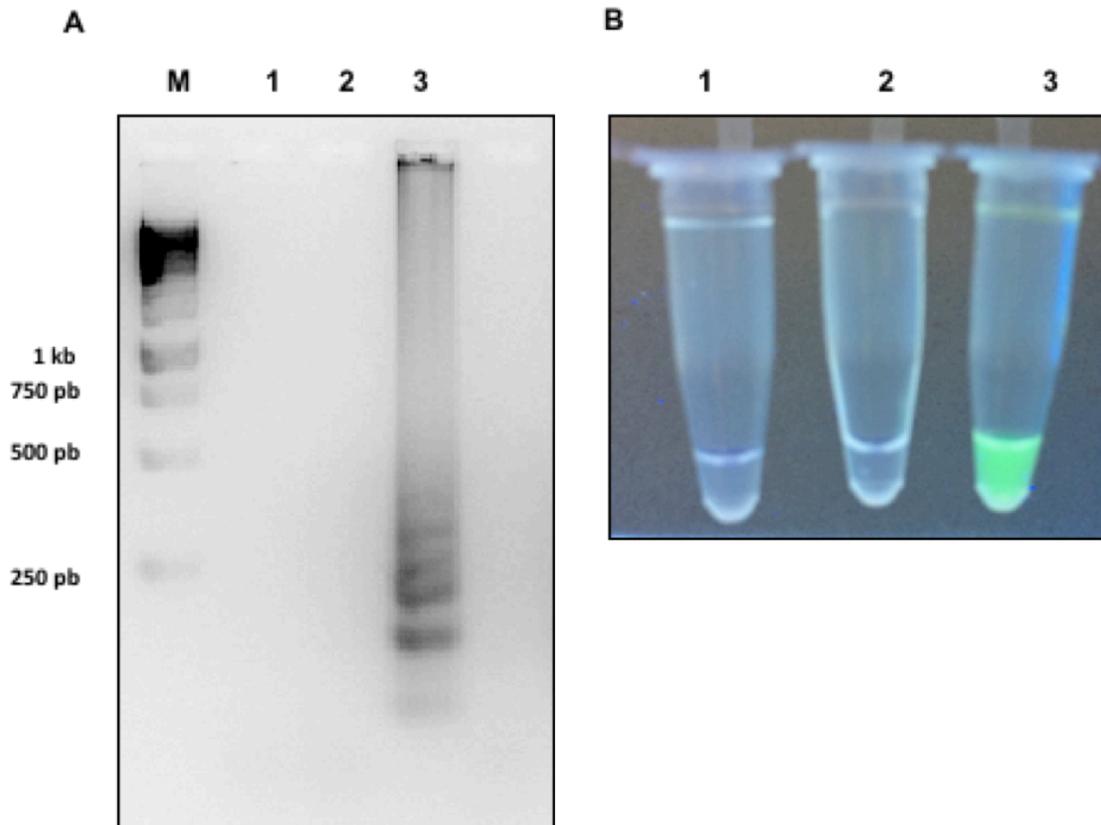


Figura 3.12 Amplificación LAMP de ALS. **Panel A:** M) Marcador 1 kb; 1) Sin ADNc de *C. chinense*; 2) Con ADNc de *B. oleracea*; 3) Con ADNc de *C. chinense*. **Panel B:** Detección de la amplificación con calceína. 1) Sin ADNc de *C. chinense*; 2) Con ADNc de *B. oleracea*; 3) Con ADNc de *C. chinense*. Temperatura de reacción: 65°C, tiempo de incubación: 15 min.

3.5 SENSIBILIDAD DE LA AMPLIFICACIÓN LAMP

Una vez que se establecieron las mejores condiciones para realizar la amplificación LAMP de ADT y ALS, se procedió a comparar la sensibilidad que se puede obtener con esta técnica contra la PCR de punto final. Con este fin, se realizaron diluciones seriadas decrecientes del ADNc de *C. chinense* (Cuadro 3.2).

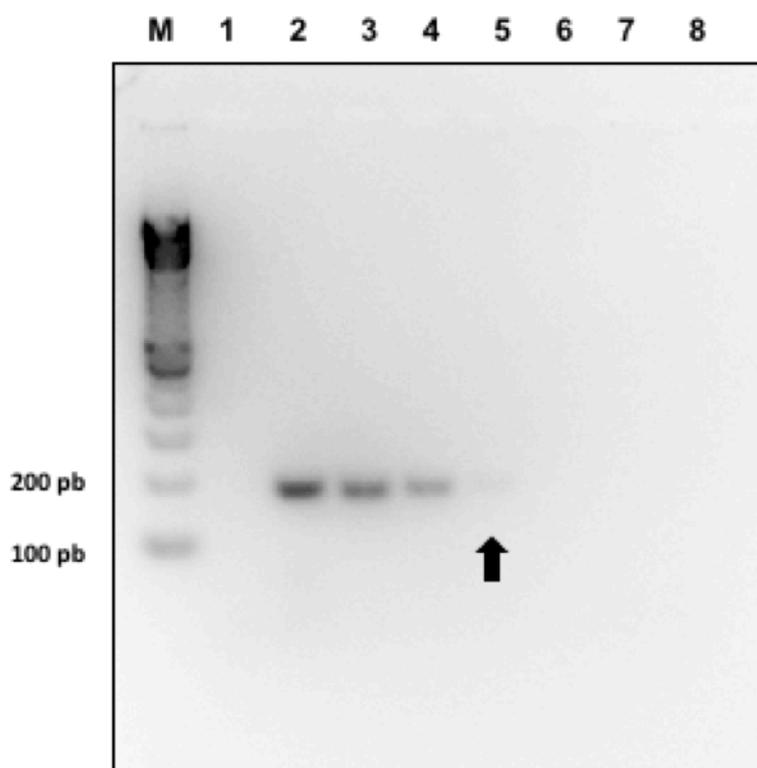


Figura 3.13 Amplificación por PCR de punto final de ADT (185 pb) empleando diferentes concentraciones de ADNc de *C. chinense*. M) Marcador 100 pb; 1) Sin ADNc; 2) Actina (180 pb); 3) 1190.3 ng; 4) 119.0 ng; 5) 11.9 ng; 6) 1.19 ng; 7) 119 pg; 8) 11.9 pg.

Resulta evidente de los resultados presentados en la Figura 3.12, que la señal de ADT se perdió después de las primeras dos diluciones (11.9 ng); esto es, fue necesaria una concentración superior a 11.9 ng de ADNc de *C. chinense* para obtener una banda en el ensayo de PCR. En contraste, cuando se utilizó la técnica de LAMP, la señal se percibe aún con 29.7 pg de ADNc en el ensayo (Figura 3.13), que corresponde a 400 veces menos cantidad de la cantidad necesaria presentada con la reacción de PCR de punto final.

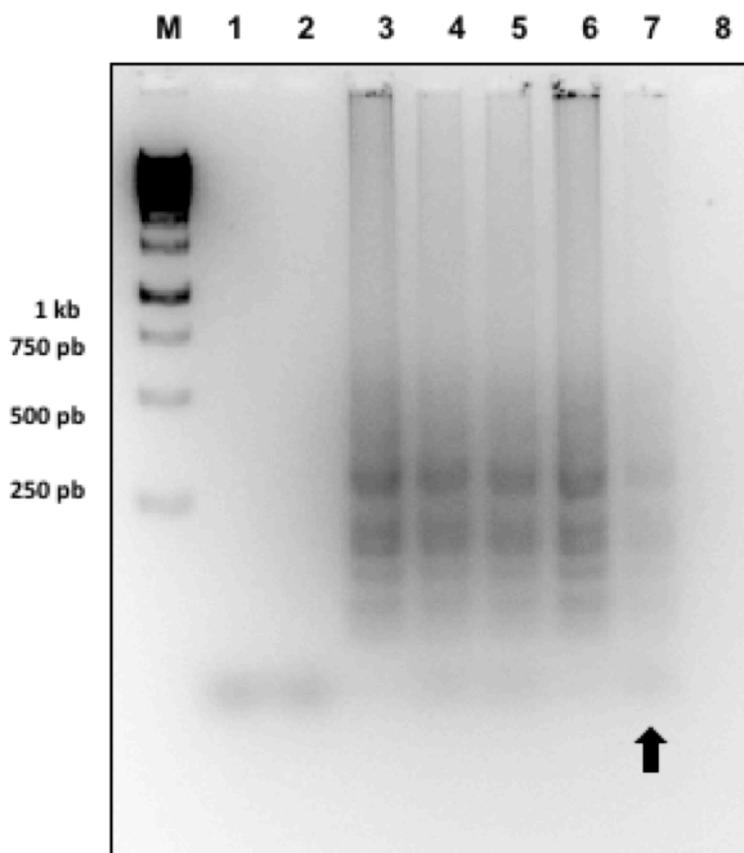


Figura 3.14 Amplificación LAMP de ADT empleando diluciones decrecientes de ADNc de *C. chinense*. Temperatura de reacción: 64°C, tiempo de incubación: 15 min. M) Marcador 100 pb; 1)

Sin ADNc de *C. chinense*; 2) Con ADNc de *B. oleracea*; 3) 297.5 ng; 4) 29.75 ng; 5) 2.97 ng; 6) 0.29 ng; 7) 29.75 pg; 8) 2.97 pg.

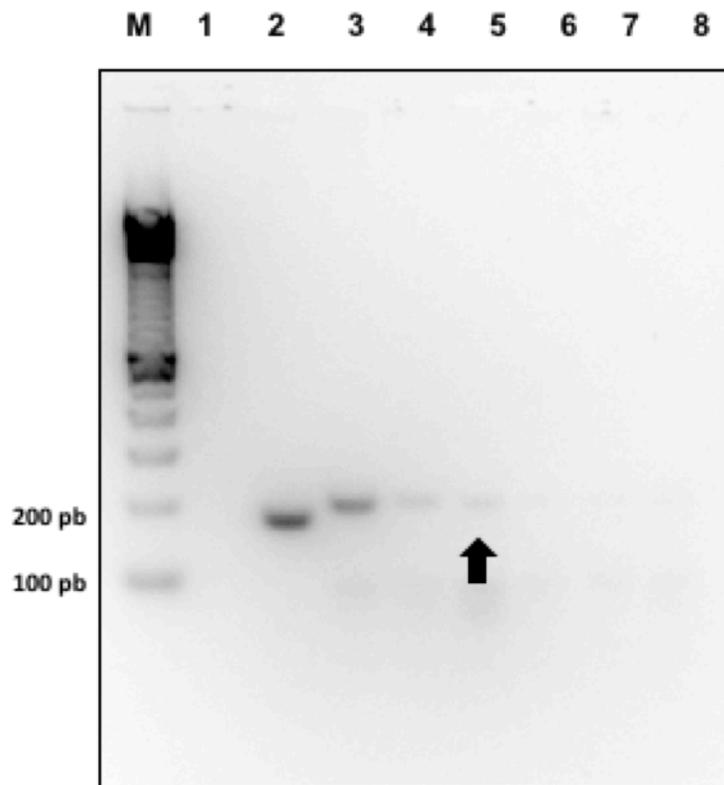


Figura 3.15 Amplificación por PCR de punto final de ALS (202 pb) empleando diferentes concentraciones de ADNc de *C. chinense*. M) Marcador 100 pb; 1) Sin ADNc; 2) Actina (180 pb); 3) 1190.3 ng; 4) 119.0 ng; 5) 11.9 ng; 6) 1.19 ng; 7) 119 pg; 8) 11.9 pg.

En el caso de la ALS, los límites fueron 11.9 ng de ADNc de *C. chinense* para obtener una banda en el ensayo de PCR (Figura 3.14) y 2.97 pg en el caso de la amplificación LAMP (Figura 3.15).

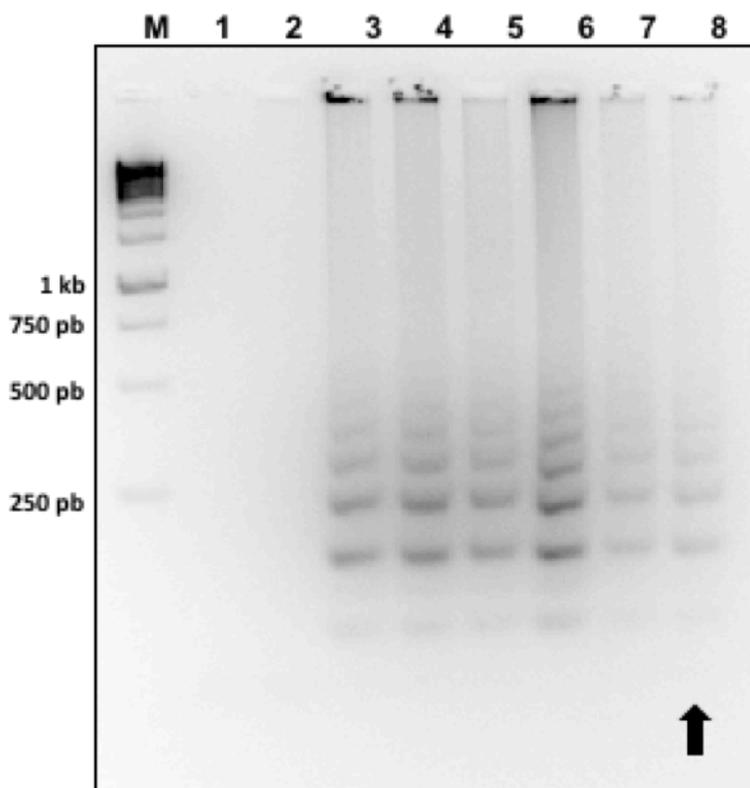


Figura 3.16 Amplificación LAMP de ALS empleando diluciones decrecientes de ADNc de *C. chinense*. Temperatura de reacción: 65°C, tiempo de incubación: 15 min. M) Marcador 100 pb; 1) Sin ADNc de *C. chinense*; 2) Con ADNc de *B. oleracea*; 3) 297.5 ng; 4) 29.75 ng; 5) 2.97 ng; 6) 0.29 ng; 7) 29.75 pg; 8) 2.97 pg.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más utilizada en sus diferentes variedades: transcripción inversa (RT-PCR), PCR anidado (nested PCR) y PCR múltiple (multiplex PCR) (Parida *et al.*, 2008). Debido a su aparente simplicidad, se utiliza como una aproximación estándar en biotecnología y laboratorios de diagnóstico médico. De cualquier forma, la técnica de PCR posee desventajas intrínsecas, como el requerimiento de un termociclador, especificidad insuficiente y una relativa baja eficiencia de amplificación. Tomando en cuenta estas desventajas, se han desarrollado nuevas técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (Mori *et al.*, 2001).

La técnica de amplificación isotérmica mediada por horquillas o loops (LAMP), reportada por Notomi en el año 2000, representa una opción diferente para la amplificación y detección de secuencias que corresponden a genes de interés. LAMP es un método de amplificación de ácidos nucleicos bajo condiciones isotérmicas que da lugar a grandes cantidades de ADN (Nagamine *et al.*, 2001). Este método puede amplificar secuencias de interés con un límite de detección de menos de 10 copias en un período de una hora (Notomi *et al.*, 2000).

La técnica LAMP se fundamenta en la síntesis auto-cíclica por desplazamiento de la hebra de ADN, realizada por una ADN polimerasa con una alta actividad de desplazamiento de cadena, y el diseño de un par de cebadores internos y otro par de externos (Notomi *et al.*, 2000), lo que le confiere características como sensibilidad, especificidad y fácil realización.

En este trabajo, se establecieron las condiciones para la amplificación de las secuencias que codifican para la arogenato deshidratasa (ADT) y la acetolactato sintasa (ALS), utilizando los cebadores LAMP/F3-B3 y FIP-BIP correspondientes a

cada enzima. Se logró la amplificación de los genes que codifican para ADT y ALS utilizando los cebadores LAMP con la sensibilidad y especificidad esperadas.

Hay diferentes factores que pueden ser ajustados con el objetivo de mejorar la eficiencia de la reacción. Por ejemplo, la adición de betaína en concentraciones que van de 0.4 a 1.2 M son utilizadas para mejorar la especificidad; sin embargo, concentraciones mayores pueden impedir reacciones positivas. Otro de los parámetros para mejorar la especificidad de la reacción es la temperatura, la cual puede ser aumentada hasta 70°C en el caso de la *Bst* polimerasa 3.0.

Disminuir la concentración de magnesio por debajo de 8 M es otra opción para mejorar la especificidad. Una reducción de la concentración de la enzima *Bst* y el tiempo de incubación permite minimizar la incidencia de falsos positivos. Estos son algunos ejemplos de las variables que pueden manipularse cuando el número de copias molde es alto, si hiciera falta aumentar la sensibilidad. Cuando la amplificación se da aún con la omisión de templado, la estrategia es el rediseño de los cebadores (Tanner *et al.*, 2014).

Un aspecto que no debe olvidarse del poderoso mecanismo de amplificación de LAMP es que mientras éste es un ensayo altamente sensible, al mismo tiempo es muy susceptible al acarreamiento de contaminantes, en donde productos de ADN preferentemente amplificados puede ser a su vez utilizados como templado para un proceso de re-amplificación llevando a la formación de falsos positivos (Hsieh *et al.*, 2014). Es, por esto, que es fundamental para la confiabilidad y reproducibilidad de los ensayos el uso de material libre de ADNasas y ARNasas, así como extremar los cuidados para evitar el acarreamiento de contaminantes en el material empleado, como puntas, tubos, etc., o en superficies que se encuentren en contacto con los reactivos.

El tiempo de incubación es otro factor determinante para evitar la presencia de falsos positivos, esto posiblemente se deba a la formación de artefactos, producto de la interacción de los cebadores entre sí. Esto llevó a reducir el tiempo de incubación bajo las condiciones de reacción establecidas a 15 min, el cual resultó suficiente para la amplificación de las secuencias deseadas sin la presencia de falsos positivos.

Cuando se comparó la sensibilidad del ensayo LAMP versus el de la PCR convencional se observó una diferencia sustancial de entre 10 y 100 veces mayor, la cual es similar a la descrita por Li y colaboradores (Li *et al.*, 2013). En el caso de ADT, en la PCR de punto final se pudo apreciar la banda cuando se utilizaron 11.9 ng de templado (Figura 3.12). En contraste, esta señal se observó con hasta la concentración de 29.7 pg (Figura 3.13). Para ALS, las concentraciones de molde en donde aún se puede percibir una banda son 11.9 ng y 2.97 pg para PCR de punto final y PCR, respectivamente (Figuras 3.14 y 3.15).

Este trabajo ha demostrado por primera vez que la sensibilidad de la técnica de amplificación mediada por loops (LAMP) puede ser aprovechada para la detección de los transcritos que se encuentran en baja concentración de genes involucrados tanto en el metabolismo primario como el especializado en plantas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

En este trabajo, se lograron establecer las condiciones óptimas para la amplificación y detección de las secuencias de los genes que codifican para enzimas claves en la ruta de síntesis de los precursores de los capsaicinoides, la arogenato deshidratasa (ADT) y acetolactato sintasa (ALS), en extractos de tejido placentario de *Capsicum chinense* Jacq. mediante la técnica de amplificación mediada por loops (LAMP).

Al realizar la evaluación de la sensibilidad de la técnica de amplificación LAMP contra aquella de la técnica de amplificación por PCR, se demostró que la primera posee una sensibilidad de entre 10 y 100 veces mayor que la segunda.

PERSPECTIVAS

Si bien existen muchas opciones y variantes para la amplificación y detección de secuencias de ácidos nucleicos con diferentes propósitos, es siempre deseable la búsqueda de nuevas técnicas y aplicaciones que ofrezcan mayores capacidades, en lo que respecta a la versatilidad, sensibilidad, especificidad, métodos de detección y reducción de costos, entre otras muchas otras.

La técnica de amplificación isotérmica mediada por loops (LAMP) ofrece actualmente una plétora de oportunidades, en cuanto a su aplicación con fines diagnósticos de enfermedades en animales y plantas. Ésta ha servido para el desarrollo de estuches (“kits”) con los componentes liofilizados necesarios para la detección de enfermedades específicas en campo, con un mínimo de requerimientos, así como del de complejas metodologías propuestas de

secuenciación sacando provecho de la característica de desplazamiento de hebra que posee la *Bst* polimerasa.

Es importante encontrar nuevas áreas en la investigación en donde puedan ser explotadas las características de esta técnica, como lo es el estudio de genes relacionados con rutas metabólicas en plantas, que están reguladas de manera estricta a nivel transcripcional. Su sensibilidad resulta ser una ventaja en este tipo de escenarios, por lo que es necesario contemplar este método de amplificación como una herramienta eficaz y útil para el estudio de genes involucrados en el metabolismo primario y secundario en plantas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aliotta, J.M., J.J. Pelletier, J.L. Ware, L.S. Moran, J.S. Benner y H. Kong (1996). Thermostable Bst DNA polymerase I lacks a 3'→ 5' proofreading exonuclease activity. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 12, 185-195.
- Aniszewski, T. (2007). Alkaloid chemistry, en: *Alkaloids - Secrets of life: Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role*, T. Aniszewski (ed.). Primera edición. Elsevier, UK. pp. 61-139.
- Aldana-luit, J.G., E. Sauri-Duch, M.L. Miranda-Ham, L.A. Castro-Concha, L.F. Cuevas-Glory y F.A. Vázquez-Flota (2015). Nitrate promotes capsaicin accumulation in *Capsicum chinense* immobilized placentas. *BioMed Research International*, Volume 2015, Article ID 794084. DOI 10.1155/2015/794084.
- Esmatabadi, M.J.D., A. Bozorgmehr, H. Motalebzadeh, N. Bodaghabadi, B. Farhangi, S. Babashah y M. Sadeghizadeh (2015). Techniques for evaluation of LAMP amplicons and their applications in molecular biology. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, 7409-7414.
- Aluru, M.R., M. Mazourek, L.G. Landry, J. Curry, M. Jahn y M.A. O'Connell (2003). Differential expression of fatty acid synthase genes, *Acl*, *Fat* and *Kas*, in *Capsicum* fruit. *Journal of Experimental Botany*, 54, 1655-1664.
- Aza-González, C., H.G. Núñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo (2011). Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Cell Reports*, 30, 695-706.
- Barceloux, D.G. (2008). Pepper and capsaicin (*Capsicum* and piper species), en: *Medical toxicology of natural substances: foods, fungi, medicinal herbs, toxic plants, and venomous animals*. Barceloux, D.G. (ed.). Primera edición. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. pp 71-76.

-
- Bhat, A.I., A. Siljo y K.P. Deeshma (2013). Rapid detection of piper yellow mottle virus and cucumber mosaic virus infecting black pepper (*Piper nigrum*) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Journal of Virological Methods*, 193, 190-196.
- Bosland, P.W. y J.B. Baral (2007). 'Bhut Jolokia' - The world's hottest known chile pepper is a putative naturally occurring interspecific hybrid. *HortScience*, 42, 222-224.
- Castro-Concha, L.A., J. Tuyub-Che, A. Moo-Mukul, F.A. Vazquez-Flota y M.L. Miranda-Ham (2014). Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (Habanero Pepper) at different stages of ripening. *The Scientific World Journal*, Volume 2014, Article ID 809073. DOI 10.1155/2014/809073.
- Castro-Concha, L.A., F.M. Baas-Espinola, W.R. Ancona-Escalante, F.A. Vázquez-Flota y M.L. Miranda-Ham (2016). Phenylalanine biosynthesis and its relationship to accumulation of capsaicinoids during *Capsicum chinense* fruit development. *Biologia Plantarum*, 60, 579-584.
- Cázares-Sánchez, E., P. Rodríguez-Vallejo, F. Castillo-González, R.M. Soto-Hernández, M.T. Rodríguez-González y J.L. Chávez-Servia (2005). Capsaicinoides y preferencia de uso en diferentes morfotipos de chile (*Capsicum annum* L.) del centro-oriente de Yucatán. *Agrociencia*, 39, 627-638.
- Croteau, R., T.M. Kutchan y N.G. Lewis (2000). Natural products (secondary metabolites), en: *Biochemistry and molecular biology of plants*. Buchanan, B., W. Gruissem, R. Jones, (eds.). Primera edición. American Society of Plant Physiologists, Berkeley, California. pp.1250-1319.
- Curry, J., M. Aluru, M. Mendoza, J. Nevarez, M. Meléndez y M.A. O'Connell (1999). Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are

-
- differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum* spp. *Plant Science*, 148, 47-57.
- Dhama, K., K. Karthik, S. Chakraborty, R. Tiwari, S. Kapoor, A. Kumar y P. Thomas (2014). Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17, 151-166.
- De Luca, V. y B. St Pierre (2000). The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 5, 168-173.
- DeWitt, D. y P.W. Bosland (1993). *The Pepper Garden*. Ten Speed Press, Berkeley, USA. pp. 240.
- Díaz, J., F. Pomar, A. Bernal y F. Merino (2004). Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry Reviews*, 3, 141-157.
- Eberlein, C.V., M.J. Guttieri, C.A. Mallory-Smith, D.C. Thill y R.J. Baerg (1997). Altered acetolactate synthase activity in ALS-inhibitor resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Science*, 45, 212-217.
- Fattoruso, E. y O. Taglialatela-Scafati (2008). Capsaicin and Capsaicinoids, en: *Modern Alkaloids: structure, isolation and biology*. Fattoruso, E. y O. Taglialatela Scafati (eds.). Wiley-VCH, Germany. pp. 73-103.
- Fischbach, J., N.C. Xander, M. Frohme y J.F. Glökler (2015). Shining a light on LAMP assays— A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *BioTechniques*, 58, 189-194.
- Francois, P., M. Tangomo, J. Hibbs, E.-J. Bonetti, C.C. Boehme, T. Notomi, M.D. Perkins y J. Schrenzel (2011). Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 62, 41-48.
- Fukuta, S., S. Kato, K. Yoshida, Y. Mizukami, A. Ishida, J. Ueda, M. Kanbe y Y. Ishimoto (2003). Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-

-
- mediated isothermal amplification reaction. *Journal of Virological Methods*, 112, 35-40.
- Gururaj, H.B., M.N. Padma, P. Giridhar y G.A. Ravishankar (2012). Functional validation of *Capsicum frutescens* aminotransferase gene involved in vanillylamine biosynthesis using *Agrobacterium* mediated genetic transformation studies in *Nicotiana tabacum* and *Capsicum frutescens* calli cultures. *Plant Science*, 195, 96-105.
- Heiser, C.B. (1964) Los Chiles y Ajíes (*Capsicum*) de Costa Rica y Ecuador. *Ciencia y Naturaleza*, Ecuador, 7, 50-57.
- Hsieh, K., P.L. Mage, A.T. Csordas, M. Eisenstein y H.T.Soh (2014). Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). *Chemical Communications*, 50, 3747-3749.
- Johnson, C.D. y D.R. Decoteau (1996). Nitrogen and potassium fertility affects jalapeño pepper plant growth, pod yield and pungency. *HortScience*, 31, 1119-1123.
- Kaneko, H., T. Kawana, E. Fukushima y T. Suzutani (2007). Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 499-501.
- Keizerweerd, A.T., A. Chandra y M.P. Grisham (2015). Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the detection of sugarcane mosaic virus and sorghum mosaic virus in sugarcane. *Journal of Virological Methods*, 212, 23-29.
- Li, J.-Y., Q.-W. Wei, Y. Liu, X.-Q. Tan, W.-N. Zhang, J.-Y. Wu, M.K. Charimbu, B.-S. Hu, Z.-B. Cheng, C. Yu y X.-R. Tao (2013). One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of cucumber green mottle mosaic virus. *Journal of Virological Methods*, 193, 583-588.

-
- Liu, A., G. Guan, P. Du, H. Gou, J. Zhang, Z. Liu, M. Ma, Q. Ren, J. Liu, J. Yang, Y. Li, Q. Niu, Q. Bai, y H. Yin y J. Luo (2013). Rapid identification and differentiation of *Theileria sergenti* and *Theileria sinensis* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Veterinary Parasitology*, 191, 15-22.
- Lu, Y., W. Yang, L. Shi, L. Li, M.J. Alam, S. Guo y S.-I. Miyoshi (2009). Specific detection of viable *Salmonella* cells by an ethidium monoazide-loop mediated isothermal amplification (EMA-LAMP) method. *Journal of Health Science*, 55, 820-824.
- Maeda, H., A.K. Shasany, J. Schnepf, I. Orlova, G. Taguchi, B.R. Cooper, D. Rhodes, E. Pichersky y N. Dudareva (2010). RNAi suppression of arogenate dehydratase1 reveals that phenylalanine is synthesized predominantly via the arogenate pathway in petunia petals. *Plant Cell*, 22, 832-849.
- Mazourek, M., A. Pujar, Y. Borovsky, I. Paran, L. Mueller y M.M. Jahn (2009). A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant Physiology*, 150, 1806-1821.
- Monforte-González, M., A. Guzmán-Antonio, F. Uuh-Chim y F. Vázquez-Flota (2010). Capsaicin accumulation is related to nitrate content in placentas of habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 764-768.
- Miranda-Ham, M.L., L.A. Castro Concha, C. Roca Mézquita y F.M. Baas Espinola (2007). Inmovilización de placentas de chile habanero para el estudio de la síntesis de capsaicina, a partir de sus precursores nitrogenados, en: II Seminario de Investigación Científica y Tecnológica del Chile Habanero de Yucatán, Mérida.
- Mori, Y., K. Nagamine, N. Tomita y T. Notomi (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium

-
- pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289, 150-154.
- Mori, Y., H. Kanda y T. Notomi (2013). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 19, 404-411.
- Nagamine, K., Y. Kuzuhara y T. Notomi (2002). Isolation of single-stranded DNA from loop-mediated isothermal amplification products. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290, 1195-1198.
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino y T. Hase (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28, i-vii.
- Notomi, T., Y. Mori, N. Tomita y H. Kanda (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*, 53, 1-5.
- Ochoa-Alejo, N. y J.E. Gómez-Peralta (1993). Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 141, 147-152.
- Parida, M., K. Horioka, H. Ishida, P.K. Dash, P. Saxena, A.M. Jana, M.A. Islam, S. Inoue, N. Hosaka y K. Morita (2005). Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 2895-2903.
- Parida, M., S. Sannarangaiah, P.K. Dash, P.V.L. Rao y K. Morita (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*, 18, 407-421.
- Peyrefitte, C.N., L. Boubis, D. Coudrier, M. Bouloy, M. Grandadam, H.J. Tolou y S. Plumet (2008). Real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal

-
- amplification for rapid detection of rift valley fever virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 3653-3659.
- Rubio-Piña, J.A. y F.A. Vázquez-Flota (2008). Isolation of functional total RNA from *Argemone mexicana* tissues. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11, 1-5.
- Smutzer, G. y R.K. Devassy (2016). Integrating TRPV1 receptor function with capsaicin psychophysics. *Advances in Pharmacological Sciences*, Volume 2016, Article ID 1512457, DOI 10.1155/2016/1512457.
- Stewart, C., M. Mazourek, G.M. Stellari, M. O'Connell y M. Jahn (2007). Genetic control of pungency in *C. chinense* via the Pun1 locus. *Journal of Experimental Botany*, 58, 979-991.
- Suzuki, T., T. Kawada y K. Iwai (1981). Biosynthesis of acyl moieties of capsaicin and its analogues from valine and leucine in *Capsicum* fruits. *Plant and Cell Physiology*, 22, 23-32.
- Taiz, L. y E. Zeiger (1991). Surface protection and secondary defense compounds, en: *Plant Physiology*. Taiz, L. y E. Zeiger. (eds). Segunda edición. Benjamin/Cummings Pub. Co. Redwood City, California, pp. 318-334.
- Tanner, N.A. y T.C. Evans (2014). Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. *Current Protocols in Molecular Biology*, 15.14.1-15.14.14.
- Tomita, N., Y. Mori, H. Kanda y T. Notomi (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3, 877-882.
- Verpoorte, R., A. Contin y J. Memelink (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1, 13-25.
- Vázquez-Flota, F., M.L. Miranda-Ham, M. Monforte-González, G. Gutiérrez-Carbajal, C. Velázquez-García y Y. Nieto-Pelayo (2007). La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30, 353-360.

-
- Zhao, L.-M., G. Li, Y. Gao, Y.-R. Zhu, J. Liu y X.-P. Zhu (2015). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detecting tomato chlorosis virus. *Journal of Virological Methods*, 213, 93-97.
- Zhou, D.J., L. Guo, S. Xu, Q. Gao, Q. Lin, Q. Wu, L. Wu y Y. Que (2014). Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of *cry1Ac* transgenic sugarcane. *Scientific Reports*, 4, 4912, DOI: 10.1038/srep04912.