



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA
BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN DOS MORFOTIPOS DE
CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)

Tesis que presenta

Alejandrina Pereira Patrón

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

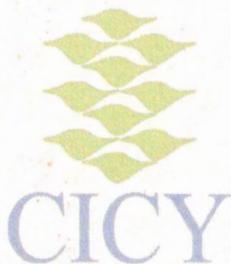
Mérida, Yucatán, México

2013



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 titulado ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN DOS MORFOTIPOS DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Renata Rivera Madrid, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

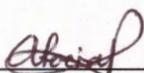
Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Mérida, Yucatán, México, mayo de 2013.

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:  _____

Nombre:

Alejandrina Pereira Patrón

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 la expresión de genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en dos morfotipos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo la dirección de la Dra. Renata Rivera Madrid.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a Dios por darme toda la fortaleza necesaria para llevar a cabo mis estudios de posgrado.

También le doy las gracias al CICY y al posgrado en Ciencias Biológicas por aceptarme y permitirme hacer la maestría en ciencias biológicas.

Al CONACYT por otorgarme la beca no. 254626 para sustentar todos mis gastos y al proyecto CONACYT clave 98508 bajo la dirección de la Dra. Renata Rivera Madrid.

A la Dra. Nancy Santana Buzzy y a todo su grupo del laboratorio 09 (Emily, Stefy, Lupita, Susana, Adriana, Raúl, Carlos y Mario) por apoyarme en todos mis experimentos durante los primeros tres semestres de la maestría y en especial a la Dra. Eunice Gómez Uc por ayudarme en el laboratorio y transmitirme parte de sus conocimientos.

A la Dra. Renata Rivera Madrid y a todo su grupo del laboratorio 27 (Nayeli, Victor, Rodolfo, Salatiel, Pedro y Abraham) por brindarme su apoyo en los últimos meses de la maestría y en especial a la MC. Margarita Aguilar Espinosa por ayudarme en todo lo necesario para la realización de mis experimentos de laboratorio.

A todos los miembros de mi comité tutorial y evaluador integrado por la Dra. Renata Rivera Madrid, el Dr. Luis Pinzón López, el Dr. Luis Sáenz Carbonell, el Dr. Gregorio Godoy Hernández y el Dr. Felipe Vázquez Flota por las observaciones que me hicieron para la mejora de mi documento de tesis.

Al Ing. Eduardo Balam y al MC. Adolfo Guzmán por ayudarme en la obtención de mi material vegetal.

Al MC. Iván Córdoba Lara, técnico de la Unidad de Biotecnología, por ayudarme con mis experimentos en Tiempo Real.

DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico a mis padres Abelardo y Aracelly por impulsarme a seguir adelante como persona y como profesionista y por brindarme siempre su apoyo en todo momento de mi vida.

A Jorge por ser mi compañero y permanecer conmigo en mis buenos y malos momentos.

A mis hermanos Chelly y Abelardo que aunque no conocen mucho sobre mi tema de tesis sé que siempre puedo contar con ellos.

A mi abuelita, que siempre me dio una palabra de aliento cuando más lo necesitaba.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1 ESPECIES MÁS IMPORTANTES DEL GÉNERO <i>CAPSICUM</i>	3
1.2. IMPORTANCIA DEL CHILE EN LA INDUSTRIA	3
1.3. CHILE HABANERO	5
1.3.1. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DEL CHILE HABANERO	7
1.3.2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS	7
1.4. LOS CAROTENOIDES Y SU BIOSÍNTESIS	10
1.5. PLASTIDIOS	17
1.6. APLICACIONES DE LOS CAROTENOIDES	18
1.7. CAROTENOIDES EN <i>CAPSICUM SPP.</i>	21
1.8. EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES	22
PREGUNTAS A RESOLVER	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
JUSTIFICACIÓN	26
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	27
BIBLIOGRAFÍA	28

CAPÍTULO II	37
AISLAMIENTO DE LOS ADNc PARCIALES DE ZDS, CCS, B-LCY Y E-LCY DE FRUTOS DE CHILE HABANERO	37
2.1. INTRODUCCIÓN.....	37
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	40
2.2.1. MATERIAL VEGETAL	40
2.2.2. EXTRACCIÓN DE ARN	40
2.2.3. CUANTIFICACIÓN Y COMPROBACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ARN TOTAL	41
2.2.4. SÍNTESIS DE ADNC	41
2.2.5. DISEÑO DE CEBADORES	42
2.2.6. AMPLIFICACIÓN POR PCR PUNTO FINAL.....	42
2.2.7. LIGACIÓN DE LOS FRAGMENTOS, TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS Y CLONACIÓN	45
2.2.8. VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DEL INSERTO.....	46
2.2.9. CUANTIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA.....	46
2.3. RESULTADOS	47
2.3.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	47
2.3.2. EXTRACCIÓN DE ARN DE PERICARPIO DE CHILE HABANERO.....	48
2.3.3. AMPLIFICACIÓN DE LOS ADN COMPLEMENTARIOS	49
2.3.4. DISEÑO DE CEBADORES PARA EL AISLAMIENTO DE LOS GENES PARCIALES CCS, ZDS, B-LCY Y E-LCY.....	50
2.3.4.1. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS PARA EL AISLAMIENTO DEL GEN PARCIAL CCS	50
2.3.4.2. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS PARA EL AISLAMIENTO DEL GEN PARCIAL ZDS	52

2.3.4.3. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS PARA EL AISLAMIENTO DEL GEN PARCIAL <i>B-LCY</i>	53
2.3.4.4. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS PARA EL AISLAMIENTO DEL GEN PARCIAL <i>E-LCY</i>	55
2.3.4.5. OBTENCIÓN DE LOS CEBADORES SELECCIONADOS.....	56
2.3.5. REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN POR PCR DE PUNTO FINAL DE LOS GENES <i>CCS</i> , <i>ZDS</i> , <i>B-LCY</i> Y <i>E-LCY</i>	59
2.3.6. SECUENCIACIÓN DEL ADNc PARCIAL CORRESPONDIENTE A LA <i>CCS</i> DE <i>C.CHINENSE</i>	64
2.3.7. SECUENCIACIÓN DEL ADNc PARCIAL CORRESPONDIENTE A LA <i>ZDS</i> DE <i>C.CHINENSE</i>	64
2.3.8. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL GEN <i>ZDS</i>	67
2.3.9. DISEÑO DE CEBADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>ZDS</i> POR RT-PCR EN TIEMPO REAL ...	71
2.3.10. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CLONACIÓN DEL FRAGMENTO DEL ADNc PARCIAL DE <i>CCS</i>	72
2.3.11. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE <i>CCHCCS-2</i>	81
2.4. DISCUSIÓN.....	83
BIBLIOGRAFÍA	85
CAPÍTULO III	87
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL ADNc PARCIAL <i>ZDS</i> POR RT-PCR EN TIEMPO REAL.....	87
3.1. INTRODUCCIÓN.....	87
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.	88
3.2.1. MATERIAL VEGETAL	88
3.2.2. AMPLIFICACIÓN PARA <i>ZDS</i>	88
3.2.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	89
3.3. RESULTADOS.....	90
3.3.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	90

3.3.2. EXTRACCIÓN DE ARN DE PERICARPIO DE CHILE HABANERO	92
3.3.3. AMPLIFICACION DE LOS ADN COMPLEMENTARIOS	93
3.3.4. AMPLIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS POR RT-PCR EN TIEMPO REAL	94
3.4. DISCUSIÓN.....	98
BIBLIOGRAFÍA	100
CAPÍTULO IV	103
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	103
4.1. CONCLUSIONES.....	103
4.2. PERSPECTIVAS.....	105
BIBLIOGRAFÍA.	107
ANEXO	108

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Producción de chile habanero.....	6
Figura 1.2. Partes de la planta de chile habanero.....	9
Figura 1.3. Caracterización morfológica del morfotipo rojo de chile habanero	9
Figura 1.4. Caracterización morfológica del morfotipo naranja de chile habanero.....	10
Figura 1.5. Esquema general de la biosíntesis de carotenoides en plantas.....	14
Figura 1.6. Estrategia experimental.....	27
Figura 2.1. Obtención de frutos del morfotipo rojo de <i>Capsicum chinense</i> Jacq	47
Figura 2.2. ARN de pericarpio de chile habanero.....	48
Figura 2.3. Síntesis de ADNc.....	49
Figura 2.4. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos (a.a.) de genes CCS de especies diferentes de dicotiledóneas.....	51
Figura 2.5. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos (a.a.) de genes ZDS de especies diferentes de dicotiledóneas.....	53
Figura 2.6. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos (a.a.) de genes β -LCY de especies diferentes de dicotiledóneas.....	54
Figura 2.7. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos (a.a.) de genes ϵ -LCY de especies diferentes de dicotiledóneas.....	56
Figura 2.8. Productos obtenidos con las diferentes combinaciones de cebadores para CCS.....	59
Figura 2.9. Productos obtenidos con la combinación de cebadores F2 y R2 para CCS.....	60

Figura 2.10. Productos obtenidos con las diferentes combinaciones de cebadores para <i>ZDS</i>	61
Figura 2.11. Productos obtenidos con las diferentes combinaciones para β - <i>LCY</i>	62
Figura 2.12. Productos obtenidos con las diferentes combinaciones de cebadores para ϵ - <i>LCY</i>	63
Figura 2.13. Árbol filogenético del gen <i>ZDS</i>	66
Figura 2.14. Alineamiento de secuencias de a.a de <i>ZDS</i> , <i>PDS</i> Y <i>CRTISO</i> en diferentes especies	70
Figura 2.15. Amplificación de <i>CCS</i>	73
Figura 2.16. Amplificación de <i>CCS</i>	74
Figura 2.17. Productos obtenidos de la purificación en gel del fragmento de <i>CCS</i>	75
Figura 2.18. Aislamiento de plásmidos recombinantes.....	76
Figura 2.19. Liberación de insertos.....	77
Figura 2.20. Árbol filogenético del gen <i>CCS</i>	80
Figura 2.21. Alineamiento de secuencias de a.a. de <i>CCS</i> , β - <i>LCY</i> y ϵ - <i>LCY</i> de diferentes especies	82
Figura 3.1. Obtención de frutos del morfotipo naranja de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	90
Figura 3.2. Obtención de frutos del morfotipo rojo de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	91
Figura 3.3. ARN de pericarpio de chile habanero.....	92
Figura 3.4. Síntesis de ADNc.....	93
Figura 3.5. Curva de disociación de los genes <i>ZDS</i> y ARNr 18S.....	94

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1. Algunos genes que participan en la biosíntesis de carotenoides.	15
Cuadro 2.1. Cebadores diseñados para los genes <i>CCS</i> , <i>ZDS</i> , β - <i>LCY</i> y ϵ - <i>LCY</i> a partir de los alineamientos realizados.	57
Cuadro 2.2. Combinaciones de los cebadores para los genes <i>CCS</i> , <i>ZDS</i> , β - <i>LCY</i> y ϵ - <i>LCY</i>	58
Cuadro 2.3. Comparación de la secuencia del gen <i>ZDS</i> con secuencias similares.....	65
Cuadro 2.4. Cebadores para RT-PCR en tiempo real para el gen <i>ZDS</i>	71
Cuadro 2.5. Combinación de cebadores para el análisis de <i>ZDS</i> por RT-PCR en tiempo real	72
Cuadro 2.6. Cebadores utilizados para la amplificación de <i>CCS</i>	72
Cuadro 2.7. Comparación de la secuencia del gen <i>CCS</i> con secuencias similares	79

ABREVIATURAS

Ácido ribonucleico	ARN
Ácido ribonucleico mensajero	ARNm
Ácido ribonucleico ribosomal subunidad 18	ARNr 18S
Amplificación rápida de extremos de cDNA	RACE
β - caroteno hidroxilasa	β -CHX
Beta licopeno ciclasa	β -LCY
Caroteno isomerasa	CRTISO
Capsantina capsorrubina sintasa	CCS
Cromatografía líquida de alto rendimiento	HPLC
ϵ -caroteno hidroxilasa	ϵ -CHX
Epsilon licopeno ciclasa	ϵ -LCY
Fitoeno desaturasa	PDS
Fitoeno sintasa	PSY
Flavin adenin dinucleótido	FAD
Geranil geranil pirofosfato	GGPP
Neoxantina sintasa	NSY
Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa	RT-PCR
Violaxantina de epoxidasa	VDE
Zeaxantina epoxidasa	ZEP

Zeta caroteno desaturasa

ZDS

RESUMEN

El chile (*Capsicum* spp.) es un producto agrícola con gran demanda en el mercado. El cultivo del chile habanero (*C. chinense* Jacq.) en Yucatán es una fuente de trabajo permanente durante el año para los productores de éste.

Este cultivo es valorado en todo el mundo por su picor y por su alto contenido de pigmentos. Los carotenoides, el mayor grupo de pigmentos vegetales, funcionan como antioxidantes y como precursores de la vitamina A. Los carotenoides más abundantes en los frutos maduros de chile son el β -caroteno, la capsantina, y la capsorrubina (Guzmán *et al.*, 2011). Los cambios de color durante la maduración de los frutos son debidos a alteraciones en la composición de carotenoides, y diversos colores del blanco al rojo intenso, también se pueden encontrar en las diferentes variedades al madurar de chile. Los niveles de expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides están directamente relacionados con los altos niveles de acumulación de carotenoides totales en *Capsicum* (Ha *et al.*, 2007) sin embargo, la regulación de la biosíntesis de los carotenoides no está completamente entendida.

Con base en lo anterior, en este proyecto se determinó la expresión de genes responsables de la síntesis de carotenoides en dos diferentes morfotipos de chile habanero, uno de fruto naranja y otro de fruto rojo.

Entre los resultados obtenidos, se logró establecer las condiciones para obtener ARN de frutos en diferentes estados de maduración de los morfotipos estudiados, así como las condiciones de amplificación de PCR punto final de los fragmentos de los genes *ZDS*, *CCS*.

Los fragmentos de los genes *ZDS* y *CCS* de *C. chinense* Jacq. fueron aislados y secuenciados. Después de una comparación con secuencias en el banco de datos GenBank, éstas mostraron alta similitud, con las especies *Capsicum* spp.

Los niveles de expresión del gen *ZDS* por RT-PCR en tiempo real en diferentes estados de desarrollo del fruto de los morfotipos naranja y rojo, manifestaron una variación de acuerdo a la edad. Así, en el morfotipo naranja, el incremento de los niveles de expresión del gen *ZDS* durante los estados de maduración pudiera conducir a la acumulación de β - β xantofilas ya que *ZDS* forma parte del conjunto de genes involucrados. En el morfotipo rojo, el nivel de expresión de este gen disminuyó en el fruto maduro. Asimismo, en hojas jóvenes de ambos del morfotipos, el nivel de expresión del gen *ZDS* fue elevado, lo cual no ha sido reportado para otras especies.

Aunque se logró observar el cambio en la expresión del gen *ZDS*, es necesario estudiar a fondo las implicaciones de esto en chile habanero. Asimismo, resulta de suma importancia el llegar a conocer los patrones de expresión de los genes *CCS*, β -*LCY* y ϵ -*LCY* y la cuantificación de carotenoides, esto para vislumbrar si existe una correlación entre estos dos procesos.

ABSTRACT

The pepper (*Capsicum* spp.) is an agricultural product with high demand in the market. The culture of habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) in Yucatan, is a source of permanent work during the year to the producers of this.

This crop is valued worldwide for its best flavor and its high pigment content. Carotenoids, the largest group of plant pigments, function as antioxidants and as precursors of vitamin A. The most abundant carotenoid in ripe fruits of pepper are β -carotene, capsanthin, and capsorubin (Guzmán *et al.*, 2011). The color changes during fruit ripening are due to changes in the composition of carotenoids, and different colors from white to deep red, can also be found in different varieties of mature pepper pods. The expression levels of the carotenoid biosynthetic genes are directly related to the accumulation of high levels of total carotenoids in *Capsicum* (Ha *et al.*, 2007). However, the regulation of the biosynthesis of carotenoids is not completely understood.

Based on the above, in this project we investigated the expression of genes responsible for the synthesis of carotenoids in two different habanero pepper morphotypes; one of orange pods and another of red ones.

Among the results, it was possible to establish the conditions to obtain RNA from pods at different stages of maturity of the two habanero pepper morphotypes, as well as the conditions for conventional PCR amplification of *ZDS*, *CCS*.

The *ZDS* and *CCS* gene fragments from *C. chinense* Jacq. were isolated and sequenced. After comparison to sequences in the GenBank a high similarity between them and other isolated from other widespread species *Capsicum* spp.

The levels of *ZDS* gene expression, estimated by Real Time RT-PCR, at different stages of development of the fruit of the orange and red habanero pepper morphotypes, showed a variation according to the age of the fruit. Thus, in the orange morphotype, increased levels of *ZDS* expression during fruit ripening could lead to the accumulation of β - β xanthophylls, since *ZDS* is part of the set of genes that produce these pigments. On the other hand, in red morphotype, the level of decreased expression of this gene in mature fruit were observed.

Also in, young leaves of but a orange and red habanero pepper morphotypes, the level of *ZDS* gene expression was elevated, which has not been reported for other species.

Although it was possible to observe the change in *ZDS* gene expression, it is necessary to study in depth the implications of this in habanero pepper. Also is very important to obtain information about the *CCS*, β -*LCY* and ϵ -*LCY* gene expression and the quantification of the carotenoids, to discern whether this correlation exists between these two processes.

INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum* spp.) es un producto agrícola con gran demanda en el mercado. Todos los chiles pertenecen al género *Capsicum* ubicado dentro de la familia de las Solanáceas, y están agrupados en alrededor de 30 especies. Su centro de origen se localiza en las regiones tropicales y subtropicales de América, probablemente en el área comprendida entre Bolivia y Perú, donde se han encontrado semillas de formas ancestrales que datan de hace más de 7,000 años y desde donde se especula, que este género se diseminó al resto del continente americano (Pickersgill, 1989).

El cultivo del chile habanero (*C. chinense* Jacq.) en Yucatán, es una fuente de trabajo permanente durante el año para los productores dedicados al cultivo. Existe además, una demanda permanente de fruto fresco todo el año para satisfacer el mercado regional y extranjero, ya que su consumo es de diversas y muy variadas formas (fresco, salsa, curtidos, seco, molido en pasta). Durante los últimos 10 años se ha intensificado la demanda nacional e internacional de chile habanero. La característica más apreciada de esta especie, es la pungencia (Trujillo *et al.*, 2004).

Los carotenoides juegan roles importantes en la planta, como son el de servir como protectores contra la foto oxidación en células y tejidos, como pigmentos accesorios y como determinantes estructurales de los complejos pigmento- proteína en los plastidios de plantas (Bartley *et al.*, 1994).

Los carotenoides se han usado tradicionalmente como aditivos en algunos alimentos, bebidas y forrajes, ya sea en forma de extractos naturales o como compuestos puros. Los colorantes más usados en alimentos, fármacos y cosméticos incluyen a β -caroteno, cantaxantina, luteína, astaxantina, zeaxantina, capsantina, capsorubina, rodoxantina y algunos apocarotenoides (Johnson y Schroeder, 1995; Klau y Bauernfeind, 1981; Nelis y De Leenheer, 1991).

INTRODUCCIÓN

De las diferentes especies cultivadas, chile (*Capsicum spp.*) posee la vía biosintética de carotenoides más evolucionada refiriéndose al tipo de compuestos ya que aunque la capsantina y capsorrubina son los elementos claves que le confieren el típico color rojo al fruto durante el proceso de maduración del chile, muchos otros tipos de carotenoides pueden acumularse en sus frutos (Deli *et al.*, 2001; Maoka *et al.*, 2001). Los cambios de color durante la maduración de los frutos son debidos a alteraciones en la composición de carotenoides, y diversos colores desde blanco hasta el rojo intenso, también se pueden encontrar en las diferentes variedades maduras de chile. Los frutos del chile, por lo tanto, son un excelente modelo para estudiar los mecanismos de regulación subyacente a la biosíntesis de carotenoides.

Yucatán es reconocido como centro de reserva genética de la especie *C. chinense*, debido a la diversidad de formas, aromas, picor, y particularmente, colores que exhiben sus frutos. Sus colores varían en diferentes tonos, de naranja, rojo, amarillo y morado, además de que en estado inmaduro las tonalidades de los frutos van del verde tenue al verde intenso, pudiendo observarse morfotipos con frutos de color prácticamente blancos en su estado inmaduro. Por la importancia que tienen los pigmentos para diferentes industrias (alimenticia, farmacéutica, cosmetológica, etc.), y tomando en cuenta la variedad de colores de frutos, presentes en la diversidad de esta especie en la región, el propósito fundamental de este proyecto es determinar los patrones de expresión de los genes responsables de la síntesis de carotenoides en dos diferentes morfotipos de chile habanero (naranja y roja) caracterizadas por sus frutos de colores diferentes y contrastantes y que forman parte del germoplasma de esta especie (*C. chinense* Jacq.) en el CICY.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Especies más importantes del género *Capsicum*

Todos los chiles pertenecen al género *Capsicum*. Los estudios taxonómicos coinciden en que son cinco las especies domesticadas: *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. annuum*, de las cuales ésta última es la más importante. La especie *C. annuum* agrupa la mayor diversidad de chiles, ya sean cultivados o silvestres, entre los más populares destacan el guajillo o mirasol, el piquín, el del árbol, el serrano, el jalapeño, el poblano, y el chilaca, de los cuales los tres últimos, una vez secos, se denominan como chipotle, ancho o mulato y pasilla, respectivamente.

El cultivo de *C. annuum* se adapta a los diversos climas y tipos de suelo del país, en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 2500 m de altitud. El chile habanero (*C. chinense*) y el manzano (*C. pubescens*) se cree que son originarios de Sudamérica, pero en nuestro país son ampliamente conocidos, especialmente en las regiones donde se cultivan como Yucatán, Quintana Roo, Campeche y Tabasco; el manzano, también conocido como ciruelo o perón, sólo prospera en lugares altos que superen los 200 metros sobre el nivel del mar como en la Sierra de Puebla, las partes altas de Veracruz, en Chiapas y en algunas zonas de Michoacán (Ramírez *et al.*, 1996).

1.2 Importancia del chile en la industria

Por su olor, sabor y aroma el chile se ha convertido en un condimento popular en muchas partes del mundo. En México el consumo de este fruto representa una tradición cultural debido a su gran cantidad, amplia variedad y sabor picante. La pungencia de este fruto es causada por siete alcaloides o capsaicinoides, siendo la capsaicina y la dihidrocapsaicina las responsables del 90 % del sabor pungente (Contreras-Padilla y Yahia, 1998).

CAPÍTULO I

El fruto tiene múltiples aplicaciones, desde su utilización en la industria de los alimentos hasta aplicaciones medicinales, pasando por la obtención de materia prima con fines artesanales e industriales (Long- Solís, 1998).

Este fruto se utiliza en la industria farmacéutica por su alto contenido de capsaicina la cual ayuda a inhibir dolores musculares así como el crecimiento de tumores cancerosos (González-Salán, 2004). Externamente se usa como revulsivo en pomadas y linimentos contra los dolores reumáticos y las neuralgias, por vía oral se usa el jugo o tintura del fruto contra las hemorroides; en este caso puede ser preparado en vinagre como condimento de comidas; también se recomienda la tintura de los diversos frutos de *Capsicum* en la gota, en los reumatismos y en las bronquitis.

En el campo de la defensa personal se ha generado una serie de aerosoles, cuyos efectos irritantes se deben a productos orgánicos como la pimienta de cayena, pimiento rojo u otros picantes similares. Estos productos no cuentan con sustancias tóxicas para el organismo humano ya que incluso su eventual ingesta no presenta peligrosidad para la salud, generando tan solo efectos irritantes (Pollak y Saukko, 2000).

Los síntomas de ceguera, sofoco y náusea causados por el contacto de la capsaicina orgánicos desaparecen al cabo de 30 minutos sin causar efectos secundarios.

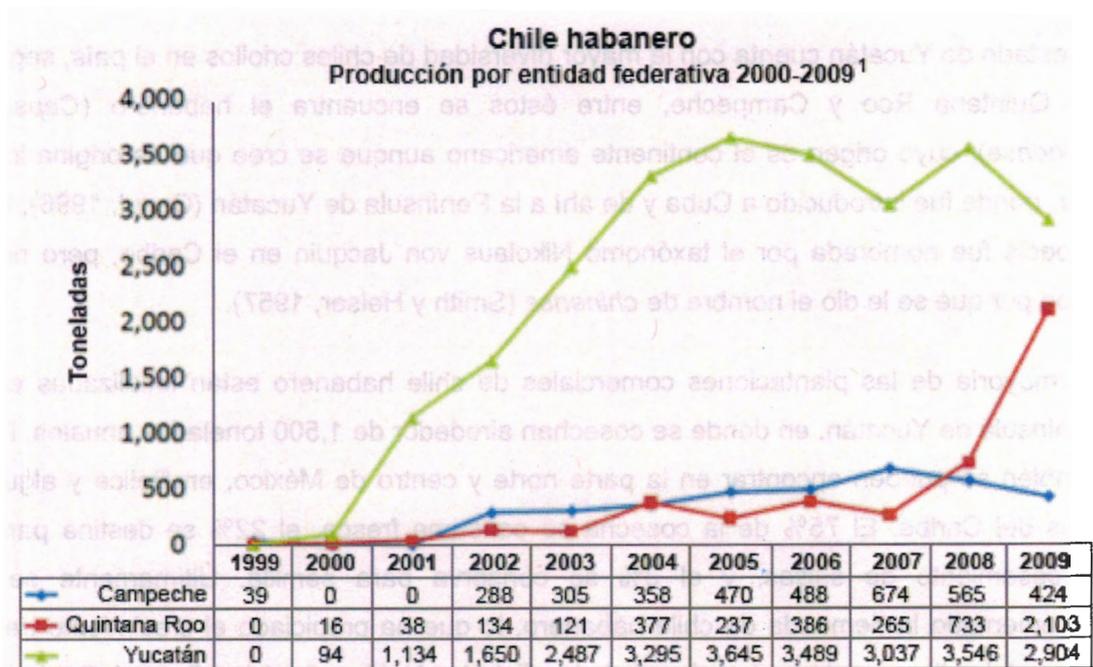
El chile se consume generalmente fresco, en condimento o seco. Los chiles ancho, mulato, mirasol y pasilla, se secan para destinarse a la industria artesanal del mole. También se usan para extraer el pigmento rojo que se emplea para colorear embutidos como chorizo y salami. En la industria avícola se utiliza para preparar mezclas de alimentos balanceados. Además es ampliamente utilizado en la industria dedicada a la producción de cosméticos.

1.3 Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

El estado de Yucatán cuenta con la mayor diversidad de chiles criollos en el país, seguido de Quintana Roo y Campeche, entre éstos se encuentra el habanero (*Capsicum chinense*); cuyo origen es el continente americano aunque se cree que es originario del Sur, donde fue introducido a Cuba y de ahí a la Península de Yucatán (Canul, 1996). Esta especie fue nombrada por el taxónomo Nikolaus von Jacquin en el Caribe, pero no se sabe por qué se le dio el nombre de *chinense* (Smith y Heiser, 1957).

La mayoría de las plantaciones comerciales de chile habanero están localizadas en la península de Yucatán, en donde se cosechan alrededor de 1,500 toneladas anuales. Pero también se pueden encontrar en la parte norte y centro de México, en Belice y algunas islas del Caribe. El 75% de la cosecha se consume fresca, el 22% se destina para el procesamiento de salsas, y el 3% se conserva para semilla. Últimamente se ha incrementado la demanda de chile habanero, lo que ha propiciado el crecimiento de las áreas del cultivo en algunas regiones de los Estados Unidos, América Central, Costa Rica y Colombia.

En relación a la producción nacional de chile habanero, Yucatán es el estado que registró el mayor rendimiento por hectárea en 2009; con una superficie de casi 26 hectáreas de invernadero logró un promedio de 71.78 toneladas por hectárea. Por su parte, Campeche reporta solamente 1.5 hectáreas bajo invernadero; en esta entidad la producción por hectárea fue de 21 toneladas (figura 1.1).



¹ Cifras preliminares

Fuente: SIAP con información de las delegaciones estatales de SAGARPA

Figura 1.1 Producción de Chile habanero

1.3.1 Descripción taxonómica del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

La clasificación del cultivo de chile puede establecerse fácilmente hasta el nivel de género, pero debido a su gran diversidad, la diferenciación a nivel de especie y variedad es muy complicada (Tun, 2001).

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Capsicum*

Especie: *Capsicum chinense* Jacq. (USDA, 2003)

1.3.2 Características botánicas

El chile habanero es una planta de ciclo anual, pudiendo alcanzar hasta 12 meses de vida, dependiendo del manejo agronómico. Su altura es variable, pero en los cultivares comerciales puede oscilar entre 75 y 120 cm.

Las especies de *Capsicum* hasta ahora estudiadas son diploides, cuyo número cromosómico es de $2n=2x=24$, excepto dos especies encontradas en Sudamérica que presentan tetraploidía; *C. ciliatum* y la otra aún no identificada (Lanteri, 1991).

Las semillas son lisas, ovaladas, y pequeñas (2.5 a 3.5 mm) tienen testa de color café claro a café oscuro y su periodo de germinación varía entre ocho y quince días. El sabor picante se debe a la presencia de capsaicina, sustancia muy irritante en estado puro y cuya mayor concentración se encuentra en la placenta de las semillas.

Tiene raíz pivotante y un sistema radicular bien desarrollado, cuyo tamaño depende de la edad de la planta, las características del suelo y las prácticas de manejo que se le proporcionen; puede alcanzar longitudes mayores a los 2 m.

Su tallo es grueso, erecto y robusto y generalmente tiene tendencia a formar tres tallos en la primera ramificación, la que ocurre entre la décima y duodécima hoja, para después continuar bifurcándose, con un crecimiento semi-indeterminado; después de la primera trifurcación muy raramente las tres ramas alcanzan el mismo desarrollo.

Las hojas son simples, lisas, alternas y de forma lanceolada, de tamaño variable lo mismo que su color, el cual puede presentar diferentes tonos de verde dependiendo de la variedad. Pueden ser glabras o pubescentes; el grado de pubescencia también depende de la variedad. Con una nutrición adecuada las hojas pueden alcanzar un tamaño superior a los 15 cm. de longitud y ancho.

Las flores son de color blanco; su tamaño varía entre 1.5 y 2.5 cm. de diámetro de la corola; estos órganos se emiten en cada ramificación y se pueden presentar racimos hasta de seis flores, dando lugar a un promedio de tres frutos. El número de sépalos y pétalos también es variable (de cinco a siete) aún dentro de la misma especie, lo mismo que la longitud del pedúnculo floral.

Los frutos se clasifican como una baya poco carnosa; son huecos y tienen entre tres y cuatro lóbulos; las semillas se alojan en placentas blancuzcas y secas, que no están envueltas por mucosa, y las membranas de los lóbulos generalmente no se prolongan hasta el centro. Suelen ser de tamaño y forma variables. El color a la maduración puede ser amarillo, rojo, naranja o café y su sabor siempre es picante, aunque el grado de pungencia depende de la variedad (Tun, 2001).

En la figura 1.2 se muestra de manera general las partes de la planta de chile habanero.

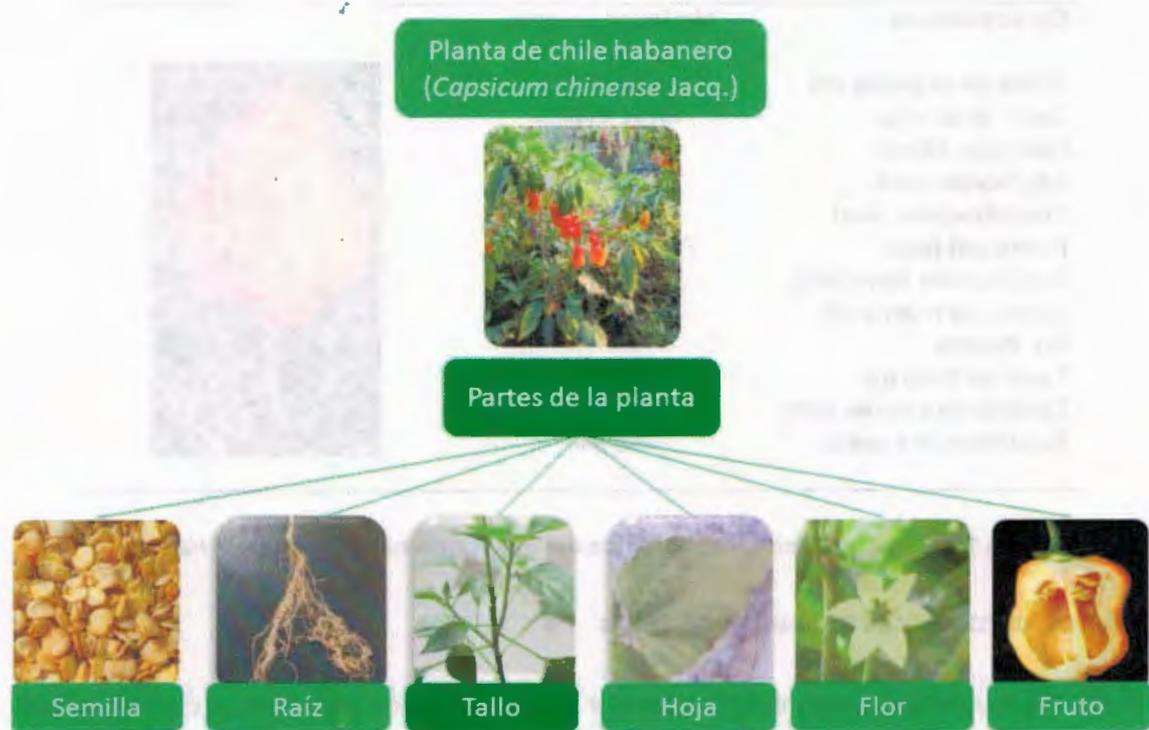


Figura 1.2 Partes de la planta de chile habanero

La caracterización morfológica de los morfotipos rojo y naranja de chile habanero (Canto, 2007) con las que se realizó este trabajo, se presenta a continuación:

Características	Morfotipo rojo
Altura de la planta (m)	1.4 a 1.6
Color de la hoja	Verde oscuro
Floración (días)	40 a 45
No. Flores/ axila	2 a 4
Fructificación (días)	55 a 60
Forma del fruto	Acampanulado
Longitud del fruto (cm)	4.5 a 6
Ancho del fruto (cm)	3 a 3.5
No. lóculos	3 a 4
Peso del fruto (g)	10 a 15
Tamaño de semilla (mm)	3
Superficie de semilla	Lisa



Figura 1.3 Caracterización morfológica del morfotipo rojo de chile habanero

Características	Morfotipo naranja
Altura de la planta (m)	1.2 a 1.3
Color de la hoja	Verde oscuro
Floración (días)	40 a 45
No. Flores/ axila	2 a 4
Fructificación (días)	55 a 60
Forma del fruto	Acampanulado
Longitud del fruto (cm)	3.5 a 4.5
Ancho del fruto (cm)	2.5 a 3
No. lóculos	3 a 4
Peso del fruto (g)	5 a 8
Tamaño de semilla (mm)	3
Superficie de semilla	Áspera



Figura 1.4 Caracterización morfológica del morfotipo naranja de chile habanero

1.4 Los carotenoides y su biosíntesis

Todos los isoprenoides son sintetizados por la condensación consecutiva de monómeros de isopentenil pirofosfato (IPP) de 5 carbonos. Hasta hace algunos años, se pensaba que el isopentenil pirofosfato se derivaba exclusivamente a partir de la unión de tres moléculas de acetil coenzima A (CoA) a través de una ruta conocida como del ácido mevalónico o mevalonato (MVA) debido a que en ésta dicho compuesto es el primer intermediario para la biosíntesis de IPP. Esta ruta opera en el citosol y en el retículo endoplásmico de las células de plantas, así como en animales, levaduras, arqueobacterias, algas, hongos y protozoarios. La ruta MVA consiste de seis enzimas: acetil-CoA tiolasa (AACT), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGS), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR), mevalonato cinasa (MVK), fosfomevalonato cinasa (PMK), difosfomevalonato descarboxilasa (PMD). En resumen, el IPP es sintetizado a través la ruta MVA mediante la condensación de dos grupos de acetil-CoA por acción de la acetoacetil-CoA sintasa (AACT); dos moléculas de acetil-CoA son condensadas entonces por efecto de la HMGS, dando lugar al 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA), el cual es reducido por la HMGR a ácido mevalónico. El ácido mevalónico es un intermediario de seis carbonos, que es fosforilado con dos grupos fosfato (pirofosfato) en dos pasos consecutivos por acción de las enzimas MVK y PMK para ser descarboxilado por acción la PMD y deshidratado para producir IPP. El IPP puede entonces ser transformado a su isómero

dimetilalil pirofosfato (DMAPP) por acción de la IPP isomerasa (IDI) (Takagi *et al.*, 2000).

Más tarde se demostró la existencia de una ruta alternativa para la producción de IPP en eubacterias y cloroplastos de algas verdes y plantas superiores (Rohmer *et al.*, 1999; Lichtenthaler *et al.*, 1997). Esta ruta alternativa, conocida como ruta del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), debido a que éste es el primer intermediario comprometido de la ruta, en las plantas se localiza en los plastidios. En resumen, la ruta MEP inicia con la formación de 1-desoxy-D-xilulosa-5-fosfato (DXP) por la condensación de piruvato y gliceraldehído 3-fosfato catalizada por la enzima DXP sintasa (DXS). El DXP sufre entonces un rearrreglo intramolecular y reducción catalizada por la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (DXR) para producir metil eritrol 4-fosfato (MEP), el cual es el precursor inmediato de los isoprenoides plastidiales. El MEP es convertido consecutivamente a 4-difosfocitidil-metileritritol (CDP-ME), 4-difosfocitidil-metileritritol fosfato (CDP-MEP) y metil-eritritol 2,4-ciclodifosfato (ME-cPP). Estas reacciones son llevadas a cabo por la enzima CDP-ME sintasa (CMS), CDP-ME cinasa (CMK) y ME-cPP sintasa (MCS). El metil-eritritol 2,4-ciclodifosfato (ME-cPP) es entonces convertido a hidroximetilbutenil 4-difosfato (HMBPP) por una enzima hidroximetilbutenil 4-difosfato sintasa (HDS). El HMBPP es convertido finalmente en una mezcla en IPP por acción de una enzima HMBPP reductasa (HDR) (Eisenreich *et al.*, 2001; 2004).

Dado que una de las rutas de síntesis de IPP se lleva a cabo en el citoplasma (AMV) y la otra en los plastidios (MEP), se dice que en las células vegetales la formación del IPP está compartimentalizada. Los principales productos finales de la ruta AMV son esteroides, triterpenos y sesquiterpenos, mientras que la biosíntesis de monoterpenos, diterpenos e isoprenoides plastidiales como son los carotenoides, fitol y plastoquinona-9, entre otros productos, se lleva a cabo a través de la ruta MEP localizada en los plastidios (Lichtenthaler *et al.*, 1997).

Los carotenoides son componentes químicos de lo que colectivamente se conocen como la ruta de biosíntesis de los terpenoides (Cunningham y Gantt, 1998). Los terpenoides tienen diferentes funciones como son las de estabilizadores de membrana (fitoesteroides), hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos fotosintéticos (cadenas de fitol de la clorofila y carotenoides), transportes de electrones (plastoquinona, prenilquinona y ubiquinona), vitaminas, como tocoferol (vitamina E), filoquinona (vitamina K1) (Rohmer *et*

al., 2000). En adición a esas funciones metabólicas y estructurales, muchos terpenoides específicos (comúnmente las familias C10, C15 y C20) participan en la comunicación y defensa celular contra el daño foto-oxidativo (Mc Garvey y Croteau, 1995).

Los carotenoides son tetraterpenos, compuestos de 40 átomos de carbono, formalmente derivados del fitoeno. Pueden ser de dos clases: los carotenos, compuestos hidrocarbonados, y las xantofilas, derivados oxigenados de los carotenos. Tradicionalmente los carotenoides han sido llamados con nombres triviales, usualmente refiriéndose a la fuente de la cual se aislaron por primera vez. En la actualidad se ha establecido un esquema sistemático para denominarlos describiendo su estructura de acuerdo a las reglas de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (Sánchez *et al.*, 1999).

La biosíntesis de los carotenoides (fig. 1.1) se inicia por la isomerización de moléculas de isopentenil pirofosfato (IPP), dando lugar a la dimetilalil difosfato (DMAPP), el cual es sustrato para la geranil difosfato sintetasa, para la producción de geranil difosfato (GPP), y éste último actúa como sustrato para la geranil-geranil difosfato sintasa, originándose el geranil geranil difosfato (GGPP). Es a partir del GGPP que se lleva a cabo la biosíntesis del fitoeno, el cual es el primer compuesto de tipo carotenoide (Simkin *et al.*, 2007).

Los carotenoides se originan en los plástidos de las células vegetales y son moléculas de 40 carbonos con dobles enlaces conjugados derivados de la dimerización de dos moléculas de 20 carbonos de GGPP, siendo éste último el precursor de múltiples isoprenoides de importancia como el tocoferol, clorofila, quinonas y giberelinas (Fraser *et al.*; 1995).

La relevancia de los carotenoides a nivel biológico radica en que son los responsables de proporcionar una gran variedad de colores tanto en animales como en plantas y microorganismos. Por ejemplo, el color naranja característico de la carne del salmón y el rojo de las conchas de las langostas son debidos al ceto-carotenoide astaxantina que obtienen por su alimentación a base de algas y microorganismos (Grotewold, 2006).

En plantas, además tienen un papel importante como componentes del mecanismo de defensa, de desarrollado, como respuesta de los organismos expuestos a alta irradiación solar, brindando foto protección durante la fotosíntesis y actuando como antioxidantes y reguladores de la fluidez de la membrana celular (Unmeno *et al.*, 2005), además de servir como precursores de la fitohormona ácido abscísico (ABA) (Grotewold, 2006).

La posterior conversión de fitoeno a licopeno, por su parte se lleva a cabo mediante la acción de dos enzimas desaturasas, la fitoeno desaturasa (PDS) y la ζ -caroteno desaturasa (ZDS), las cuales introducen cuatro dobles enlaces que convierten al fitoeno en licopeno, vía fitoflueno y neurosporeno (Cunningham y Gantt, 1998).

En el cuadro 1.1 se muestran algunos de los genes involucrados en la síntesis de carotenoides en diferentes organismos.

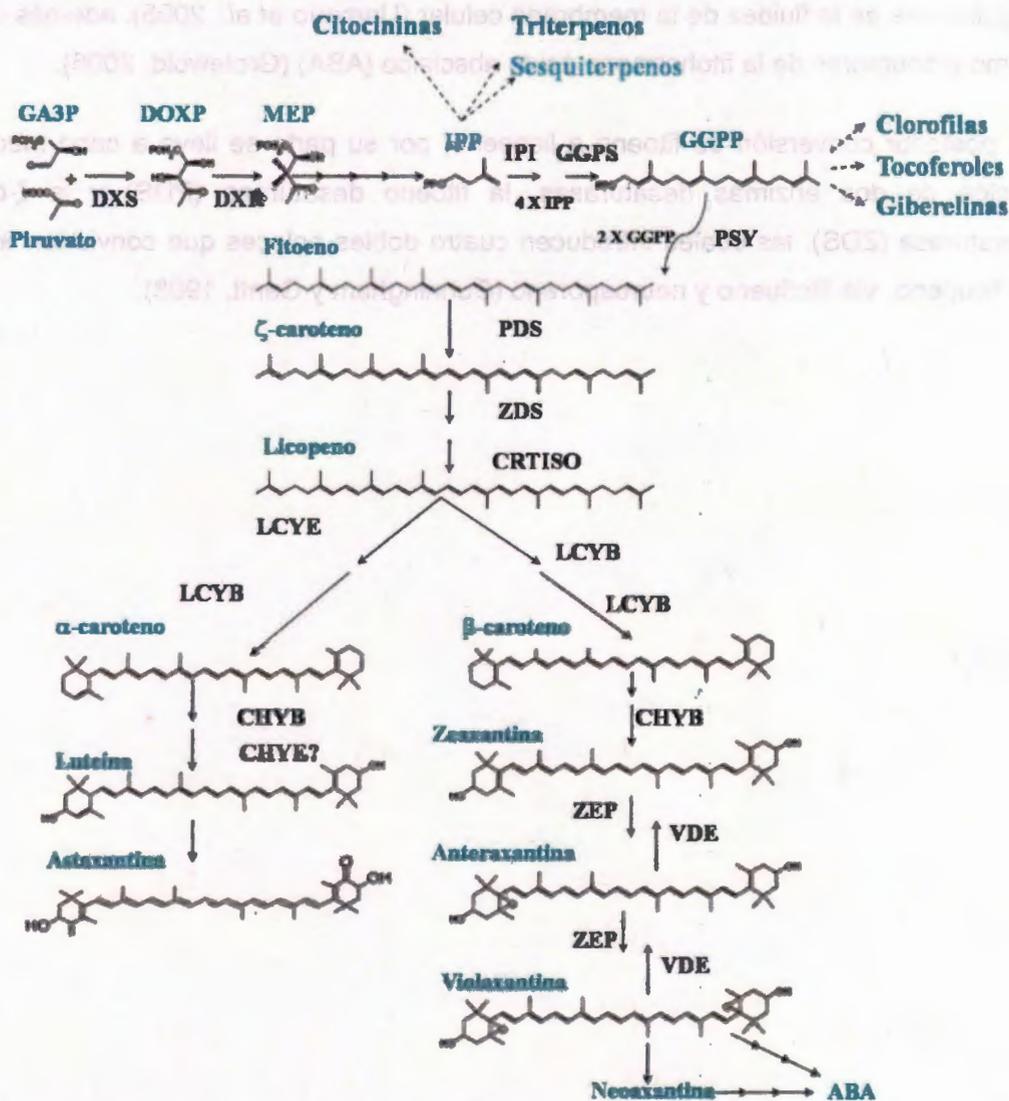


Figura 1.5 Esquema general de la biosíntesis de carotenoides en plantas. Los nombres de los compuestos se presentan en azul y los de las enzimas en negro. GA3P, gliceraldehído-3-fosfato; DOXP, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato; MEP, 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato; IPP, isopentenil pirofosfato; GGPP, geranyl geranyl pirofosfato; ABA, ácido abscísico; DXS, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa; DXR, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa; IPI, isopentenil pirofosfato isomerasa; GGPS, geranyl geranyl pirofosfato sintasa; PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; ZDS, ζ-caroteno desaturasa, CRTISO, caroteno isomerasa, LCYE, ε-licopeno ciclasa, LCYB, β-licopeno ciclasa, CHYB, β-caroteno hidroxilasa, CHYE7, ε-caroteno hidroxilasa, ZEP, zeaxantina epoxidasa, VDE, violaxantina de epoxidasa (Giuliano *et al.*, 2008).

Cuadro 1.1 Algunos genes que participan en la biosíntesis de carotenoides (Sánchez *et al.*, 1999, actualizada)

Función enzimática	Gen	Organismos
Formación de fitoeno y sus precursores		
GGPP sintasa	<i>CrtE</i> <i>gds</i> <i>idsA</i> <i>al-3</i>	Algunas bacterias, plantas superiores y hongos. Algunas plantas superiores, animales, hongos, bacterias y virus. Algunas bacterias y eurobacterias Algunas plantas superiores, hongos, animales, bacterias y virus (pepino mosaic virus).
Fitoeno sintasa	<i>crtB</i> <i>al-2</i> <i>PSY1, PSY2, Y1</i>	Algunas bacterias y planta (<i>Gentiana lutea</i>) Algunas plantas superiores, hongos, bacterias y virus. Algunas plantas superiores, animales, hongos, y bacterias.
Diapofitoeno sintasa	<i>crtM</i>	Algunas bacterias y animales
Formación de lycopeno o neurosporeno		
Fitoeno desaturasa (Tipo CrtI)	<i>crtI</i> <i>al-1</i> <i>carC</i> <i>PDH</i>	Algunas bacterias, algas y planta (<i>Capsicum annum</i>) Algunas plantas superiores, animales, hongos, bacterias y virus. Algunas bacterias, animales y hongo (<i>Aspergillus niger</i>). Algunas plantas superiores, animales, hongos y bacterias.

Fitoeno desaturasa (Tipo CrtP)	<i>crtP</i>	Algunas bacterias, animales, alga (<i>Pyropia yezoensis</i>) y planta (<i>Mantoniella squamata</i>).
Diapotiteno desaturasa	<i>PDS</i>	Algunas plantas superiores, hongos, bacterias y virus.
z- Caroteno desaturasa	<i>CrtN</i>	Algunas bacterias y alga (<i>Phaeodactylum tricornutum</i>).
	<i>CrtQ</i>	Algunas bacterias y cianobacterias.
	<i>ZDS</i>	Algunas plantas superiores, hongos y bacterias.
Formación de b- caroteno y a- caroteno		
Lycopeno ciclasa (Tipo Crt-Y)	<i>crtY</i>	Algunas bacterias y planta (<i>Manihot esculenta</i>).
(Tipo Crt-L)	<i>crtL</i>	Algunas bacterias y algas.
	<i>B-LCY</i>	Algunas plantas superiores, bacterias y hongos.
	<i>E-LCY</i>	Algunas plantas superiores y bacterias.
Formación de xantofilas acíclicas		
Hidroxineurosporeno sintasa	<i>crtC</i>	Algunas bacterias, hongos, animales y planta (<i>Arabidopsis thaliana</i>).
Metoxineurosporeno desaturasa	<i>crtD</i>	Algunas plantas superiores, bacterias, animales y hongos.
Hidroxineurosporeno o-metiltransferasa	<i>crtF</i>	Algunas plantas superiores, animales, bacterias y hongos.

Esferoideno monooxigenasa	<i>crtA</i>	Algunos animales, bacterias, virus y hongos.
Formación de xantofilas cíclicas y xantofilas glucosiladas		
b-Caroteno hidroxilasa	<i>crtZ</i>	Algunas plantas superiores, animales, hongos y bacterias.
e-Caroteno hidroxilasa	ϵ -CHX	Algunas plantas superiores, animales, bacterias y hongos.
Zeaxantina glucosidasa	<i>crtX</i>	Algunas bacterias
b-C-4-Oxigenasa	<i>crtW</i>	Algunas plantas superiores, animales, hongos y bacterias.
Capsantina- capsorubina sintasa	CCS	Algunas bacterias y planta (<i>Capsicum annum</i>).

1. 5 Plastidios

Los carotenoides en plantas, se sintetizan en los plastidios. Se denomina como plastidio a cualquier miembro de una familia de orgánulos presentes únicamente en el citoplasma de las células vegetales, que desempeñan una función de reserva, de fotosíntesis o de biosíntesis de moléculas esenciales para el funcionamiento celular (Wise, 2006). Todos los plastidios de una especie particular de plantas contienen múltiples copias del mismo genoma, el cual es relativamente pequeño, ribosomas y pueden sintetizar algunas proteínas propias (Vothknecht y Soll, 2006). Están delimitados por una cubierta compuesta de dos membranas concéntricas. Los plastidios derivan de precursores comunes, los proplastidios, presentes en las células inmaduras del embrión y del meristemo vegetal los cuales crecen tanto en la luz como en la oscuridad. El proplastidio se diferencia en un tipo específico de acuerdo a los requerimientos de la célula y, en determinadas condiciones, cada tipo específico es capaz de desdiferenciarse, así como de interconvertirse en otros tipos plastidiales (Alberts *et al.*, 1991).

Los plastidios varían principalmente en número, tamaño, forma, contenido y función según el tipo celular y el estadio de desarrollo de la célula, y se reproducen por fisión, con independencia del ciclo celular. Son ejemplos de plastidios los cloroplastos, que contienen los pigmentos verdes clorofila a y b, así como carotenoides de color anaranjado y xantofilas amarillas, los aleuoplastos contienen aleurona, los leucoplastos son plastidios incoloros implicados en la síntesis de monoterpenos, los amiloplastos son los que acumulan gránulos de almidón y los cromoplastos, que son organelos coloreados que sintetizan y contienen pigmentos de color, como los carotenos y las xantofilas, los cuales a su vez son el origen de los colores de muchos frutos, flores y hojas. Los cromoplastos se originan por división a partir de cloroplastos jóvenes o de cloroplastos maduros (Alberts *et al.*, 1991).

1.6 Aplicaciones de los carotenoides

En la avicultura se han utilizado durante muchos años, extractos naturales de zeaxantina, luteína y cantaxantina, de color amarillo, básicamente en la alimentación de gallinas de postura y pollos de engorda para optimizar el color de la yema de huevo y la piel de pollo (Fletcher, 1992; Marusich y Bauernfeind, 1981).

En acuicultura se usa astaxantina, de color naranja, para pigmentar la piel, piel o exoesqueleto de salmónidos y crustáceos (Nelis y De Leenheer, 1991; Shahaidi *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 1981).

Otros carotenoides como el β -caroteno y el 8-apocarotenal se utilizan en la producción de quesos, mantequilla, jugos, helados y dulces entre otros. Está bien demostrado que la ingesta de carotenoides es un factor importante en la salud humana. Algunos de ellos pueden transformarse en vitamina A, además ejercen protección contra serias enfermedades degenerativas y recientemente se ha descubierto que estimulan la respuesta inmune. Algunos carotenoides como el β -caroteno, α -caroteno y criptoxantina son una importante fuente de vitamina A en mamíferos. En humanos, la deficiencia de vitamina A es un problema que afecta a nivel mundial, especialmente a los niños, por lo que se ha buscado suplementar alimentos con carotenoides, particularmente con β -caroteno (Simmone *et al.*, 1996). King *et al.*, (1995) probaron que el β -caroteno lograba incrementar el contenido de acetato de vitamina A en la carne de pollos alimentados

durante tres semanas con este carotenoide.

Las propiedades antioxidantes de los carotenoides han despertado un interés creciente. Ying y Cheng, (1997) han demostrado el poder antioxidante del β -caroteno, empleando un modelo de liposomas. Por otro lado, dentro del área de medicina los carotenoides están recibiendo considerable atención debido a que su capacidad antioxidante se ha relacionado con la prevención del desarrollo de enfermedades como el cáncer, arteriosclerosis, cataratas, degeneración macular, envejecimiento prematuro y otras enfermedades degenerativas. Los carotenoides también se han relacionado con un aumento del sistema inmune y una disminución del riesgo de padecer enfermedades degenerativas tales como cánceres y enfermedades cardiovasculares. Estos efectos biológicos se han atribuido a una propiedad antioxidante de los carotenoides a través de la desactivación de los radicales libres y la captura del oxígeno singlete (Van den *et al.*, 2000; Melendez *et al.*, 2004; Fraser y Bramley, 2004).

Los carotenoides desempeñan en el organismo de los animales una función importante en la prevención de la degeneración macular de la retina, la disminución del riesgo de formación de cataratas y la formación y proliferación de epitelios. Además algunos carotenoides, como zeaxantina y luteína forman parte del sistema ocular de los mamíferos (Van den *et al.*, 2000; Melendez *et al.*, 2004; Fraser y Bramley, 2004).

Estudios epidemiológicos han demostrado una asociación entre el consumo de verduras, frutas y el riesgo de desarrollar cáncer. Esta relación es especialmente consistente con el cáncer pulmonar, pero también se ha observado en el cáncer del cuello uterino, después de controlar el efecto de las variables de confusión. El efecto protector de la dieta ha sido también demostrado con relación a la displasia cervical, pero no con relación al cáncer del endometrio. En el cáncer pulmonar se ha encontrado una disminución del riesgo de padecerlo que está asociado a un mayor consumo de verduras (Haverkos *et al.*, 2000).

La suplementación con vitamina E, vitamina C, o β - caroteno no retrasa el deterioro cognitivo en las mujeres con CVD (enfermedades cardiovasculares) preexistentes o por factores de riesgo. Un efecto tardío de la vitamina C o un efecto de los suplementos de β - caroteno entre las personas con una baja ingesta de éste en su dieta puede ser casualidad, pero en el estudio con tratamientos de larga duración (mayor a 10 años) está garantizado.

La interpretación clínica y las implicaciones de los estudios realizados concluyen que la suplementación con vitamina E, vitamina C, β - caroteno en mujeres mayores que padecen de enfermedades cardiovasculares es poco probable que reduzcan el riesgo de deterioro cognitivo (Kang et al., 2009).

Resultados del meta-análisis en cánceres primarios y secundarios, no fueron compatibles con cualquier efecto protector de la suplementación con β - caroteno en la incidencia de cáncer de pulmón, de páncreas, colorrectal, de próstata, de mama y de piel, de esta manera, proporcionan por primera vez pruebas de la ausencia del efecto de la suplementación con β - caroteno en el cáncer de piel, de próstata y de mama. De igual manera, no se observó ninguna reducción del pulmón, del páncreas o de los riesgos de padecer cáncer colorrectal con suplementos de β - caroteno. No se encontró ningún efecto significativo de la suplementación de β - caroteno en padecimientos de cáncer de estómago cuando se incluyeron todos los estudios disponibles en el meta-análisis. Esta evidencia promueve la ingestión de una dieta saludable, que incluya el consumo suficiente de frutas y verduras que proporcionen dosis nutricionales de diversos antioxidantes y micronutrientes, en lugar de suplementos de β - caroteno. El meta-análisis también indicó que los suplementos de β - caroteno podrían aumentar no sólo el riesgo de padecer cáncer de pulmón, sino también el riesgo de cáncer estomacal. En general, este estudio apoya la ausencia de cualquier efecto protector asociado a la suplementación de β - caroteno contra el riesgo de cáncer primario (Pecollo et al., 2010).

1.7 Carotenoides en *Capsicum spp.*

El chile es uno de los más antiguos y más ampliamente utilizado como aditivo de alimentos naturales. El color rojo típico que se encuentran en *Capsicum* se deriva de la capsantina y capsorrubina que son componentes exclusivamente sintetizados y acumulados durante la maduración del fruto de este género (Mínguez- Mosquera y Hornero-Méndez, 1994). La capsantina y capsorrubina son pigmentos que se encuentran en el pimiento rojo, de donde se extrae: *Capsicum annum L.* Tiene un color naranja intenso-rojo. Lo podemos encontrar en el mercado como un líquido anaranjado-rojizo. La aplicación más importante de este tipo de colorantes es en la fabricación de embutidos, pero su uso se puede extender hasta en el coloreado de bebidas, snacks, salsas, etc. (García, 2008). Por lo tanto, las variedades rojas de *Capsicum* han sido el foco de una serie de estudios durante muchos años sobre la composición de pigmentos carotenoides (Cholnoky *et al.*, 1955; Deli *et al.*, 2001).

Los colores naranja y amarillo presentes durante la maduración de los frutos de *C. chinense* se deben a la acumulación de diversos carotenoides como β - caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina (Ha *et al.*, 2007).

Los diferentes colores de los frutos maduros de chile no solo son atractivos para el consumidor sino también proporcionan vitamina A. Los carotenoides son sintetizados en el cromoplasto. En contraste con el jitomate, en donde se acumula el licopeno como el mayor carotenoide, la capsantina roja intensa de los frutos del chile se produce en mayor cantidad como un pigmento en algunos chiles.

La herencia del color del fruto maduro en el chile ha sido un tema de estudio durante mucho tiempo, pero no ha sido plenamente identificado. Hurtado-Hernández y Smith (1985) encontraron que había ocho fenotipos en la segregación de F2 de la cruce de los frutos blanco con rojo. Según estos autores, hay tres loci independientes para determinar el color del fruto, que se conocen como *c1*, *c2* y *y*. Recientemente, el gen capsantina-capsorrubina sintasa (CCS) el cual desempeña un papel en la conversión de anteraxantina a capsantina y violaxantina a capsorrubina, ha sido considerado como un gen candidato para el locus *y* (Lefebvre *et al.*, 1998). Sin embargo, los loci *c1* y *c2* necesitan ser identificados. Para los mejoradores, estos loci son de alto valor económico

ya que determinan los colores rojo, naranja y amarillo de los cultivares comerciales de Chile. Por otra parte, los frutos secos de Chile son fuentes importantes de pigmentos rojos naturales para la industria alimentaria y cosmética.

Hasta ahora, muchos genes implicados en la vía de biosíntesis de carotenoides se han caracterizado y clonado en Chile. Entre algunos trabajos relacionados, se puede mencionar la purificación de la isopentil pirofosfato isomerasa (IPP) y la geranyl geranyl pirofosfato sintasa (GGPS) de cromoplastos de *Capsicum* por cromatografía de afinidad. De igual manera, el aislamiento y la caracterización de una enzima bifuncional que cataliza la síntesis de fitoeno, la regulación de biosíntesis de xantofilas en *C. annum*, así como también el desarrollo y la regulación de genes de la vía de isoprenoides en condiciones de estrés en frutos de Chile. (Dogbo y Camara, 1987; Dogbo *et al.*, 1988; Huguene *et al.*, 1992; Kuntz *et al.*, 1992; Römer *et al.*, 1993; Bouvier *et al.*, 1994; Huguene *et al.*, 1995; Bouvier *et al.*, 1996; Huguene *et al.*, 1996). Sin embargo, la conexión directa entre estos genes y su expresión fenotípica no pudo establecerse debido a la falta de mutantes adecuados y a la disponibilidad de técnicas de transformación en los Chile. La función de genes aislados se puede postular a través de estudios bioquímicos o de la introgresión de genes en otros organismos, tales como el tabaco, el tomate o en bacterias.

1.8 Expresión de genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides

En el caso de expresión de genes de biosíntesis de carotenoides, en cítricos tales como limón, naranja y mandarina, se observó que la coloración de las cáscaras, característica del grado de maduración de estos frutos, está fuertemente relacionada con la acumulación de β - ϵ carotenoides en su etapa inmadura (verde) y de β - β carotenoides en su etapa madura (naranja). En contraste, en los sacos de jugo de la mandarina, incrementó la expresión de los genes *PSY*, *PDS*, *ZDS*, β -*LCY*, β -*HY* Y *ZEP*, los cuales participan en la producción de β - β xantofilas que conducen a la acumulación de β -*CRY* en esta etapa. Además, de manera general, en los sacos de jugo no se observaron transcritos de ϵ -*LCY* en su etapa verde y naranja por lo que sugieren que la síntesis de β - ϵ carotenoides ocurrió en etapas previas, ya que el gen ϵ -*LCY* se expresó exclusivamente en cloroplastos contenidos en tejidos fotosintéticos. (Kato *et al.*, 2004).

Durante el desarrollo de pétalos de cempasúchil se observó que mientras la expresión de β ciclasa no era inducida, la expresión de ϵ ciclasa si lo era. Además, el gen ϵ ciclasa fue altamente regulado en las variedades claras de cempasúchil pero no en las variedades amarilla y naranja por lo que se propuso que existe una correlación entre la acumulación de luteína y la inducción de genes en las variedades claras de cempasúchil (Moehs *et al.*, 2000)

Durante la maduración de tomate se observó que los niveles transcripcionales de *GGPS*, *PDS* y *ZDS* incrementaron, sugiriendo una respuesta por la acumulación de licopeno en las etapas tempranas de maduración. Por otro lado, los niveles de expresión de las enzimas "downstream" incrementaron en etapas avanzadas lo que podría llevar a la formación de β - β , β - ϵ carotenoides y xantofilas en menor medida. La acumulación de licopeno coincidió con la alta regulación de los genes *GGPS*, *PSY*, *PDS* y *ZDS* y la baja regulación de los genes β -*LCY* y β -*CH* (Namitha *et al.*, 2011)

De igual manera, durante el desarrollo de la flor y fruto de achiote (*Bixa orellana*) en dos cultivares; uno blanco y otro rosa, se observó del cultivar blanco que la expresión de ϵ -*lcy* fue elevada en tejido foliar y frutos inmaduros, que mostraron de manera general una alta regulación, sugiriendo que este gen tiene un papel importante en la acumulación de pigmentos fotosintéticos. Por otro lado, la expresión de β -*lcy* en el cultivar rosa coincidió con la acumulación de carotenoides, sugiriendo que este gen está probablemente relacionada con la biosíntesis de β - β - xantofilas (Rodríguez *et al.*; 2011).

En el género *Capsicum* se ha encontrado que los elevados niveles de expresión de los genes *PSY*, *PDS* y *CCS* coinciden con altos niveles de carotenoides totales. De igual manera se demostró que todos los chiles rojos acumulan altos niveles de capsantina y que expresan de manera elevada al gen *CCS* (Ha *et al.*, 2007).

Estudios realizados en *Gentiana lutea*, se encontró que la expresión del gen *PSY* incrementó en flores, pero los transcritos no fueron detectados en tallos y hojas. Los transcritos de los genes de *GGPPS*, *PDS* y *ZDS* se detectaron en flores y hojas pero no en tallos. El análisis de expresión de *PSY* y *ZDS* en los pétalos reveló que los niveles de transcritos fueron muy bajos en brotes jóvenes mientras que en flores completamente abiertas los niveles fueron altos y correspondieron con la formación de carotenoides.

Estos resultados indican que durante el desarrollo de las flores existe una correlación entre la acumulación de carotenoides, la acumulación de cromoplastos y la inducción de genes para enzimas que catalizan la síntesis de carotenoides (Zhu *et al.*, 2001).

De igual manera, se encuentran reportes sobre expresión de genes de biosíntesis de carotenoides en líneas transgénicas de *Nicotiana tabacum* donde no se encontraron cambios en los niveles de transcritos de los genes de biosíntesis de carotenoides examinados (*PSY1*, *PSY2*, *PDS*, *ZDS* y β -*LCY*), pero que sí hubo una grave disminución en la biosíntesis de carotenoides (Busch *et al.*, 2002).

Con base a lo anterior, se puede sugerir que existe una fuerte correlación entre la expresión de genes de biosíntesis de carotenoides y la acumulación de éstos. También, que la regulación de la síntesis de carotenoides depende en gran manera de la especie y del tipo de tejido a analizar ya que en el caso de los frutos se observa que la acumulación de carotenoides está fuertemente relacionada con expresión de genes. De esta manera, sería interesante conocer el patrón de expresión de genes de síntesis de carotenoides en la especie *C. chinense* Jacq. para entender mejor la regulación de genes en esta especie.

PREGUNTAS A RESOLVER

¿Los genes *ZDS*, *CCS*, β -*LCY* y ϵ -*LCY* se expresan de manera diferencial en los estados de desarrollo del fruto de chile habanero?

¿Existe alguna diferencia en la expresión de genes de carotenoides dependiendo de los dos morfotipos analizados en chile habanero?

OBJETIVO GENERAL

Analizar el patrón de expresión de genes implicados en la síntesis de carotenoides en los frutos en desarrollo de dos morfotipos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Obtención de los genes totales o parciales de *ZDS*, *CCS*, β -*LCY* y ϵ -*LCY* mediante el aislamiento de los mismos.
- 2) Determinar el patrón de expresión por RT-PCR en tiempo real de los genes *ZDS*, *CCS*, β -*LCY* y ϵ -*LCY* en diferentes etapas de maduración de los frutos de dos morfotipos de *C. chinense*.

JUSTIFICACIÓN

El chile habanero de la península de Yucatán se distingue internacionalmente por su elevada pungencia.

La sociedad ha venido mostrando una marcada preferencia por los productos elaborados a base de colorantes naturales. Existen chiles habaneros naranjas, rojos, amarillos (pigmentos carotenoides), morados (pigmentos flavonoides), entre otros. Esto permite inferir que esta especie puede ser una importante fuente de pigmentos, como carotenoides y antocianinas, los cuales son empleados por diferentes industrias para dar color a sus productos. En este sentido, el estudio de la expresión diferencial de genes relacionados con la síntesis de los carotenoides permitirá la identificación de morfotipos que por un lado pueden tener un alto potencial para la industria de colorantes y por otro para la selección de progenitores para el mejoramiento de chile habanero.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental (fig.1.6) consistirá primeramente en la obtención de frutos en seis estados de desarrollo de chile habanero tanto del morfotipo rojo como del naranja, posteriormente, se realizará la extracción de ARN total de los seis estados de desarrollo para la síntesis de ADNc. Por otro lado, del banco de datos del NCBI se obtendrán las secuencias de *ZDS*, *CCS*, β -*LCY* y ϵ -*LCY* de diferentes especies para realizar el alineamiento de las mismas y diseñar los cebadores para analizar por PCR punto final. Posteriormente, se clonarán y secuenciarán los fragmentos obtenidos de los genes para su análisis correspondiente. De igual manera, para la expresión génica del tejido foliar y de los seis estados de desarrollo en fruto (en condiciones de invernadero), se diseñarán los cebadores correspondientes a cada gen para analizar por RT-PCR en tiempo real.

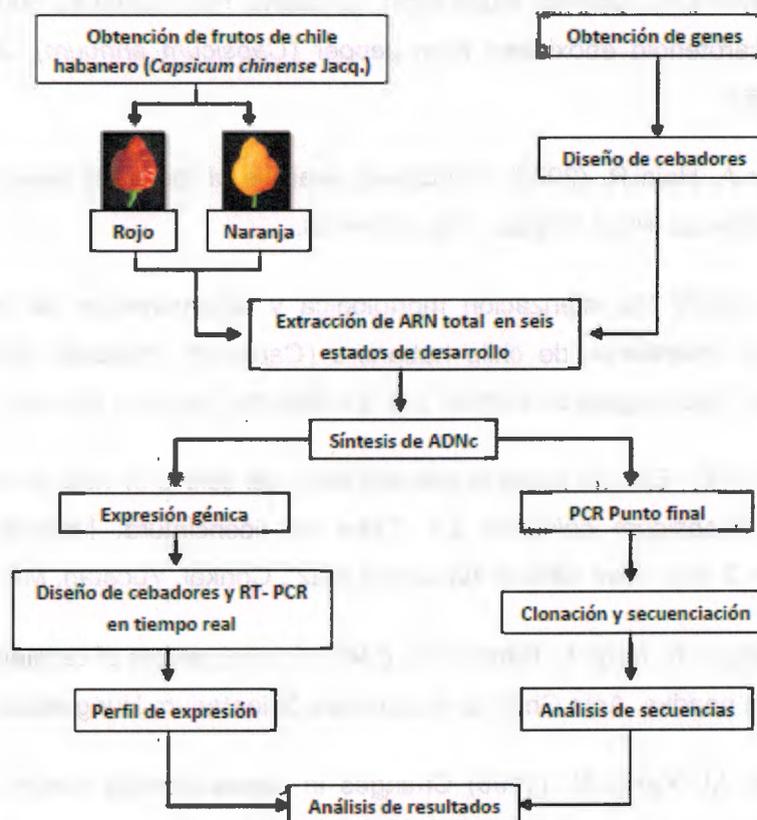


Figura 1.6 Estrategia experimental

BIBLIOGRAFÍA

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. (1991) "Energy conversion: mitochondria and chloroplasts", in Molecular biology of the cell, Third edition. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (eds). Garland Publishing, Inc. New York. pp. 653-720.

Bartley, Scolnik A, Guiliano G. (1994) Molecular Biology of carotenoid Biosynthesis in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. 45: 287-301.

Bouvier F, Hugueney P, d'Harlingue A, Kuntz M, Camara B. (1994) Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. Plant J. 6:45–54.

Bouvier F, d'Harlingue A, Hugueney P, Marin E, Marion-Poll A, Camara B. (1996) Xanthophyll biosynthesis: cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of β -cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). J. Biol. Chem. 271: 28861–28867.

Busch M, Seuter A, Hain R. (2002). Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. Plant Physiol. 128: 439–453.

Canto Flick A. (2007) Caracterización morfológica y determinación de los niveles de capsaicina en 18 accesiones de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Mérida. p.p. 89, Mérida, Yucatán, México.

Canul N. L. G. (1996). Estudio sobre la primera fase, del cultivo in vitro de meristemos de chile habanero (*Capsicum chinense* L.). Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico agropecuario No. 2 "Ing. José Alberto Navarrete Ruiz". Conkal, Yucatán, México. pp 4-5.

Cholnoky L, Györgyfy K, Nagy E, Pánczél M. (1955) Investigations of carotenoid pigments. I. Pigments of red paprika. Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae 6: 143–147.

Contreras Padilla M, Yahia M. (1998) Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile pepper and relation with peroxidase activity. J. Ag. Food Chem. 46: 2075-2078.

Cunningham F, and Gantt E. (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 557-583.

Deli J, Molnár P, Matus Z, Tóth G. (2001) Carotenoid composition in the fruits of red paprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rubrum*) during ripening; biosynthesis of carotenoids in red paprika. *J. Ag. Food Chem.* 49: 1517–1523.

Dogbo O, Camara B. (1987) Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum* chromoplasts by affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Acta* 920: 140–148.

Dogbo O, Laferriere A, d'Harlingue A, Camara B. (1988). Carotenoid biosynthesis: isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts. In: Reid E (ed) *Plant organelles*, vol 9. Ellis Horwood Publishers, Chichester, pp 47–59.

Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A. (2001) Deoxy-xylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, 6(2): 78–84.

Eisenreich W, Bachera A, Arigonib D, Rohdicha F. (2004) Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Science*, 61(12): 1401–1426.

Fletcher, D. (1992). Methodology for achieving pigment specifications. *Poultry Sci.* 71: 773-743.

Fraser P, Truesdale M, Bird C, Schuch W, Bramley P. (1995) The effect of reduced activity of phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from gibberellin pathway. 8: 693-701.

Fraser P, Bramley P. (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* 43(3): 228-265.

García, V. (2008) Evolución de compuestos funcionales durante la maduración de frutos de *Opuntia stricta*. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica de Cartagena. 92 p.

Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, Beyer P, Taylor M. (2008) Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Biotechnology*, 26(3): 139-145

González M. (2004). El género *Capsicum* al servicio de la sociedad guatemalteca, Simposio y Seminario Taller sobre el género *Capsicum*: chiles. Ciudad Guatemala, junio 2004.

Grotewold E. (2006). The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 57: 761-80.

Guzmán I, Hamby S, Romero J, Bosland P, O'Connell M. (2011). Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. *Plant Sci.* 179: 49-59.

Ha S, Kim J, Park J, Lee S, Cho K. (2007). A comparison of the accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin- capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *J. Exp. Botany.* 58: 3135-3144.

Haverkos H, Rohre M, Pickworth W. (2000) The cause of invasive cervical cancer could be multifactorial. *Biomed Pharmacother.* 54: 54-59.

Huguene P, Römer S, Kuntz M, Camara B. (1992) Characterization and molecular cloning of a flavoprotein catalyzing the synthesis of phytofluene and ζ -carotene in *Capsicum* chromoplasts. *Eur. J. Biochem.* 209: 399–407.

Huguene P, Badillo A, Chen H, Klein A, Hirschberg J, Camara B, Kuntz M. (1995) Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant J.* 8: 417–42.

Huguene P, Bouvier F, Badillo A, Quennemet J, d'Harlingue A, Camara B. (1996). Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits. *Plant Physiol.* 111: 619–626.

Hurtado Hernandez H, Smith P. (1985) Inheritance of mature fruit color in *Capsicum annuum* L. *J. Hered* 76: 211–213.

Johnson E, Schroeder W.(1995) Microbial carotenoids. *Adv. Biochem. Eng.* 53 :119-178.

- Kang J, Cook N, Manson J, Buring J, Albert C, Grodstein F. (2009) Vitamin E, vitamin C, beta carotene, and cognitive function among women with or at risk of cardiovascular disease: the women's antioxidant and cardiovascular study. *Circulation. J.A. H. Assoc.* 119: 2772-2780.
- Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, Sugiera M, Hyodo H, Yano M. (2004) Accumulation of carotenoids and expresión of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol.* 134(1): 824-837.
- King, A, Uijtterboogaart T, De Vries A. (1995) α -Tocopherol, β -carotene and ascorbic acid as antioxidants in stored poultry muscle. *J. Food Sci.* 60: 1009-1012.
- Klaur, H. y Bauernfeind J. (1981) Carotenoids as food color. En: Bauernfeind J. (ed). *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors* p. 48-319. Acad. Press, New York.
- Kuntz M, Römer S, Suire C, Huguency P, Weil J, Schantz R, Camara B. (1992) Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening. *Plant J.* 2: 25-34.
- Lanteri, S. (1991) Lack of a karyotype class and skewed chromosome segregation in two backcross progenies of *Capsicum*. *J. Genet. & Breed.* 45: 51-58.
- Lefebvre V, Kuntz M, Camara B, Palloix A. (1998) The capsanthin-capsorubin synthase gene: a candidate gene for the y locus controlling the red fruit colour in pepper. *Plant Mol. Biol.* 36:785-789.
- Lichtenthaler H, Scwender J, Disch A, Rohmer M. (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplast proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters*, 400(3), 271-274.
- Long- Solís J. (1998) *El placer del chile*. México: Clío. 93 p.
- Nelis J, De Leenheer A. (1991) Microbial sources or carotenoid pigments used in foods and feeds. *J. Appl. Bacteriol.* 70 :181-191.

Maoka T, Fujiwara Y, Hashimoto K, Akimoto N. (2001) Isolation of a series of apocarotenoids from the fruit of the red paprika *Capsicum annuum* L. J. Ag. Food Chem. 49: 1601–1606.

Marusich W, y Bauernfeind J. (1981) Oxycarotenoids in poultry feeds. En: Bauernfeind J. (ed) Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors p. 319-462. Acad. Press, New York y Londres.

Mc Garvey D, Croteau R. (1995) Terpenoid metabolism. Plant cell. 7 (7): 1015-1026.

Melendez Martínez A, Vicario I, Heredia F. (2004) Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. Arch. Latinoam. Nutr. 54 (2): 149-155.

Mínguez Mosquera M, Hornero Méndez D. (1994) Formation and transformation of pigments during the fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola and Agridulce. J. Ag. Food Chem. 42: 38–44.

Moehs C, Tian L, Osteryong K, Penna D. (2000) Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. Plant Mol. Biol. 45: 281-293.

Namitha K, Archana S, Negi P. (2011) Expression of carotenoid biosynthetic pathway genes and changes in carotenoid during ripening in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Food Func. 2: 168-173.

Nelis H, De Leenheer A. (2008) Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. J. App. Microbiol. 70: 181- 191.

Pecollo N, Latino P, Norat T, Barrandon E, Bertrais S, Galan P, Hercberg S. (2010) Beta-carotene supplementation and cancer risk: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. Inter. J. C. 127(1): 172-184.

Pickersgill, B. (1989) Genetic resources of *Capsicum* for tropical regions, In tomato and Pepper Production in the Tropics, Tainan, Taiwan. Asian Vegetable Research and Development Center, pp. 2-8.

Pollak S, Saukko P. (2000) Clinical Forensic Medicine, Overview. In: Encyclopedia of Forensic Sciences. Siegel JA, Saukko PJ, Knupfer GC. Acad. Press San Diego. San Francisco. New York. Boston. London. Sidney. Tokio. 362-368.

Ramírez Malagon R, Ochoa Alejo N. (1996) An improved and reliable chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method. Plant Cell Reports. 16(3/4): 226-231.

Rodríguez N, Narváez J, Aguilar M, Rivera M. (2011) Regulation of pigment- related genes during flower and fruit development of *Bixa orellana*. Plant Mol. Biol. Rep. 29: 43-50.

Römer S, Huguency P, Bouvier F, Camara B, Kuntz M. (1993) Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Capsicum annuum*. Biochem. Biophys. Res. Commun 196: 1414–1421.

Rohmer M (1999). A mevalonate independent route to isopentenyl diphosphate. Comprehensive Natural Products Chemistry, 2(1): 45-67.

Romer S., Fraser P., Kiano J., Shipton P., Misawan N. (2000) Elevation of provitamin A content of transgenic tomato plants. Nat. Biotech. 18: 666-669.

Sánchez A, Flores L, Langley E, Martín R, Maldonado G, Sánchez S. (1999) Carotenoides: estructura, función, biosíntesis, regulación y aplicaciones. Revista latinoamericana de microbiología, 41: 175-191.

Shahaidi F, Metusalach, Brown J. (1998) Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 38: 1-67.

Takagi M, Kuzuyama T, Takahashi S, Seto H. (2000) A gene cluster for the mevalonate pathway from *Streptomyces* sp. Strain CL190. Journal of Bacteriology, 182(15): 4153-4157.

Simkin J, Gaffé J, Alcaraz J, Carde J, Bramley P, Fraser P, Kuntz M. (2007) Fibrillin influence on plastid ultrastructure and pigment content in tomato fruit. Phytochem. 68: 1545-1556.

Simonne A, Green N, Bransby D. (1996) Consumer acceptability and β -carotene content of beef as related to cattle finishing diets. J. Food Sci. 61: 1254-1256.

Simpson K, Katamaya T, Chichester C. (1981) Carotenoids in fish feeds. En: J. C. Bauernfend (ed) Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors p. 463-538. Acad. Press, New York.

Smith P, Heiser C. (1957) Taxonomy of *Capsicum chinense* Jacq. and the geographic distribution of the cultivated Capsicum species. Bul. Torrey Bot. Club 84: 413-420.

Trujillo, J. (2001) Descripción varietal del chile habanero (*Capsicum chinense* J.), chile habanero, memorias, Mérida, Yuc.

Trujillo Aguirre J, Gutiérrez Alonso O, Pérez Llanes C. (2004) Morfología de planta y fenología de genotipos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) colectados en Yucatán, México Primera Convención Mundial del Chile: 59-63.

Tun Dzul José (2001) Chile habanero Características y Tecnología de producción, SAGARPA-INIFAB.:5-16.

USDA Natural Resources Conservation Service. (2003) Plants National database. (Enred). Disponible en: http://www.plants.usda.gov/cgi_bin/plant_profile.cgi?simbol=CACH30.

Van den Berg, H, Faulks R, Granado H, Hirschberg J, Olmedilla B, Sandmann G, Southon S, Stahl W. (2000) The potential for the improvement of carotenoide levels in food and the likely systemic effects. J.Sci.Food Agric. 80 (7): 880-912.

Vothknecht U, Soll J. (2006) "Protein import into chloroplasts: Who, When and How?", in The structure and function of plastids, Wise RR and JK Hooper (eds). Springer, the Netherlands. pp: 53-74.

Wise, RR. (2006) "The diversity of plastids form and function", in The structure and function of plastids, Wise RR and JK Hooper (eds). Springer, The Netherlands. pp: 3-26.

Ying M, Cheng W. (1997) Oxymyoglobin and lipid oxidation in phosphatidylcholine liposomes retarded by α -Tocopherol an β -carotene. J. Food Sci. 62: 1095-1097.

Zhu S, Yamamura H, Koiwa M, Nishihara, Sandmann G. (2002) cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea*. *Plant Mol. Biol.* 48: 277–285.

CAPÍTULO II

AISLAMIENTO DE LOS ADNc PARCIALES DE ZDS, CCS, β -LCY y ϵ -LCY DE FRUTOS DE CHILE HABANERO

2.1 INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son empleados en diversas industrias como la alimentaria, cosmética y farmacéutica, es por ello que surge la importancia de estudiar algunos genes que codifican a las enzimas que dan lugar a los diversos compuestos carotenoides.

El gen *ZDS* codifica para la enzima que da lugar a la formación de licopeno, el cual es utilizado en la industria de alimentos ya que es un pigmento de color rojo y se comercializa en forma de polvo. Sus aplicaciones son salsas, sopas, botanas, etcétera (García, 2008).

El gen ϵ -*LCY* codifica para la enzima que participa en la formación de α -caroteno, el cual presenta una coloración amarilla que es aplicada en alimentos como helados, margarina, mayonesas, salsas, confitería, bebidas, etcétera. También se usa en alimentos grasos por su solubilidad (García, 2008).

El gen β -*LCY* codifica para la enzima que da lugar a la formación de β -caroteno, el cual tiene el papel de provitamina A que ayuda a prevenir la ceguera infantil (Simmons *et al.*, 1996). Además, el β -caroteno, se encuentra en el mercado como un líquido anaranjado a diferentes concentraciones o también en forma de polvo anaranjado. Se aplica en la industria alimentaria para la producción de lácteos, margarina, bebidas, botanas, entre otros (García, 2008).

El gen *CCS* codifica para la enzima que participa en la formación de la capsantina y capsorubina, los cuales presentan un color naranja intenso o rojo y se pueden encontrar en el mercado como un líquido anaranjado-rojizo. La aplicación más importante de este tipo de colorantes es en la fabricación de embutidos, pero su uso se puede extender hasta el coloreado de bebidas, botanas, salsas, entre otros. También se usa en la fabricación de cosméticos (García, 2008).

En el banco de datos dentro del NCBI, se encuentra reportada una secuencia de ARNm correspondiente a ZDS en *C. annuum* con un tamaño de 1982 pb y aislada de frutos maduros de *C. annuum* cultivar Lamuyo (X89897.1).

De igual manera, para el gen β -LCY, se encuentran varias secuencias reportadas en *C. annuum*. Una secuencia de ARNm con un tamaño de 1785 pb y aislada de frutos maduros de *C. annuum* cultivar Lamuyo (X86221.1). También se encuentran siete secuencias de ADN genómico con un tamaño de 1497 pb aislados del pericarpio de frutos de *C. annuum* cultivar Canary (GU085272.1), *C. annuum* cultivar Fogo (GU085270.1), *C. annuum* cultivar Orange Grande (GU085268.1), *C. annuum* cultivar Valencia (GU085266.1), *C. annuum* cultivar Dove (GU085271.1), *C. annuum* cultivar NuMex Sunset (GU085269.1), *C. annuum* cultivar Oriole (GU085267.1).

Para el gen CCS, se encuentran siete secuencias de ADN genómico con un tamaño de 1494 pb aislados del pericarpio de frutos de *C. annuum* cultivar Canary (GU122937.1), *C. annuum* cultivar Fogo (GU122933.1), *C. annuum* cultivar Orange Grande (GU122936.1), *C. annuum* cultivar Valencia (GU122934.1), *C. annuum* cultivar Dove (GU122939.1), *C. annuum* cultivar NuMex Sunset (GU122935.1), *C. annuum* cultivar Oriole (GU122938.1). También, existe una secuencia de ARNm reportada en *C. annuum* cultivar Lamuyo de 1784 pb aislada de frutos maduros (X76165.1), una secuencia de ADN genómico de 2159 pb aislada de la cepa "Yolo wonder" (X77289.1) y una secuencia de ADN genómico de 1997 pb aislada de la cepa "Yolo wonder" clona U3 (X78030.1).

No existen secuencias reportadas para el gen ϵ -LCY en el género *Capsicum* dentro del banco de datos del NCBI.

Hasta el momento, se sabe que los frutos maduros de chile poseen un rango variado de coloración que van desde blanco hasta rojo intenso. Para entender los mecanismos regulatorios de la biosíntesis de los carotenoides y la variación en los colores de los frutos, se han analizado diferentes variedades de *Capsicum* spp. (*C. baccatum*, *C. annuum*, *C. pubescens* y *C. chinense*), para esto se midieron los niveles y composición de los carotenoides acumulados en estas variedades y se analizaron los patrones de expresión de genes de la biosíntesis de carotenoides. Se encontró que los chiles rojos acumulan niveles elevados de carotenoides totales durante su maduración, mientras que

los chiles no rojos acumulan niveles bajos. Los niveles de expresión de los genes *PSY*, *PDS* y *CCS* son elevados en chiles con contenidos altos de carotenoides totales, mientras que uno o dos de estos genes no se expresaron en chiles con niveles bajos de carotenoides totales. De igual manera, se encontró que el gen *CCS* está presente en dos variedades de *Capsicum* cuyo color en estado maduro es amarillo (Ha *et al.*, 2007).

Por otro lado, no se tienen reportes acerca del patrón de expresión de *ZDS*, β -*LCY* y ϵ -*LCY* en la biosíntesis de carotenoides en el género *Capsicum* por lo que obtener esta información ayudaría a conocer mejor la regulación de estos genes de biosíntesis de carotenoides en Chile.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

Todos los chiles utilizados para este trabajo fueron crecidos y cosechados bajo condiciones de invernadero. Para el aislamiento del ADNc correspondiente a ZDS se utilizó el morfotipo de chile habanero rojo en la etapa 5 de maduración (30 días después de la floración completa) y para el aislamiento del ADNc correspondiente a β -LCY y ϵ -LCY se utilizó el morfotipo de de chile habanero rojo en la etapa 4 de maduración (15-17 días después de la floración completa). Se usaron estos chiles para el aislamiento ya que eran los que estaban disponibles.

Para el aislamiento del ADNc correspondiente a CCS se utilizó el morfotipo de maduro de chile habanero rojo, es decir, la etapa 6 de maduración (35-40 días después de la floración completa) ya que Ha y colaboradores (2007) reportan la expresión del gen CCS en chiles rojos y maduros.

2.2.2 Extracción de ARN

Se siguió la metodología reportada por Chomczynski y Sacchi (1987), ligeramente modificada por Gómez-Uc (2006). Todos los pasos de centrifugación fueron desarrollados por centrifugación a 13000 rpm en un rotor Sorvall # 3328 (Sorvall® fresco) a 4 °C.

La muestra (fruto y hoja colectados en el invernadero) se maceró en N₂ líquido, y se agregó 5 mL de Trizol (38% v/v de Fenol, 12.5 mM de tiocianato de guanidina ultrapura, 6.25 mM de tiocianato de amonio, 100 mM de acetato de sodio y 5% de glicerol grado biología molecular) por cada 500 mg de muestra, se incubó por 10 min a temperatura ambiente (TA) y centrifugó por 15 min, el sobrenadante se depositó en un tubo nuevo, agregándole 1/5 de volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1). Se agitó en un vórtex y se incubó por 3 min a TA. Luego, se centrifugó 15 min para la separación de fases. La fase incolora acuosa (superior) se transfirió a un tubo nuevo y se agregó un volumen igual de isopropanol frío. Se incubó la muestra a 4 °C toda la noche, posteriormente se centrifugó por 15 min. La pastilla se lavó con etanol 70% frío y se centrifugó por 15 min (tres veces). Se lavó con etanol 100% frío y se retiró el etanol por centrifugación. La pastilla se dejó secar a TA y se resuspendió en 35 μ L de agua tratada

con dietilpirocarbonato (DEPC). Se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.3 Cuantificación y comprobación de la integridad del ARN total

La cuantificación del ARN total se realizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm con la fórmula siguiente:

$$[\mu\text{g de ARN mL}^{-1}] = \frac{(\text{DO}_{260\text{ nm}}) (40\ \mu\text{g de ARN mL}^{-1}) (2\ \text{mL})}{2\ \mu\text{L}}$$

Donde:

DO 260 nm= Lectura espectrofotométrica de la solución de ARN a 260 nm

40 $\mu\text{g ARN}\cdot\text{mL}^{-1}$ = Factor que relaciona la concentración de una solución de ARN con su absorción a 260 nm, determinado empíricamente

2 mL= Volumen total de la celda

2 μL = Volumen de la alícuota de ARN evaluada

Para verificar la integridad del ARN, se fraccionó una alícuota de éste mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.4%, este ARN se mezcló con amortiguador de carga que contenía bromuro de etidio en concentración de $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.2.4 Síntesis de ADNc

Para la síntesis de ADNc fue utilizada la enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen).

El procedimiento fue el siguiente: se mezclaron 1 μL de ARN ($1\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 1 μL de random primer (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1 μL de dNTPs 10 μM y agua hasta un volumen final de 13 μL . La mezcla se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min y posteriormente se incubó en hielo por 2 min. Seguidamente se le adicionó 4 μL del amortiguador 5X first strand, 1 μL de DTT 0.1 M y 1 μL de la transcriptasa reversa (200 U/ μL) y se incubó a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 min, y a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min (para inactivar a la enzima).

A continuación, para verificar la integridad del ADNc fue fraccionada una alícuota en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio ($1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.2.5 Diseño de cebadores

Para el diseño de los cebadores de los genes *CCS*, *ZDS*, β -*LCY* y ϵ -*LCY* se realizó un alineamiento por medio del programa Clustal 2.0. Se alinearon secuencias de especies de dicotiledóneas obtenidas del GENBANK banco de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las figuras se presentan en los resultados.

2.2.6 Amplificación por PCR punto final

Para las reacciones de PCR se utilizaron los siguientes componentes y los programas a utilizar para los cuatro genes de estudio.

PCR para los genes β -*LCY* y ϵ -*LCY*

Componente	Cantidad (1X)
10 X PCR Buffer (- Mg ²⁺)	2 μ l
50 mM MgCl ²	0.6 μ l
10 mM dNTPs	0.4 μ l
Cebador reverso (20 μ M)	2 μ l
Cebador directo (20 μ M)	2 μ l
Taq. polimerasa (5U/ μ l)	0.6 μ l
ADNc	Según concentración
H ₂ O	Hasta 20 μ l
Volumen final	20 μ l

Programa de reacción para el gen ϵ -LCY

94°C 3 minutos

94°C 1.5 minutos

55°C 1.5 minutos

72°C 1.5 minutos

} 35X

72°C 10 minutos

Programa de reacción para el gen β -LCY

94°C 3 minutos

94°C 1.5 minutos

45°C 1.5 minutos

72°C 1.5 minutos

} 35 X

72°C 10 minutos

PCR para el gen CCS**Componente****Cantidad (1X)**10 X PCR Buffer (+ Mg²⁺)1.5 μ l

10 mM dNTPs

0.6 μ lCebador reverso (10 μ M)1 μ lCebador directo (10 μ M)1 μ lTaq. Fast Start (5U/ μ l)0.12 μ l

CAPÍTULO II

ADNc	Según concentración
H ₂ O	Hasta 15 µl
Volumen final	15 µl

Programa de reacción para el gen CCS

95°C	4 minutos	
95°C	30 segundos	} 35 X
60°C	30 segundos	
72°C	1:50 segundos	
72°C	7 minutos	

PCR para el gen ZDS

Componente	Cantidad (1X)
10 X PCR Buffer (- Mg ²⁺)	1.5 µl
5X GC Rich	1.5 µl
10 mM dNTPs	0.3 µl
Cebador reverso (10 µM)	1 µl
Cebador directo (10 µM)	1 µl
Taq. Fast Start (5U/ µl)	0.12 µl
ADNc	Según concentración

H₂O Hasta 15 μ l

Volumen final 15 μ l

Programa de reacción para el gen ZDS

95°C 4 minutos

95°C 30 segundos

62°C 30 segundos } 32 X

72°C 1:30 segundos

72°C 10 minutos

2.2.7 Ligación de los fragmentos, transformación de bacterias y clonación

El vector empleado fue el pGEM T-Easy de la casa comercial PROMEGA, para lo cual se procedió a realizar la siguiente mezcla: 0.5 μ l del vector pGEM, 1 μ l de T4 ADN ligasa, 5 μ l del amortiguador de la ligasa (buffer de ligación 2X, T4) y 3.5 μ L del producto purificado.

La mezcla se incubó a 4 °C toda la noche. Posterior a esto se procedió a la transformación del fragmento del gen empleando células competentes de la cepa DH-5 α de *E. coli*. Después de la transformación se seleccionaron las colonias blancas por medio de visualización. Estas colonias se colectaron con palillos estériles y se colocaron para su crecimiento en 8 ml de medio LB líquido (10 g/L de bacto triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L de NaCl y 15 g/L de agar) adicionado con 8 μ l de ampicilina (100 μ g/ μ L). Estas se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación. De estas colonias se hicieron las extracciones del ADN plasmídico por medio del protocolo del kit de QIAGEN. Para la visualización de ADN plasmídico se fraccionó una alícuota en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (1 μ g·mL⁻¹).

2.2.8 Verificación de la presencia del inserto

Una vez obtenido el ADN plasmídico, se verificó la presencia del fragmento del gen analizado mediante la restricción con alguna enzima que flanquee el sitio múltiple de clonación del vector, en este estudio se empleó la enzima *Eco RI*. Se verificó la presencia de los fragmentos en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

2.2.9 Cuantificación del plásmido y análisis de la secuencia

La cuantificación del plásmido se realizó a una relación de absorbancia a 260/280 nm. Esta se mandó a secuenciar a la empresa "Macrogen" en Corea del sur. La secuencia recibida se comparó con el banco de datos de "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) dentro del programa Blast para su identificación y análisis.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Obtención del material vegetal

Se cosecharon los frutos de chile habanero del morfotipo rojo en el estado de desarrollo 4 presentaron un color verde bajo y un tamaño de 3.5 cm de largo por 3 cm de ancho, los frutos del estado de desarrollo 5 presentaron un color entre verde/ rojo y un tamaño de 4.5 cm de largo por 4 cm de ancho y los frutos del estado de desarrollo 6 presentaron un color rojo y un tamaño de 4.5 cm de largo por 4 cm de ancho (figura 2.1).

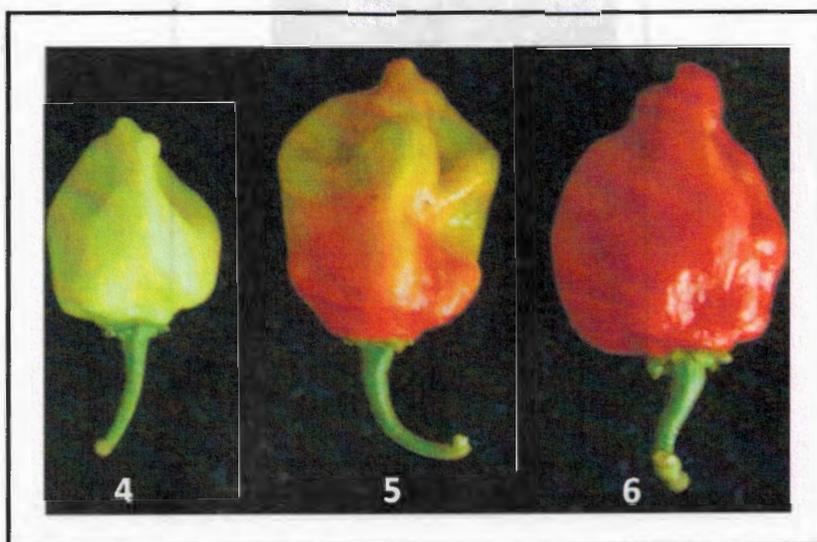


Figura 2.1 Obtención de frutos del morfotipo rojo de *Capsicum chinense* Jacq. 4: Chile habanero de 15-17 días después de la floración completa, 5: Chile habanero de 30 días después de la floración completa, 6: Chile habanero de 35-40 días después de la floración completa.

2.3.2 Extracción de ARN de pericarpio de chile habanero

Se realizó la extracción de ARN de pericarpio de las tres muestras de chile habanero del morfotipo rojo. En la figura 2.2 se muestra el fraccionamiento del ARN total en la que se puede notar una buena calidad del ARN total.

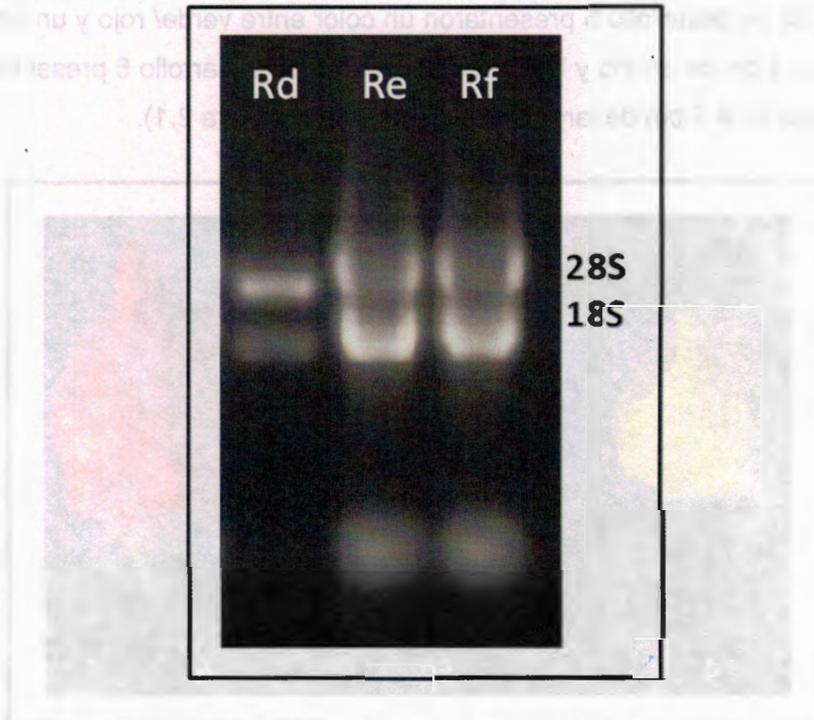


Figura 2.2 ARN de pericarpio de chile habanero. Muestras de dos microlitros de ARN extraído de diferentes muestras fueron fraccionadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%, teñido con $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. 28 S y 18 S denotan la posición de los ARN de las subunidades ribosomales. Rd, Re y Rf: Estadios de maduración 4, 5, y 6 del morfotipo rojo, respectivamente.

2.3.3 Amplificación de los ADN complementarios

Se sintetizó ADNc de primera cadena (figura 2.3) y se observó una buena calidad del mismo.

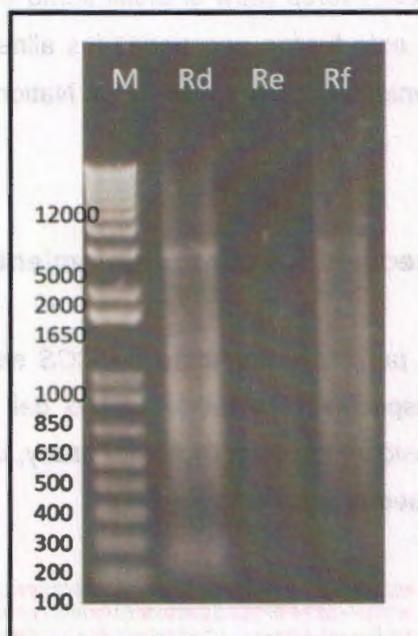


Figura 2.3 Síntesis de ADNc. Muestras de 8 microlitros de ADN complementario fueron fraccionadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1 teñido con $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen). Rd, Re y Rf: Estadios de maduración 4, 5, y 6 del morfotipo rojo, respectivamente.

C.annuum_canary_ccs	VKHEEFESSIVCDDGRKISGSLIVDASGYASDFIEYDKPRNHGYQVAHGI	241
C.annuum_Orange	VKHEEFESSIVCDDGRKISGSLIVDASGYASDFIEYDKPRNHGYQVAHGI	241
C.annuum_NuMexSunset_ccs	VKHEEFESSIVCDDGRKISGSLIVDASGYASDFIEYDKPRNHGYQVAHGI	241
C.annuum_Dove_ccs	VKHEEFESSIVCDDGRKISGSLIVDASGYASDFIEYDKPRNHGYQVAHGI	241
C.annuum_Oriole_ccs	VKHEEFESSIVCDDGRKISGSLIVDASGYASDFIEYDKPRNHGYQVAHGI	241
C.sinensis_ccs	VNHQEFESSIVCDDGNEIKASLIVDASGFASSFVEYDKPRNHGYQVAHGI	246
D.carota_ccs	VDHQEFESSILCDDGKEFKASLIVDASGFASFVDYDKPRNHGYQVAHGI	235
	*.:*****:****:..*****:*** *.:*****:****	
C.annuum_canary_ccs	LAEVDNHPPFDLDMMLMDWRDSDLGNEPYLRVKNTKEPTFLYAMPFDRNL	291
C.annuum_Orange	LAEVDNHPPFDLDMMLMDWRDSDLGNEPYLRVKNTKEPTFLYAMPFDRNL	291
C.annuum_NuMexSunset_ccs	LAEVDNHPPFDLDMMLMDWRDSDLGNEPYLRVKNTKEPTFLYAMPFDRNL	291
C.annuum_Dove_ccs	LAEVDNHPPFDLDMMLMDWRDSDLGNEPYLRVKNTKEPTFLYAMPFDRNL	291
C.annuum_Oriole_ccs	LAEVDNHPPFDLDMMLMDWRDSDLGNEPYLRVKNTKEPTFLYAMPFDRNL	291
C.sinensis_ccs	LAEVESHPPFDLDMMLMDWRDSDLGNEPYLRASNKLPFLYAMPFDSNL	296
D.carota_ccs	LAEVESHPPFDLDMMLMDWRDSDLGNEPALRFANAKSPTFLYAMPFDSNL	285
	*****:***:****:*****:***** ** * * ***** **	
C.annuum_canary_ccs	VFLEETSLVSRPMLSYMEVKRRMVARLRHLGKIVRSVLEEEKCVITMGGP	341
C.annuum_Orange	VFLEETSLVSRPMLSYMEVKRRMVARLRHLGKIVRSVLEEEKCVITMGGP	341
C.annuum_NuMexSunset_ccs	VFLEETSLVSRPMLSYMEVKRRMVARLRHLGKIVRSVLEEEKCVITMGGP	341
C.annuum_Dove_ccs	VFLEETSLVSRPMLSYMEVKRRMVARLRHLGKIVRSVLEEEKCVITMGGP	341
C.annuum_Oriole_ccs	VFLEETSLVSRPMLSYMEVKRRMVARLRHLGKIVRSVLEEEKCVITMGGP	341
C.sinensis_ccs	VFLEETSLVSRPMLSYMEVKRRMVARLRHLGKIVRSVLEEEKCVITMGGP	341
D.carota_ccs	VFLEETSLVSRPMLSYMEVKRRMVARLRHLGKIVRSVLEEEKCVITMGGP	341
	*****:***:****:*****:***** ** * * ***** **	
C.annuum_canary_ccs	LPRIQNVMAIGGTSIVHPSSGYMVARSMALAPVLAIAEIVESLGSTRMI	391
C.annuum_Orange	LPRIQNVMAIGGTSIVHPSSGYMVARSMALAPVLAIAEIVESLGSTRMI	391
C.annuum_NuMexSunset_ccs	LPRIQNVMAIGGTSIVHPSSGYMVARSMALAPVLAIAEIVESLGSTRMI	391
C.annuum_Dove_ccs	LPRIQNVMAIGGTSIVHPSSGYMVARSMALAPVLAIAEIVESLGSTRMI	391
C.annuum_Oriole_ccs	LPRIQNVMAIGGTSIVHPSSGYMVARSMALAPVLAIAEIVESLGSTRMI	391
C.sinensis_ccs	LPVIQSVMAIGGTSIVHPSSGYMVARSMALAPVLAIAEIVESLGSTRMI	396
D.carota_ccs	LPRTPDVVAIGGTSIVHPSTGYMVARSMALAPVLAIAEIVESLGSTRMI	385
	** *.:*****:***:****:*****:***** ** * * ***** **	
C.annuum_canary_ccs	RGSQLYHRVWNLWPSDRRRVRECYCFGMETLLKLDLEGARRLFDFFDV	441
C.annuum_Orange	RGSQLYHRVWNLWPSDRRRVRECYCFGMETLLKLDLEGARRLFDFFDV	441
C.annuum_NuMexSunset_ccs	RGSQLYHRVWNLWPSDRRRVRECYCFGMETLLKLDLEGARRLFDFFDV	441
C.annuum_Dove_ccs	RGSQLYHRVWNLWPSDRRRVRECYCFGMETLLKLDLEGARRLFDFFDV	441
C.annuum_Oriole_ccs	RGSQLYHRVWNLWPSDRRRVRECYCFGMETLLKLDLEGARRLFDFFDV	441
C.sinensis_ccs	RGSQLYHRVWNLWPSDRRRVRECYCFGMETLLKLDLEGARRLFDFFDV	441
D.carota_ccs	RGSQLYHRVWNLWPSDRRRVRECYCFGMETLLKLDLEGARRLFDFFDV	441
	*****:***:****:*****:***** ** * * ***** **	
C.annuum_canary_ccs	DPKYWHGFLSSRSLSVKELAVLSLYLFGHASNLARLDIVTKCTVPLVKLLG	491
C.annuum_Orange	DPKYWHGFLSSRSLSVKELAVLSLYLFGHASNLARLDIVTKCTVPLVKLLG	491
C.annuum_NuMexSunset_ccs	DPKYWHGFLSSRSLSVKELAVLSLYLFGHASNLARLDIVTKCTVPLVKLLG	491
C.annuum_Dove_ccs	DPKYWHGFLSSRSLSVKELAVLSLYLFGHASNLARLDIVTKCTVPLVKLLG	491
C.annuum_Oriole_ccs	DPKYWHGFLSSRSLSVKELAVLSLYLFGHASNLARLDIVTKCTVPLVKLLG	491
C.sinensis_ccs	NPYYWHGFLSSRSLSVKELAVLSLYLFGHASNLARLDIVTKCTVPLVKLLG	496
D.carota_ccs	DPHYLWVWNLWPSDRRRVRECYCFGMETLLKLDLEGARRLFDFFDV	485
	*.:*****:****:..*****:*** *.:*****:****	
C.annuum_canary_ccs	NLAIESL	498
C.annuum_Orange	NLAIESL	498
C.annuum_NuMexSunset_ccs	NLAIESL	498
C.annuum_Dove_ccs	NLAIESL	498
C.annuum_Oriole_ccs	NLAIESL	498
C.sinensis_ccs	NLALETI	503
D.carota_ccs	NLAVETI	492
	::****:*****:***** ** * * ***** **	

Figura 2.4 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos (aa) de genes CCS de especies diferentes de dicotiledóneas. Los residuos idénticos se muestran con asteriscos. Los cebadores seleccionados se encuentran resaltados en color azul turquesa. *C. annuum* cultivar canary (GU122937.1) orange (GU122936.1), numex sunset (GU122935.1), dove (GU122939.1) y oriole (GU122938.1), *C. sinensis* (AAF18389.1) y *D. carota* (DQ192191.1).

2.3.4.2 Alineamiento de secuencias para el aislamiento del gen parcial ZDS

Para diseñar los cebadores para el aislamiento de ZDS se realizó el alineamiento de diferentes secuencias de especies reportadas dentro del NCBI entre las cuales se encuentran las especies de *Citrus sinensis*, *Citrus sunshiu*, *Capsicum annum*, *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana* y *Carica papaya* (figura 2.5).

```

C.sinensis_ZDS      -----
C.sunshiu_ZDS      MGSS---VLFPATSVT-----GVSWSRVQEKCRRFCVRASLDA---NVS 38
C.annuum_ZDS       MATCSAYLCCPATSASLKKRVFPDGSAGFLFFGRRLSNRLVTPKSVIRADLNS---MVS 57
S.lycopersicum_ZDS MATSSAYLSCPATSATGKKHVFPNGSPGFLVFGGTRLSNRLVTRKSVIRADLDS---MVS 57
A.thaliana_ZDS     MASSVVFARTGSLSPV-----PLKSRRFVNSSLDS---DVS 34
C.papaya_ZDS       MASSVLFARTSVAGLRS-----LAAQVKQQRVCVRSSLDSLETNVS 41

C.sinensis_ZDS      -----
C.sunshiu_ZDS      DMSVNAPQGLFPPEPEHYRGPCLKVAIIGAGLAGMSTAVELLDQGHEVDIYESRSFIGGK 98
C.annuum_ZDS       DMSTNAPKGLFPPEPEHYRGPCLKVAIIGAGLAGMSTAVELLDQGHEVDIYESRTFIGGK 117
S.lycopersicum_ZDS DMSTNAPKGLFPPEPEHYRGPCLKVAIIGAGLAGMSTAVELLDQGHEVDIYESRTFIGGK 117
A.thaliana_ZDS     DMSVNAPKGLFPPEPVYPYKGPCLKVAIIGAGLAGMSTAVELLDQGHEVDIYDSRTFIGGK 94
C.papaya_ZDS       DMSVNAPKGLFPPEPEHYRGPCLKVAIVGAGLAGMSTAVELLDQGHEVDIYDCRSFIGGK 101

C.sinensis_ZDS      -----
C.sunshiu_ZDS      VGSFVDKRGNHIEMLGHVFFGCGYNNLFRMLMKKVGADKNLLVKDHTHTFVNQGGEGIGELDF 158
C.annuum_ZDS       VGSFVDKRGNHIEMLGHVFFGCGYNNLFRMLMKKVGAEKNLLVKEHTHTFVNKGGEGIGELDF 177
S.lycopersicum_ZDS VGSFVDRGNHIEMLGHVFFGCGYNNLFRLLKKVGAEKNNLLVKEHTHTFVNKGGEGIGELDF 177
A.thaliana_ZDS     VGSFVDRGNHIEMLGHVFFGCGYNNLFRMLMKKVGAEKNLLVKDHTHTFINKDGTIGELDF 154
C.papaya_ZDS       VGSFVDKRGNHIEMLHV-----LFRMLMKKVGADKNLLVKDHTHTFVNEGGEIGELDF 161

C.sinensis_ZDS      -----
C.sunshiu_ZDS      RFPVIGAPLHGIRAFLSTNQLKTYDKARNALALALSPVVKALVDPDGALKDIRDLDSISFS 218
C.annuum_ZDS       RFPVIGAPLHGIRAFLSTNQLKTYDKARNAVALALSPVVRALVDPDGALQDIRDLDSVVSFS 237
S.lycopersicum_ZDS RFPVIGAPLHGIRAFLSTNQLKIYDKARNAVALALSPVVRALVDPDGALQDIRDLDNVVSFP 237
A.thaliana_ZDS     RFPVIGAPLHGIRAFLSTNQLKPYDKLRNSLALALSPVVKALVDPDGAMRDIRNLDSISFS 214
C.papaya_ZDS       RFPVIGAPLHGIRAFLSTNQLKTYDKARNALALALSPVVKALVDPDGAMVDIRNLDSISFS 221

C.sinensis_ZDS      -----
C.sunshiu_ZDS      DWFLSKGGTQTSIQRMWDPVAYALGFIDCDNISARCMLTIFALFATKTEASLLRMLKGSP 13
C.annuum_ZDS       DWFLSKGGTRASIQRMWDPVAYALGFIDCDNISARCMLTIFALFATKTEASLLRMLKGSP 278
S.lycopersicum_ZDS DWFLSKGGTRASIQRMWDPVAYALGFIDCDNMSARCMLTIFALFATKTEASLLRMLKGSP 297
A.thaliana_ZDS     DWFLSKGGTRASIQRMWDPVAYALGFIDCDNMSARCMLTIFSLFATKTEASLLRMLKGSP 297
C.papaya_ZDS       DWFISKGGTRTSIQR-----LGFIDCDNISARCMLTIFSLFATKTEASLLRMLKGSP 274
*****

C.sinensis_ZDS      DVYLSGPIRKYITDKGGRFHLRWGCREILYDKAANAETYVKGLAMSKATDKKVVQADAYV 73
C.sunshiu_ZDS     DVYLSGPIRKYITDKGGRFHLRWGCREILYDKAANAETYVKGLAMSKATDKKVVQADAYV 338
C.annuum_ZDS       DVYLSGPIKYYIIDKGGRFHLRWGCREVLYETSSDGSMYVSGLAMSKATQKKIVKADAYV 357
S.lycopersicum_ZDS DVYLSGPIKYYIIMDKGGRFHLRWGCREVLYETSSDGSMYVSGLAMSKATQKKIVKADAYV 357
A.thaliana_ZDS     DVYLSGPIKQYITDRGGRIHLRWGCREILYDKSADGETYVTGLAISKATNKKIVKADVYV 334
C.papaya_ZDS       DVYLSGPIKYYIIDRGGRFHLRWGCRKILYDRSADGQIRVTGLAISKATNKKIVKADAYV 341
*****;*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

C.sinensis_ZDS     AACDVPGIKRLLPSSWREMKFFNNIYALVGVPVVTVQLR-----LQDLERSRQLRRAL 133
C.sunshiu_ZDS     AACDVPGIKRLLPSSWREMKFFNNIYALVGVPVVTVQLRYNGWVTELQDLERSRQLRRAL 398
C.annuum_ZDS       AACVVPGIKRLVPQKWELEFFGNIYKLIGVPVVTVQLRYNGWVTELQDLERSRQSKRAT 417
S.lycopersicum_ZDS AACDVPGIKRLVPQKWELESEFNIYKLVGVPVVTVQLRYNGWVTELQDLERSRQLKRAA 417
A.thaliana_ZDS     AACDVPGIKRLLPKEWRESRFFNDIYELEGVPVVTVQLRYNGWVTELQDIELARLQKRAV 394
C.papaya_ZDS       AACDVPGIKRLLPSEWRELKFFNDIYELVGVPVVTVQLRYNGWVTELQDLERSRQLKRAA 401
*****;*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

```

```

C.sinensis_ZDS      GLDNLLYTPDADFSCFADLALTSPEYDYREGQGSLLQCVLTPGDPYMPNDEIIRRVAK 193
C.sunshiu_ZDS      GLDNLLYTPDADFSCFADLALTSPEYDYREGQGSLLQCVLTPGDPYMPNDEIIRRVAK 458
C.annuum_ZDS       GLDNLLYTPDADFSCFADLALASPEYDYIEGQGSLLQCVLTPGDPYMPNDEIIRRVSK 477
S.lycopersicum_ZDS GLDNLLYTPDADFSCFADLALASPDYDYIEGQGSLLQCVLTPGDPYMPNDEIIRRVTK 477
A.thaliana_ZDS     GLDNLLYTPDADFSCFADLALASPADYDYIEGQGTLLQCVLTPGDPYMRMPNDKIIEKVAM 454
C.papaya_ZDS       GLDNLLYTPDADFSCFADLALASPEYDYIEGQGSLLQCVLTPGDPYMSLPNDEIVRRVAE 461
*****:*** ** * ***:*****:..*:*:..*:*:
C.sinensis_ZDS     QVLALFPSSQGLEVIWSSVVKIGQSLYREGPGKNSRPDQKTPVKNFFLAGSYTKQDYID 253
C.sunshiu_ZDS     QVLALFPSSQGLEVIWSSVVKIGQSLYREGPGKDFFRPDQKTPVKNFFLAGSYTKQDYID 518
C.annuum_ZDS     QVLALFPSSQGLEVTWSSVVKIGQSLYREGPGKDFFRPDQKTPVENFFLAGSYTKQDYID 537
S.lycopersicum_ZDS QVLALFPSSQGLEVTWSSVVKIGQSLYREGPGKDFFRPDQKTPVENFFLAGSYTKQDYID 537
A.thaliana_ZDS   QVTELFPSRRGLEVTWSSVVKIAQSLYREAPGKDFFRPDQKTIKKNFFLAGSYTKQDYID 514
C.papaya_ZDS     QVTLTFPSQGLEVIWSSVVKIGQSLYREAPGKDFFRPDQKTPVNNFFLAGSYAKQDYID 521
** *****:*** *****:*****:****:*****:*****:*****:*****
C.sinensis_ZDS     SMEGATLSGRQASA----- 267
C.sunshiu_ZDS     SMEGATLSGRQASAYICNAGEELVALRKQLAAEFESQEQMEAPTTNDELSLV 570
C.annuum_ZDS     SMEGATLSGRQASAYICDAGEQLLALRKKIAAAELNEISKV-VLSDELTLV 588
S.lycopersicum_ZDS SMEGATLSGGQASAYICNVGEQLMALRKKITAAELNDISKV-VLSDELTLV 588
A.thaliana_ZDS   SMEGATLSGRQASSYICDAGEELAEELNKKLS-----SSATAVPELSLV 558
C.papaya_ZDS     S*****LSGRQASAYICDAGEDLLAMRKKLQMIIE-SLEQTKPANIPDELSVV 572
***** ** *:

```

Figura 2.5 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos (aa) de genes *ZDS* de especies diferentes de dicotiledóneas. Los residuos idénticos se muestran con asteriscos. Los cebadores seleccionados se encuentran resaltados en color azul turquesa. *C. sinensis* (AY669083.1), *C. sunshiu* (DQ309869.1), *C. annuum* (X89897.1), *S. lycopersicum* (AF19507.1), *A. thaliana* (NM_202493.2) y *C. papaya* (FJ812088.1).

2.3.4.3 Alineamiento de secuencias para el aislamiento del gen parcial β -LCY

Para diseñar los cebadores para el aislamiento de β -LCY se realizó el alineamiento de diferentes secuencias de especies reportadas dentro del NCBI entre las cuales se encuentran las especies de *Capsicum annuum*, *Tagetes erecta*, *Carica papaya*, *Citrus sinensis*, *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus* (figura 2.6).

```

C.annuum_B-LCY      MDTLLRTPNNLEFL---HGFGVKVSAFSS----VKSQKFGAKKFCGLGS 43
T.erecta_B_LCY     MDTLLRTPNNLEFL---HGFGVKVSAFSS----VKSQKFGAKKFCGLGS 43
C.papaya_B_LCY     MDTLLKTHNKLEFLPQLRGFSEKSSSSSS--RLQNPELRFPGPKYPW-KRG 48
C.sinensis_B-LCY   MDTLLKTHNKLEFLPQVHGALEKSSSLSLKIQNQLKFKLKKSRQ-KRN 49
A.thaliana_B-LCY   MDTLLRTPNNLEFL---HGFGVKVSAFSS----VKSQKFGAKKFCGLGS 43
B.napus_Yeongsan_B-LCY MDTLLRTPNKLEFFIIPQFHGFERLSPHPS-----RVKLGKKRSIRIGS 44
C.annuum_B-LCY     RSVCVKASSSALLELVPETKKNLDFELPMYDPSKGVVVDLAVVGGGPPAG 93
T.erecta_B_LCY     RSVCVKASSSALLELVPETKKNLDFELPMYDPSKGVVVDLAVVGGGPPAG 93
C.papaya_B_LCY     RDGCLKASNSALLELVPETKKTLDLDFELPMYDPSKGLVVDLAVVGGGPPAG 98
C.sinensis_B-LCY   RSCFIKASSSALLELVPETKKNLDFELPMYDPSKGLVVDLAVVGGGPPAG 99
A.thaliana_B-LCY   RSVCVKASSSALLELVPETKKNLDFELPMYDPSKGVVVDLAVVGGGPPAG 93
B.napus_Yeongsan_B-LCY TS----TSSSALLDLVPETKKNLDFDLPLYDTSLNKVVVDLAVVGGGPPAG 90
C.annuum_B-LCY     LAVAQQVSEAGLSVCSIDPNPKLIWPNNYGVVWVDFEAMDLLDCLDATWS 143
T.erecta_B_LCY     LAVAQQVSEAGLTVCSIDPSPKLIWPNNYGVVWVDFEAMDLLDCLDTTWS 71
C.papaya_B_LCY     LAVAQQVSEAGLSVCSIDPSPKLIWPNNYGVVWVDFEAMDLLDCLDTTWS 148
C.sinensis_B-LCY   LAVAQQVSEAGLSVCSIDPSPKLIWPNNYGVVWVDFEAMDLLDCLDTTWS 149
A.thaliana_B-LCY   LAVAQQVSEAGLSVCSIDPSPKLIWPNNYGVVWVDFEAMDLLDCLDTTWS 12
B.napus_Yeongsan_B-LCY LAVAQQVSEAGLSVCSIDPSPKLIWPNNYGVVWVDFEAMDLLDCLDTTWS 140
*****:***

```


A.thaliana_E-LCY	AEILREETTKQINSN-----ISRQAWDTLWPPERKRQRAFFLFGALALIVQFDTEGIRSF	460
C.sinensis_E-LCY	-----	
N.tabacum_E-LCY	ANILRQNHVKNMLTSSSTTS-ISTQAWNTLWPQERKRQSF	460
S.lycopersicum_E-LYC	ANILRQHYSKNMLTSSSIPS-ISTQAWNTLWPQERKRQSF	463
T.erecta_E-LYC	AKILGKGNKQMLDLGRYTTNISKQAWETLWPLERKRQRAFFLFGALALIVQMDIEGTRTF	461
D.carota_E-LYC	-----	
A.thaliana_E-LCY	FRTFFRLPKMWWQGFLGSTLTSGDLVLFALYMFVIS	520
C.sinensis_E-LCY	-----	
N.tabacum_E-LCY	FRAFFLVPKMWWQGFLGSSLSADLMLFAFYMFIIAPNDRKGLIRHLLSDPTGATMIRT	520
S.lycopersicum_E-LYC	FRAFFRVPKMWWQGFLGSSLSADLMLFAFYMFIIAPNDRKGLIRHLLSDPTGATLIRT	523
T.erecta_E-LYC	FRTFFRLPTMWWGFLGSSLSSTDLIIAFYMFIIAPHSLRMGLVLRHLLSDPTGGTMLKA	521
D.carota_E-LYC	-----	
A.thaliana_E-LCY	YLVK	524
C.sinensis_E-LCY	----	
N.tabacum_E-LCY	YLTF	524
S.lycopersicum_E-LYC	YLTF	527
T.erecta_E-LYC	YLTII	525
D.carota_E-LYC	----	

Figura 2.7 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos (aa) de genes ϵ -LCY de especies diferentes de dicotiledóneas. Los residuos idénticos se muestran con asteriscos. Los cebadores seleccionados se encuentran resaltados en color azul turquesa. *A. thaliana* (NM_125085.4), *C. sinensis* (AF450280.1), *N. tabacum* (HQ993098.1), *S. lycopersicum* (EU533951.1), *T. erecta* (AY099485.1) y *D. carota* (AF229684.1).

2.3.4.5 Obtención de los cebadores seleccionados

Después de los alineamientos realizados se eligieron los sitios conservados (resaltados en color turquesa) para el diseño de los cebadores degenerados los cuales se muestran en el cuadro 2.1. Los alineamientos fueron realizados a partir de secuencias de a.a. obtenidos a través del banco de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). No se empleó ADN genómico debido a que en éste se encuentran intrones, los cuales de acuerdo a literatura son eliminados cuando el ARNm es procesado y se encuentra maduro, y por lo tanto el ADNc proveniente de éste no cuenta con intrones y resulta igual de útil emplear la secuencia de aminoácidos (proteína).

Para la obtención de los oligonucleótidos correspondientes a cada gen, se utilizó el programa BCM search launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>) que generó los cebadores degenerados con su respectiva secuencia nucleotídica dependiendo de la especie.

Cuadro 2.1 Cebadores diseñados para los genes *CCS*, *ZDS*, β -*LCY* y ϵ -*LCY* a partir de los alineamientos realizados

Cebador	Secuencia (5' - 3')
CCS F1	GGATTGGAGRGATTCTCATTTTRGG
CCS F2	ATGGAGACTTTTGYTGAAGCTKGAT
CCS F3	GGAGACTTTTGYTGAAGCT
CCS R1	ATCMAGCTTCARCAAAGTCTCCAT
CCS R2	GACAACTYGA VGAMARRAAYCC
ZDS F1	TTCTTYGGWTGYTAYAAAYAAT
ZDS F2	ATGTGGGATCCTGTTGCHTAYGCY
ZDS F3	TAYAATGGYTGGGYACDGAG
ZDS R1	RGCRTADGCAACAGGATCCCACAT
ZDS R2	CTCHGTRACCCARCCATTRTA
E-LCY-F1	ATGGTTTTTCATGGAYTAYAGAG
E-LCY-F3	TGTTTGGCHTCRAAAGAKG
E-LCY-R1	CMTCTTTYGADGCCAAACA
E-LCY-R2	TGGTCHTAYATHCCDGTWGGKGG
B-LCY-F1	AARATGH TDCARAARTGYAT
B-LCY-F2	AAYWSHARRATHCCHACD TT
B-LCY-F3	GGDATRG TDCAYCCDTCVACYGG
B-LCY-R1	AAHGT DGGDATYYTDSWRTT
B-LCY-R2	TGTGTNATHCCDATGGGYGGKCC
B-LCY-R3	CCRGTBG AHGGRTGHACYATHCC
B-LCY-R4	CARAGRGARTTYTTYTG YTTYGG
B-LCY-R5	TAYTGGCAYGGNTTYTTR

Posteriormente, se realizaron todas las combinaciones posibles con los cebadores correspondientes a cada gen y en el cuadro 2.2 se muestran las combinaciones empleadas para el análisis de los genes *CCS*, *ZDS*, β -*LCY* y ϵ -*LCY* y los tamaños esperados de los fragmentos de amplificación.

Cuadro 2.2 Combinaciones de los cebadores para los genes *CCS*, *ZDS*, β -*LCY* y ϵ -*LCY*

Combinación	Forward	Reverse	Tamaño esperado	Resultados
1	CCS-F1	CCS-R1	450 pb	No amplificó
2	CCS-F1	CCS-R2	525 pb	No amplificó
3	CCS-F2	CCS-R2	50 pb	Tamaño esperado
4	CCS-F3	CCS-R2	50 pb	Productos de diferente tamaño
Combinación	Forward	Reverse	Tamaño esperado	Resultados
1	ZDS-F1	ZDS-R1	375 pb	No amplificó
2	ZDS-F1	ZDS-R2	810 pb	No amplificó
3	ZDS-F2	ZDS-R2	460 pb	Tamaño esperado
Combinación	Forward	Reverse	Tamaño esperado	Resultados
1	β -LCY-F1	β -LCY-R1	330 pb	No amplificó
2	β -LCY-F1	β -LCY-R2	480 pb	No amplificó
3	β -LCY-F1	β -LCY-R3	576 pb	No amplificó
4	β -LCY-F1	β -LCY-R4	735 pb	No amplificó
5	β -LCY-F1	β -LCY-R5	846 pb	Productos de diferente tamaño
6	β -LCY-F2	β -LCY-R2	210 pb	Productos de diferente tamaño
7	β -LCY-F2	β -LCY-R3	276 pb	Productos de diferente tamaño
8	β -LCY-F2	β -LCY-R4	430 pb	Productos de diferente tamaño
9	β -LCY-F2	β -LCY-R5	520 pb	No amplificó
10	β -LCY-F3	β -LCY-R4	156 pb	No amplificó
11	β -LCY-F3	β -LCY-R5	246 pb	No amplificó
Combinación	Forward	Reverse	Tamaño esperado	Resultados
1	ϵ -LCY-F1	ϵ -LCY-R1	138 pb	No amplificó
2	ϵ -LCY-F1	ϵ -LCY-R2	243 pb	No amplificó
3	ϵ -LCY-F2	ϵ -LCY-R1	588 pb	No amplificó
4	ϵ -LCY-F2	ϵ -LCY-R2	633 pb	Productos de diferente tamaño
5	ϵ -LCY-F3	ϵ -LCY-R2	135 pb	Productos de diferente tamaño

2.3.5 Reacciones de amplificación por PCR de punto final de los genes *CCS*, *ZDS*, β -*LCY* y ϵ -*LCY*

Para las reacciones de PCR se emplearon todas las combinaciones de los cebadores del cuadro 2.4 para los cuatro genes: *CCS*, *ZDS*, β -*LCY* y ϵ -*LCY*. Es importante señalar que algunas combinaciones no mostraron amplificación alguna o no amplificaron el tamaño del fragmento que se esperaba como se mostró en el cuadro 2.2 por lo que a continuación solo les presento la amplificación de los fragmentos que si amplificaron y que tuvieron el tamaño esperado utilizando sus respectivos cebadores.

Para el caso de *CCS*, se obtuvo el tamaño del fragmento esperado de 50 pb con la combinación 3 de cebadores (figura 2.8).

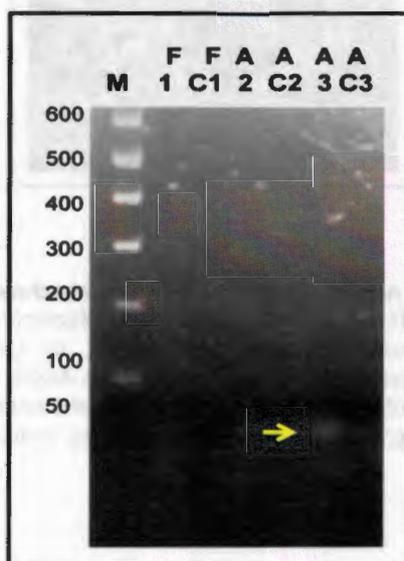


Figura 2.8 Productos obtenidos con las diferentes combinaciones de cebadores para *CCS*. Ocho microlitros de los productos de PCR fueron fraccionados por electroforesis en un gel de agarosa al 3% teñido con $1\mu\text{g. mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Gradiente de temperatura de $57^{\circ}\text{C} - 70^{\circ}\text{C}$. A= 70°C , F= 59.5°C . 1: Combinación *CCS*-F1 y *CCS*-R1 con ADNc de chile habanero rojo en el estado 5 de desarrollo. 2: Combinación *CCS*-F1 y *CCS*-R2. 3: Combinación *CCS*-F2 y *CCS*-R2 con ADNc de chile habanero rojo en el estado 5 de desarrollo. C1, C2 y C3: Controles negativos. M: Marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen).

Para corroborar la amplificación del fragmento esperado de 50 pb, se repitió la reacción de PCR con tres diferentes muestras de Chile y con la misma combinación de cebadores y se obtuvo el tamaño del fragmento esperado de 50 pb como se muestra en la figura 2.9.

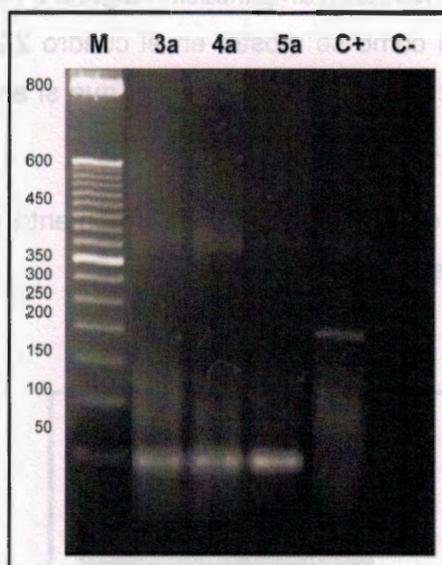


Figura 2.9 Productos obtenidos con la combinación de cebadores F2 y R2 para CCS. Ocho microlitros de los productos de PCR fueron fraccionados por electroforesis en un gel de agarosa al 3% teñido con $1\mu\text{g. mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. TEF: 50 pb. 3a: Cebadores con ADNc de Chile habanero rojo en el estado 6 de desarrollo. 4a: Cebadores con ADNc de Chile habanero naranja en el estado 6 de desarrollo. 5a: Cebadores con ADNc con Chile pimiento rojo *C. annuum*. C+: Control positivo ARNr 18S. C-: Control negativo. M: Marcador de peso molecular (50 bp DNA Ladder de Invitrogen).

Para *ZDS*, se obtuvo el tamaño del fragmento esperado de 460 pb con la combinación 3 de cebadores (figura 2.10).

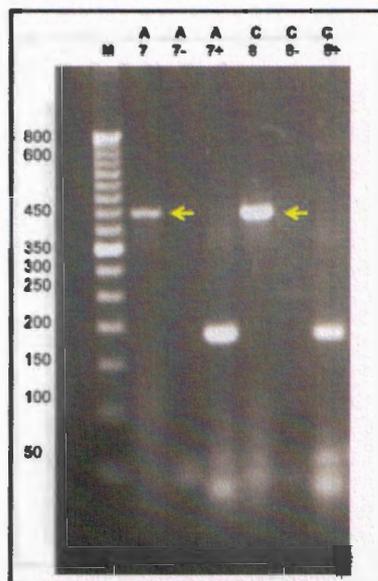


Figura 2.10 Productos obtenidos con las diferentes combinaciones de cebadores para *ZDS*. Los productos de PCR fueron fraccionados por electroforesis en un gel de agarosa al 3% teñido con $1\mu\text{g. mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. 7 y 8: Combinación 3: *ZDS*-F2 Y *ZDS*-R2 con ADNc de chile habanero rojo en el estado 5 de desarrollo. Gradiente de temperatura (49°C - 70°C) A= 70°C , C= 65.8°C , G= 50.5°C Tamaño esperado del fragmento: 460 pb. T óptima: 65.8°C . 7- y 8-: Controles negativos. 7+ y 8+: Controles positivos de ARNr 18S. M: Marcador de peso molecular (50 bp DNA Ladder de Invitrogen).

Con la combinación 6 de cebadores para β -LCY, se observó el tamaño esperado del fragmento de 210 pb junto con otros productos de diferente tamaño (figura 2.11).

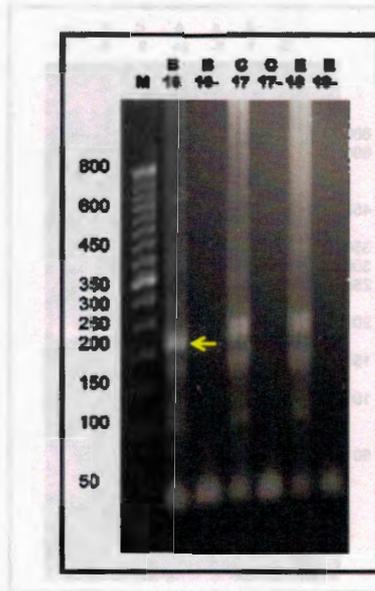


Figura 2.11 Productos obtenidos con las diferentes combinaciones de cebadores para β -LCY. Los productos de PCR fueron fraccionados por electroforesis en un gel de agarosa al 3% teñido con $1\mu\text{g. mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. 16, 17 y 18: Combinación 6: B-LCY-F2 y B-LCY-R2 con ADNc de chile habanero rojo en el estado 4 de desarrollo. Gradiente de temperatura (30°C - 54°C) B= 52.1°C , C= 49.1°C , E= 38.9°C . Tamaño esperado del fragmento: 210 pb. 16-, 17- y 18: Controles negativos). M: Marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen).

Con la combinación 5 de cebadores para ϵ -LCY, se observó el tamaño esperado del fragmento de 210 pb junto con otros productos de diferente tamaño (figura 2.12).

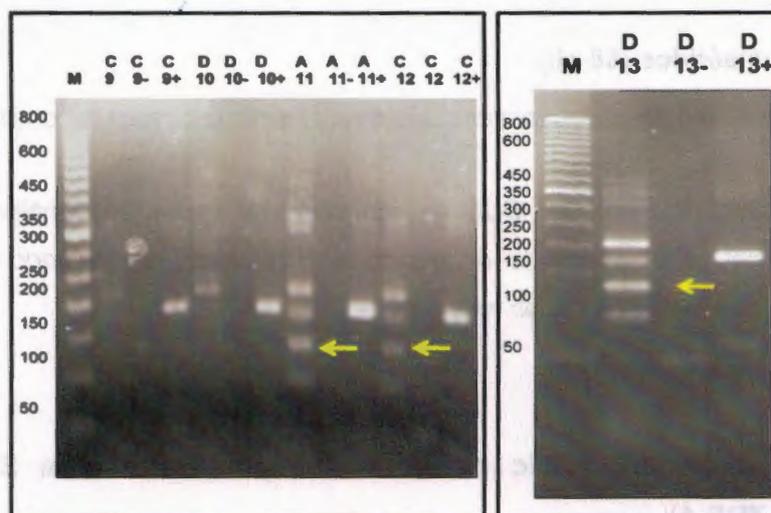


Figura 2.12 Productos obtenidos con las diferentes combinaciones de cebadores para ϵ -LCY. Ocho microlitros de los productos de PCR fueron fraccionados por electroforesis en un gel de agarosa al 3% teñido con $1\mu\text{g. mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. 9 y 10: Combinación 4: E-LCY-F2 y E-LCY-R2 con ADNc de chile habanero rojo en el estado 5 de desarrollo. Gradiente de temperatura (57.5°C - 64.5°C) C= 63.1°C , D= 61.7°C .Tamaño esperado del fragmento: 633 pb. 11 y 12: Combinación 5: E-LCY-F3 y E-LCY-R2 con ADNc de chile habanero rojo en el estado 4 de desarrollo. Gradiente de temperatura (57.5°C - 64.5°C) A= 64.5°C , C= 63.1°C . Tamaño esperado del fragmento: 135 pb. 13: Combinación 5: E-LCY-F3 y E-LCY-R2 con ADNc de chile habanero rojo en el estado 4 de desarrollo. Gradiente de temperatura (57.5°C - 64.5°C) D= 61.7°C . Tamaño esperado del fragmento: 135 pb. 9-, 10-, 11-, 12- y 13-: Controles negativos. 9+, 10+, 11+, 12+ y 13+: Controles positivos de ARNr 18S.M: Marcador de peso molecular (50 bp DNA Ladder de Invitrogen).

Como únicamente se obtuvieron los fragmentos esperados, sin productos inespecíficos para los genes *CCS* y *ZDS* con un tamaño aproximado de 50 pb y 460 pb (a partir de chile habanero del morfotipo rojo) respectivamente, se prosiguió con la secuenciación de éstos.

2.3.6 Secuenciación del ADNc parcial correspondiente a la CCS de *C. chinense* (CchCCS-1)

El resultado de la secuenciación del ADNc parcial de CchCCS-1 fue el siguiente:

Secuencia de nucleótidos (88 pb)

CCTGCTACGAATGTATCATGCGTTTCGCGAGCTCTCCAGCTTAGCCTCGGACCTTGCTCACCGGTATCTCGCCT
AAGTCTCCGTATCCT

La secuencia nucleotídica del gen CCS se comparó con varias secuencias dentro del banco de datos del NCBI utilizando el programa Blast pero no se encontró ninguna similitud debido a que la secuencia es muy corta.

2.3.7 Secuenciación del ADNc parcial correspondiente a la ZDS de *C. chinense* (Cch ZDS-1)

El resultado de la secuenciación del ADNc parcial de 411 pb de CchZDS-1 fue el siguiente:

Secuencia del gen ZDS

5'GATGAGTCATGTGATCTCGGTGATATGCTCACTATATTTGCATTATTTGCCACTAAAACG
D E S C D L G D M L T I F A L F A T K T
GAGGCTTCCCTACTGCGCATGCTTAAAGGTTCTCCTGACGTTTATTTGAGTGGTCCAATT
E A S L L R M L K G S P D V Y L S G P I
AAGAAGTACATCATAGACAAGGGGGGAAGGTTCCATCTGAGGTGGGGATGCAGAGAGGTA
K K Y I I D K G G R F H L R W G C R E V
CTCTACGAGACATCCTCTGATGGAAGCATGTATGTTAGCGGGCTTGCCATATCAAAGGCC
L Y E T S S D G S M Y V S G L A I S K A
ACTCAGAAGAAAATTGTAAAAGCTGATGCCTATGTTGCCGCATGTGATGTACCTGGAATT
T Q K K I V K A D A Y V A A C D V P G I
AAAAGATTGGTACCTCAGAAGTGGAGGGAATTGGAATTCCTTGGCAACATTTACAAACTG
K R L V P Q K W R E L E F F G N I Y K L
ATTGGAGTGCCTGTTGTTACTGTGCAACTACGTATAACAATGGCTGGGCC3'
I G V P V V T V Q L R I Q W L G

Con base en la secuencia nucleotídica de CchZDS-1, se realizó su comparación con varias secuencias con las que tuvo mayor similitud. Como puede observarse en el cuadro 2.3, la secuencia tiene un 98% de identidad con *Capsicum annuum* y *Solanum lycopersicum* encontrando similitud del 94% con secuencias de *N. tabacum*, *L. esculentum* y *S. lycopersicum*.

Cuadro 2.3 Comparación de la secuencia del gen ZDS con secuencias similares

Accesión	Descripción	Longitud similar	Valor E	Similitud
X89897.1	ARNm de zeta-caroteno / neurosporeno deshidrogenasa de <i>C.annuum</i> .	689	0.0	98%
JF975566.1	ARNm de zeta-caroteno desaturasa de <i>Nicotiana tabacum</i> cultivar Jiucaiping-2, cds completo.	590	$3e^{-165}$	94%
DQ412572.1	ARNm zeta-caroteno desaturasa (ZDS) de <i>Lycopersicon esculentum</i> , cds completo.	584	$2e^{-163}$	94%
NM_001247454.1	ARNm de zeta-caroteno desaturasa (ZDS) de <i>Solanum lycopersicum</i> .	584	$2e^{-163}$	94%
EF650012.1	ARNm de zeta-caroteno desaturase (ZDS) de <i>Solanum lycopersicum</i> , cds completo.	579	$7e^{-162}$	93%
XM_002277312.2	ARNm de zeta-caroteno desaturasa cloroplástica/cromoplástica de <i>Vitis vinifera</i> .	285	$2e^{-73}$	80%
FQ381859.1	Clona SS0ABG81YF01 de <i>Vitis vinifera</i> .	285	$2e^{-73}$	80%
AC238913.15	Cepa Heinz 1706 cromosoma 1 clona hba-169h23 mapa 1 de <i>Solanum lycopersicum</i> , secuencia completa.	612	$1e^{-49}$	98%
AM463557.2	Contig VV78X042504.8 de <i>Vitis vinifera</i> , secuencia de todo el genoma	128	$3e^{-26}$	84%

De igual manera se realizó el árbol filogenético del gen ZDS mediante el programa MEGA, en el cual, se puede observar que la secuencia nucleotídica de CchZDS-1 (ZDS *Capsicum chinense* Jacq.) es muy cercana evolutivamente a la zeta caroteno/ neusporeno deshidrogenasa de *C. annum* (X89897.1) y que también posee cercanía evolutiva con secuencias de ZDS de *S. lycopersicum* o *L. esculentum* y con secuencias de ZDS de *V. vinifera* (figura 2.13).

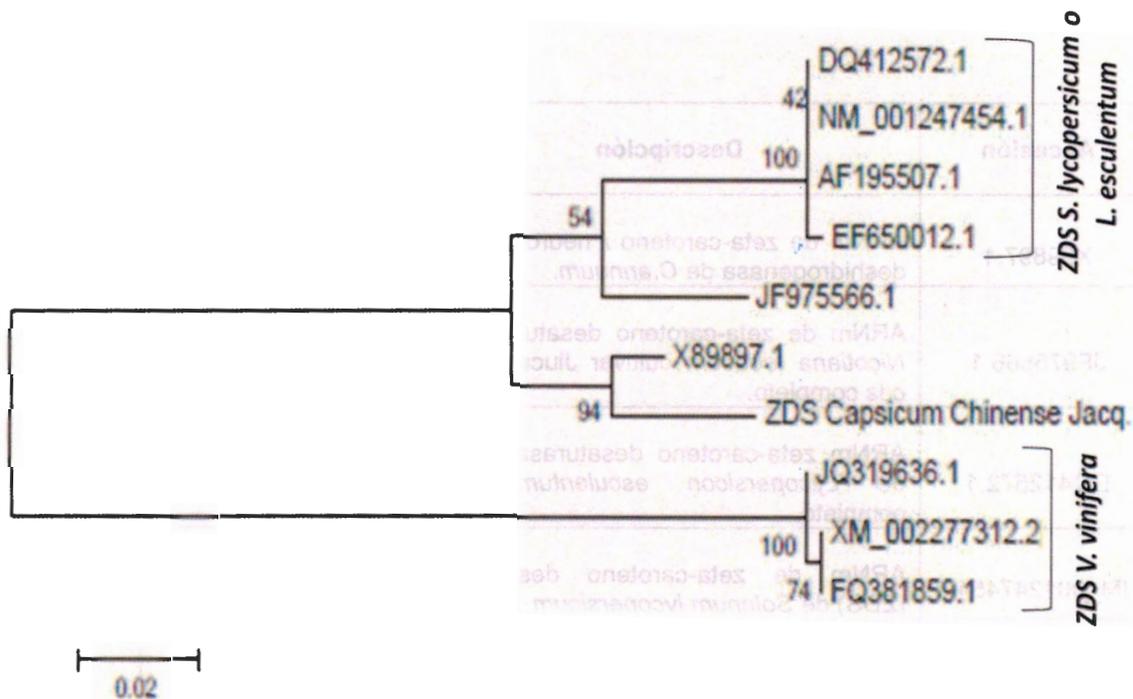


Figura 2.13 Árbol filogenético del gen ZDS. DQ412572.1: Zeta caroteno desaturasa de *Lycopersicon esculentum*, NM_001247454.1: Zeta caroteno desaturasa de *Solanum lycopersicum*, AF195507.1: Zeta caroteno desaturasa de *Lycopersicon esculentum*, EF650012.1: Zeta caroteno desaturasa de *Solanum lycopersicum*, JF975566.1: Zeta caroteno desaturasa de *Nicotiana tabacum* cultivar Jiucaiping, X89897.1: Zeta caroteno/ neusporeno deshidrogenasa de *Capsicum annum*, JQ319636.1: Zeta caroteno desaturasa de *Vitis vinifera*, XM_002277312.2: Zeta caroteno desaturasa cloroplástica/ cromoplástica de *Vitis vinifera*, FQ381859.1: Clona SS0ABG81YF01 de *Vitis vinifera*.

2.3.8 Análisis bioinformático del gen ZDS

Para poder realizar un análisis bioinformático de la secuencia parcial de ADNc de CchZDS-1 se utilizaron diferentes secuencias de aminoácidos de ZDS, PDS y CRTISO que son cercanos evolutivamente (Matthews *et al.*, 2003) en varias especies entre las cuales se encuentran *Anabaena*, *E. herbicola*, *C. unshiu*, *N. pseudonarcissus*, *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays* y *L. esculentum* y posteriormente se realizó el alineamiento de éstas en el programa Clustal W2. Todas las secuencias se obtuvieron del banco de datos dentro del NCBI.

En la figura 2.14, se puede observar que tanto PDS como ZDS tienen una homología de amino oxidasas (línea roja) y comparten un dominio de unión a dinucleótido o FAD (resaltado en color turquesa) que pertenece a la superfamilia nucleótido disulfuro piridina oxido reductasa que está implicado en el metabolismo oxidativo de una variedad de hidrocarburos (Cunningham *et al.*, 1994). De igual manera se observa un probable sitio de corte de la secuencia del péptido de tránsito cloroplástico (resaltado en color amarillo).

Anabaena_ZDS	-----	
E.herbicola_PDS	-----	
C.unshiu_ZDS	-----MGSSVLEPPATSITGVSW	17
N.pseudonarcissus_ZDS	-----MASSTCLIHSSSFVGG	17
A.thaliana_ZDS	-----MASSVVFATGSLVPP	17
O.sativa_ZIS	-----P	1
Z.mays_ZDS	-----MASVAANTTLAPALAPR	17
C.chinense_ZDS	-----	
L.esculentum_CRTISO	MCTLSFMYPNLLDGTCKTVALGDSKPRYNKQRSSCFDPLIIGNCTDQQQ	50
O.sativa_PDS	-----	
Z.mays_PDS	-----	
Anabaena_ZDS	-----MSKKV	5
E.herbicola_PDS	-----MKKT	4
C.unshiu_ZDS	SRVQE----KPRFCVRASLDANVSDMSVNAPKGLFPPEPEHYRGPGLKV	63
N.pseudonarcissus_ZDS	KKVKMNTMIRSKLFSIRSALDTKVSMDMSVNAPKGLFPPEPEHYRGPGLKV	67
A.thaliana_ZDS	-----LKSRRFYVNSSLSDSDVSDMSVNAPKGLFPPEPVYPYKGPGLKV	59
O.sativa_ZIS	RVRP-----RVR	8
Z.mays_ZDS	RARPGTGLVPPRRASAVAARSTVTSPTWRQRSQRLFPEPEHYRGPGLKV	67
C.chinense_ZDS	-----	
L.esculentum_CRTISO	LCGLSWGVDKAKGRRGGTVSNLKAVVDVDKRVESYGSSDVEGNESGSYDA	100
O.sativa_PDS	-----	
Z.mays_PDS	-----	

CAPÍTULO II

Anabaena_ZDS	AIV	RMRGFEVDSYAFDTGP	55
E.herbicola_PDS	VVI	RAYVWHDAQGFTFDAGP	54
C.unshiu_ZDS	AI	KVGSFVDKRGNHIEMG	113
N.pseudonarcissus_ZDS	AI	KVGSFVDKRGNHIEMG	117
A.thaliana_ZDS	AI	KVGSFVDRRGNHIEMG	109
O.sativa_ZDS	-----	-----	-----
Z.mays_ZDS	AI	KVGSFVDRQGNHIEMG	117
C.chinense_ZDS	-----	-----	-----
L.esculentum_CRTISO	IVI	SSGFYERDGYKFDVGS	150
O.sativa_PDS	-----	-----	-----
Z.mays_PDS	-----	-----	-----
<hr/>			
Anabaena_ZDS	TILQ--	LPHLYKELFEEAGLNFDYVQLKRLEPYTRLKFWDTQLDITSD	103
E.herbicola_PDS	TVIT--	DPTALEALFTLAGRMEDYVRLLPVKPFYRLCWESGKTLDYAND	102
C.unshiu_ZDS	LHVF--	FGCYNNLFRMLMKVGDKNLLVKDHTHTFVNQGGEIGELDFRFP	161
N.pseudonarcissus_ZDS	LHVF--	FGCYNNLFRMLMKVGDENLLVKDHTHTFVNNGGEIGELDFRFP	165
A.thaliana_ZDS	LHVF--	FGCYNNLFRMLMKVGAENLLVKDHTHTFINKDGTIGELDFRFP	157
O.sativa_ZDS	-----	-----IGELDFRFP	17
Z.mays_ZDS	LHVF--	FGCYSNLFRMLMKVGDNNLLVKEHTHTFVNKGGTIGELDFRFP	165
C.chinense_ZDS	-----	-----	-----
L.esculentum_CRTISO	SVMFGFSDKGNLNLITQALAAVGRKLEVIPDP	TTVHFHLPNDLSVRIHRE	200
O.sativa_PDS	-----	-----	-----
Z.mays_PDS	-----	-----MTKRILVL	8
<hr/>			
Anabaena_ZDS	LQSFKTQLATLRSDLPLAFDRWYSEHIRKYELG---	YKPYLAGPARSIFG	150
E.herbicola_PDS	SAELEAQITQFNPRDVEGYRRFLAYSQAVFQEG---	YLRGVSVPFLSFRD	149
C.unshiu_ZDS	IGAPLHGIRAFSTNQLKTYDKARNALALALSP---	VVKALVDPDGALKD	208
N.pseudonarcissus_ZDS	MGAPLHGIRAFLLTNQLKPYDKARNAVALALSP---	VVRALIDPNGAMQD	212
A.thaliana_ZDS	VGAPIHGIRAFVLTNQLKPYDKLRNSLALALSP---	VVKALVDPDGAMRD	204
O.sativa_ZDS	VGAPLHGIQAFVRTNQLKVYDKARNAVALALSP---	VVRALVDPDGALQQ	64
Z.mays_ZDS	VGAPLHGIQAFVRTNQLKVYDKARNAVALALSP---	VVRALVDPDGALQQ	212
C.chinense_ZDS	-----	-----	-----
L.esculentum_CRTISO	YDDFIEELVSKFPHEKEGIKIFYSECWKIFNSLNSLELKSLEEPIYLFQ		250
O.sativa_PDS	MRIAVTGATGYLGSRLCGALADAGHAVRAFALR-----		33
Z.mays_PDS	EDGTVFEGKAFGADIDVTGEIVFNTGMTGYQES-----		41
<hr/>			
Anabaena_ZDS	YLRPDDLKMFLSFRPWENLYQHFWRFQDERLVYDLRYPKYLGMH--	PT	198
E.herbicola_PDS	MLRAG--	PQLLKLQAWQSVYQSVSRFIEDEHLRQAFSFHSLLVGGN--	PF 195
C.unshiu_ZDS	IRDLDSISFSDWFLSKGGTRTSIQRMWDPVAYALGFIDCDNISAR----		253
N.pseudonarcissus_ZDS	IRNLDNISFSDWFLSKGGTRMSIQRMWDPVAYALGFIDCDNISAR----		257
A.thaliana_ZDS	IRNLDNISFSDWFLSKGGTRASIQRMWDPVAYALGFIDCDNMSAR----		249
O.sativa_ZDS	VRDLDDVSFSDWFLSKGGTRESITRMWDPVAYALGFIDCDNISAR----		109
Z.mays_ZDS	VRDLDDISFSDWFMSKGGTRESITRMWDPVRYALGFIDCDNISAR----		257
C.chinense_ZDS	-----	-----	8
L.esculentum_CRTISO	FFKKPLECLTLAYYLPQNAGSIARKYIRDPLLSFIDAECFIVSTVNALQ		300
O.sativa_PDS	-----	SAGGGGGGDVEAGLLPASVELAYG-----	58
Z.mays_PDS	-----	ITDQSYNGQILTFTYPLVGNYGINRDDYESIIP----	74

Anabaena_ZDS VASSVFSLIPFLEFSQGVWHPVGGFRALAQG-LANAAQDLGVKIHLSHPV 247
 E.herbicola_PDS TTSSIYTLIHALEREWGVWFPEGGTGALVNG-MVKLFTDLGGEIELNARV 244
 C.unshiu_ZDS CMLTIFALFATKTEASLLRMLKGS PDVYLSGPIRKYITDKGGRFHLRWGC 303
 N.pseudonarcissus_ZDS CMLTIFSLFATKTEASLLRMLKGS PDVYLSGPIRKYITDKGGRFHLRWGC 307
 A.thaliana_ZDS CMLTIFSLFATKTEASLLRMLKGS PDVYLSGPIKQYITDRGGRIHLRWGC 299
 O.sativa_ZDS CMLTIFTLFATKTEASLLRMLKGS PDVYLSGPIKQYITDRGGRFHLRWGC 159
 Z.mays_ZDS CMLTIFTLFATKTEASLLRMLKGS PDVYLSGPIKQYITDRGGRFHLRWGC 307
 C.chinense_ZDS -MLTIFALFATKTEASLLRMLKGS PDVYLSGPIKQYITDKGGRFHLRWGC 57
 L.esculentum_CRTISO TPMINASMVLCDRHFGGINYPVGGVGEIAKS-LAKGLDDHGSQILYRANV 349
 O.sativa_PDS DVADVESLAAAFDRCDAVFHVAAAVEAWLPDPSIFITVNVGGLLENVLKAA 108
 Z.mays_PDS --TCKGVVVFEARRASNWRNQMTLDEFKAKKIPGISGIDTRALTKIIR 122

Anabaena_ZDS HQIWIQQQVVRGLELADASRHQFDTVVINADFAYAVRHLLPTSARGRYTD 297
 E.herbicola_PDS EELVVADNRVSVQRLADGRIFDTDAVASNADVNTYKLLGHHVPVQKRA 294
 C.unshiu_ZDS REILYDKAANGETYVKG--LAMSKATDKKVVQADAYVAACDVPGIKRLLP 351
 N.pseudonarcissus_ZDS REILYDELSNGDTYITG--IAMSKATNKKLVKADVYAACDVPGIKRLIP 355
 A.thaliana_ZDS REILYDKSADGETYVTG--LAISKATNKKIVKADVYAACDVPGIKRLLP 347
 O.sativa_ZDS REVLYDKSPDGETYVKG--LLSKATSREIKADAYVAACDVPGIKRLLP 207
 Z.mays_ZDS REVLYEKSPDGETYVKG--LLLTKATSREIKADAYVAACDVPGIKRLLP 355
 C.chinense_ZDS REVLYETSSDGS MYVSG--LAISKATQKKIVKADAYVAACDVPGIKRLV 105
 L.esculentum_CRTISO TSIILLDNGKAVGVKLS DGRKFYAKTIVSNATRWDTFGKLLKAENLPKEEE 399
 O.sativa_PDS RRTPTVKKIVYTS SFFA--IGPTDGYVADETMHQGKTFCTEYEEKSKVLA 156
 Z.mays_PDS KHGTMRALTHVGD SMDHVTDLQATVLPDNIKQVSTKTSYPAPGVGLS 172

Anabaena_ZDS NKLGMQMFSCSTFMYLYG--INRRYEDLPHHQIYLSDNIRRLERPWVDDS 345
 E.herbicola_PDS AALERKSMNSLFLVLYFG--LNQPHSQLAHTICFGRYRELIDEIFTGS 342
 C.unshiu_ZDS SSWREMKFNNIYALVG---VPVVTVQLRYNGWVTELDLERSQLRRAL 398
 N.pseudonarcissus_ZDS SEWREWDLFDNIYKLVG---VPVVTVQLRYNGWVTEMDLEKSRQLRAAV 402
 A.thaliana_ZDS KEWRESRFFNDIYELEG---VPVVTVQLRYNGWVTELDIELARQLKRAV 394
 O.sativa_ZDS SEWRQWDTFDNIYKLDG---VPVVTVQLRYNGWVTELDLEKSRQLKRAV 254
 Z.mays_ZDS SEWREWEMFDNIYKLDG---VPVVTVQLRYNGWVTELDLEKSRQLGRAV 402
 C.chinense_ZDS QKWRELEFFGN IYKLI G---VPVVTVQLRIQ-WLG----- 136
 L.esculentum_CRTISO NEQKAYVKAPSFLS IHMGVKADVLPPD TDCHHFVLEDDWTNLEKPYG--- 446
 O.sativa_PDS DQIALQAAAEGMPITIVYPGFMYPGPKLTAGNLVSRILIERFNGRLPGYV 206
 Z.mays_PDS VVLVDFGLKHSILRELSK--RNCNVTVPYSTTAEILHLNPDGVMLNSG 220

Anabaena_ZDS ALDETDPPFYVCNPTIIDPSNAPAGHSTLFVLVPI---PNTS-YAVDWDI 391
 E.herbicola_PDS ALAD-DFS LYLHSPCVTDPSLAPPGCASFYVLAPV---PHLGNAPLDWAQ 388
 C.unshiu_ZDS GLDNLLYTPDADFSCFADLALTS P--EDYYREGQG---SLLQCVLTPGDP 443
 N.pseudonarcissus_ZDS GLDNLLYTPDADFSCFSDALSSP--EDYYIEGQG---SLIQAVLTPGDP 447
 A.thaliana_ZDS GLDNLLYTPDADFSCFADLALASP--ADYYIEGQG---TLLQCVLTPGDP 439
 O.sativa_ZDS GLDNLLYTPDADFSCFSDALSSP--ADYYIEGQG---SLIQAVLTPGDP 299
 Z.mays_ZDS GLDNLLYTADADFSCFSDALSSP--ADYYIEGQG---SLIQAVLTPGDP 447
 C.chinense_ZDS -----SIFLSIPTVLDS SLAPEGHILHI FTSSIEDWEGLSPKDYEA 489
 L.esculentum_CRTISO GHGHDRESFCHVDDV VAGHVAAME-----KGRE-----GERYLLTGEN 244
 O.sativa_PDS PGNPEDVPQALDMIRGVQ GKPIPIFG-----ICMGHQLF 253
 Z.mays_PDS

CAPÍTULO II

Anabaena_ZDS	KQKSYTDFILKRLHLLGYHNIEQHIVTQSCYTAQSWLDD--YRVHLGAVF	439
E.herbicola_PDS	EGPKLRDRIFDYLEERYMPGLRSQLVTRIFTPADFDHT--LDAHLGSAF	436
C.unshiu_ZDS	YMPLPNDEIIRRVAKQVLALFPSSQGLEVIWSSVVKIGQSLYREGPGKDP	493
N.pseudonarcissus_ZDS	YMPLPNDAIIERVRKQVLDLFPSSQGLEVLWSSVVKIGQSLYREGPGKDP	497
A.thaliana_ZDS	YMRMPNDKIIIEKVAMQVTELFPPSSRGLEVTWSSVVKIAQSLYREAPGKDP	489
O.sativa_ZDS	YMPLPNEEIIISKVQKQVLELFPSSQGLELTWSSVVKIGQSLYRESPGNDP	349
Z.mays_ZDS	YMPLPNEEIIISKVQKQVLELFPSSRGLEVTWSSVVKIGQSLYREAPGNDP	497
C.chinense_ZDS	-----	-----
L.esculentum_CRTISO	KKEVVAERIIISRLEKTLFPGLKSSILFKEVGTPKTHRRY---LARDSGTY	536
O.sativa_PDS	TSLVQIFDMASRITNTKAPRFHVPLWLEIYGWISVLVS----RITGKLP	290
Z.mays_PDS	AMANGAKTYKMKFGRGFNHAVREIATGRVDFTSQNHGYAVSREDLPEHL	303

Anabaena_ZDS	NLSHNLTLQGLPFRPPIRSENIAGLYWIGGAVHPGSGLLTILEASRSAAGF	489
E.herbicola_PDS	SIEPLLTQSAWFRPHNRSDIANLYLVGAGTHPGAGIPGVVASAKATASL	486
C.unshiu_ZDS	FRPDQKTPVKNFFLAGSYTKQDYIDSMEGATLSGRQASAYICNAGEELVA	543
N.pseudonarcissus_ZDS	FRPDQKTPVKNFFLAGSYTKQDYIDSMEGATLSGRQAAAYICSAGEDLAA	547
A.thaliana_ZDS	FRPDQKTPVKNFFLAGSYTKQDYIDSMEGATLSGRQASSYICDAGEELAE	539
O.sativa_ZDS	FRPDQKTPVKNFFLAGSYTKQDYIDSMEGATLSGRRTAAYICGAGEELLR	399
Z.mays_ZDS	FRPDQKTPVKNFFLAGSYTKQDYIDSMEGATLSGRRTSAYICGAGEELLA	547
C.chinense_ZDS	-----	-----
L.esculentum_CRTISO	GPMPRGTPKGLLGMFNTTAIDGLYCVGSDCFPGQGVIAVAFSGVMCAHR	586
O.sativa_PDS	FISYPAVRVLRHQWAYSCEKAKKELGYSRSLTEGLSETLLWLKDSEMIR	340
Z.mays_PDS	IITHEEINDKSVGEVVRHRYQPAFSVQYHPDAAPGPHDASYLDEFIEMME	353

Anabaena_ZDS	IHQDFASTGS-----	499
E.herbicola_PDS	MIEDLQ-----	492
C.unshiu_ZDS	LRKQLAAFESQEQMEAPTTTNDLSLV--	570
N.pseudonarcissus_ZDS	LRKKIAADHPEQLINKDSNVSDLSLV--	574
A.thaliana_ZDS	LNKKLSSS-----ATAVPDELSLV--	558
O.sativa_ZDS	PPKEAHCRQR---RPGVRSTALQTS--	423
Z.mays_ZDS	LRKKLLIDDGEK---ALGN-VQVLQAS--	570
C.chinense_ZDS	-----	-----
L.esculentum_CRTISO	VAADLGFEEKSDVLDLALLRLLGWLRTLA	615
O.sativa_PDS	F-----	341
Z.mays_PDS	IFKQSN-----	359

Figura 2.14 Alineamiento de secuencias de a.a. de ZDS, PDS y CRTISO en diferentes especies. La secuencia de ZDS de *Capsicum chinense* Jacq. se encuentra resaltada en color verde. En color amarillo se muestra el sitio de corte de la secuencia del péptido de tránsito cloroplástico. En color azul turquesa se muestra el sitio de unión a FAD y la línea roja representa la homología de amino oxidasas. ZDS de *Anabaena* (BAA05091), PDS de *E. herbicola* (P22871.1), ZDS de *C. unshiu* (BAB68552.1), ZDS de *N. pseudonarcissus* (CAA12062.1), ZDS de *A. thaliana* (AAG51402.1), ZDS de *O. sativa* (AAG14399.1), PDS de *O. sativa* (AC079633), ZDS de *Z. mays* (AAD02462.1), PDS de *Z. mays* (ACC12846.1) y CRTISO de *L. esculentum* (AF416727).

2.3.9 Diseño de cebadores para el análisis de expresión del gen ZDS por RT-PCR en tiempo real

Se diseñaron los cebadores para el análisis de expresión por RT-PCR en tiempo real de CchZDS-1 con ayuda del programa Custom primers- Oligo Perfect™ Designer (Invitrogen), en donde, al ingresar la secuencia de 411 pb de CchZDS-1 y con los parámetros requeridos (tamaño del fragmento de amplificación con los oligonucleótidos, posición de los oligonucleótidos dentro de la secuencia, entre otros parámetros), el programa te proporciona los oligonucleótidos o cebadores convenientes con base a los parámetros establecidos. Algunos de los criterios que se utilizaron para el diseño de los cebadores fue que amplificaran un fragmento entre 100 y 300 pb. Los cebadores en sentido son ZDS F3, ZDS F7, ZDS F5 y ZDS F8; los cebadores en antisentido son ZDS R3 y ZDS R8 (cuadro 2.4).

Cuadro 2.4 Cebadores para RT-PCR en tiempo real para el gen ZDS

Cebador	Secuencia (5' - 3')
ZDS F3	ACTGCGCATGCTTAAAGGTT
ZDS R3	TCCAATTCCCTCCACTTCTG
ZDS F7	ATGTATGTTAGCGGGCTTGC
ZDS F8	GGGAAGGTTCCATCTGAGGT
ZDS F5	TGGGGATGCAGAGAGGTA CT
ZDS R8	GGCAACATAGGCATCAGCTT

En el cuadro 2.5 se muestran las combinaciones empleadas para el análisis del gen ZDS y los tamaños esperados de los fragmentos de amplificación. Se decidió usar esas combinaciones ya que el programa Custom primers- Oligo Perfect™ Designer (Invitrogen) nos mostró todos los posibles productos de amplificación que se podían obtener con esas combinaciones que conservaran el tamaño del producto de amplificación deseado.

Cuadro 2.5 Combinación de cebadores para el análisis de ZDS por RT-PCR en tiempo real

Combinación	Forward	Reverse	Tamaño esperado
1	ZDS-F3	ZDS-R3	264 pb
2	ZDS-F5	ZDS-R8	117 pb
3	ZDS-F7	ZDS-R3	128 pb
4	ZDS-F8	ZDS-R8	192 pb

Seguidamente, se probaron por PCR punto final las diferentes combinaciones de los cebadores de ZDS para encontrar las condiciones óptimas de amplificación para ZDS (Anexo).

2.3.10 Aislamiento, purificación y clonación del fragmento de ADNc parcial de CCS

Como otra estrategia para amplificar a CCS, se emplearon los cebadores reportados por Huh *et al.*, 2001 para *C. annuum* ya que *C. chinense* pertenece al mismo género. El cebador CCS-u se encuentra en sentido y CCS-d en antisentido.

Cuadro 2.6 Cebadores utilizados para la amplificación de CCS

Cebador	Secuencia (5' - 3')
CCS-u	5' CCTTTTCCATCTCCTTTACTTTCCATT 3'
CCS-d	5' AAGGCTCTCTATTGCTAGATTGCCAG 3'

Se realizó la PCR punto final utilizando los cebadores anteriores con un gradiente de temperatura de 55°C a 65°C y se obtuvo el tamaño esperado del fragmento de 1494 pb en todas las temperaturas evaluadas (figura 2.15).

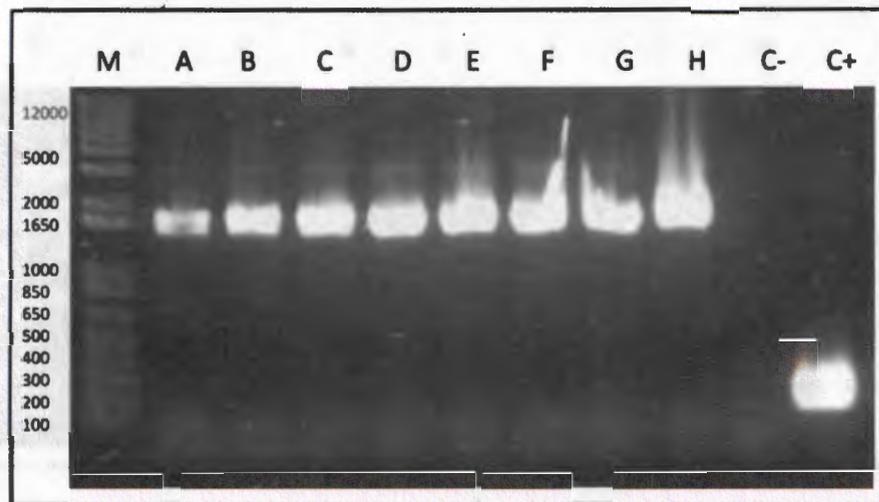


Figura 2.15 Amplificación de CCS. Los productos de PCR fueron fraccionados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% teñido con $1\mu\text{g. mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA Ladder de Invitrogen). Combinación de cebadores CCS-u y CCS- d con ADNg de hojas de chile habanero, gradiente de temperatura (55°C - 65°C) A= 65°C , B= 64.2°C , C= 63°C , D= 61.1°C , E= 58.7°C , F= 56.9°C , G= 55.7°C y H= 55°C . Tamaño esperado del fragmento: 1494pb. C-: Control negativo. C+: Control positivo de ARNr 18S.

Después de obtener estos resultados, se realizó una PCR del ADNc parcial CchCCS-2 con una adecuada temperatura de alineamiento para los cebadores de 60°C (figura 2.16), para continuar con la purificación del fragmento y de esta manera llevar a cabo la clonación y secuenciación del fragmento.

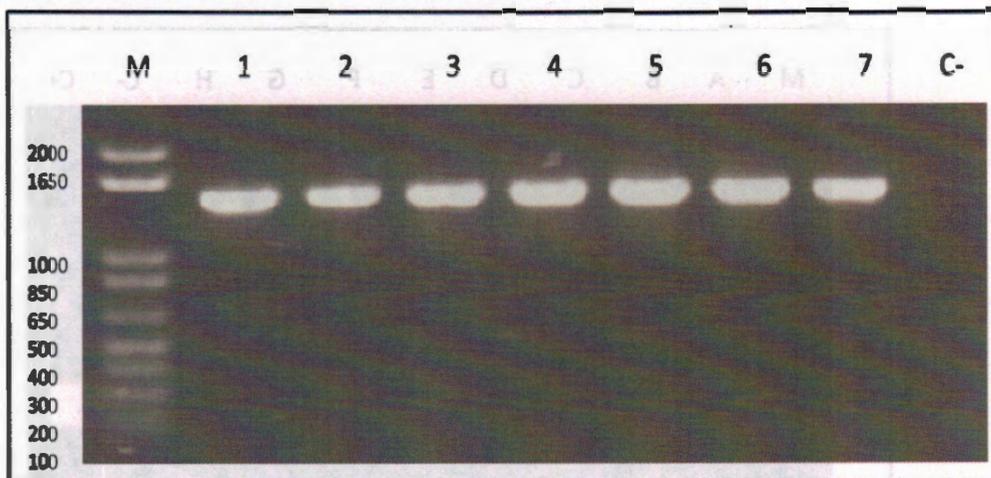


Figura 2.16 Amplificación de CCS. Los productos de PCR fueron fraccionados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% teñido con $1\mu\text{g. mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA Ladder de Invitrogen). 1-7: Combinación de cebadores CCS-u y CCS- d con ADNg de hojas de chile habanero. Temperatura óptima: 60°C . Tamaño esperado del fragmento: 1494 pb. C-: Control negativo.

En la figura 2.17, se pueden observar los productos obtenidos de la purificación en gel de CchCCS-2 que tienen un tamaño aproximado de 1494 pb.

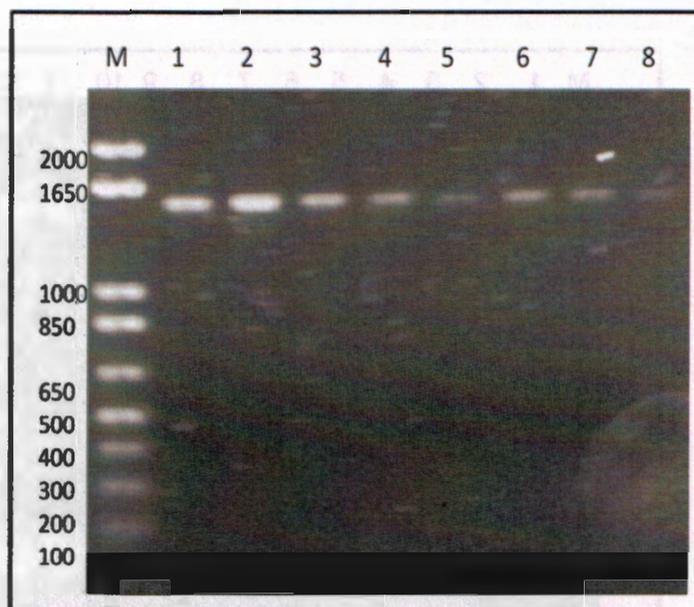


Figura 2.17 Productos obtenidos de la purificación en gel del fragmento de CCS. Tamaño esperado del fragmento: 1494 pb. 1-4: Fragmentos de CCS concentrado. 5-8: Fragmentos de CCS diluidos. M: Marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA Ladder de Invitrogen).

Posterior a la purificación en gel del cDNA parcial CchCCS-2, los productos fueron ligados en el vector pGEM-T-Easy® y los plásmidos recombinantes fueron empleados para transformar células de la cepa DH5- α de *Escherichia coli*. Posteriormente se llevó a cabo el aislamiento de los plásmidos recombinantes. La presencia de plásmidos en los extractos fue verificada fraccionando una alícuota de CchCCS-2 por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio.

En la figura 2.18, se muestra el fraccionamiento electroforético de diferentes aislados plasmídicos y se puede observar que los plásmidos recombinantes presentan diferentes tamaños entre ellos.

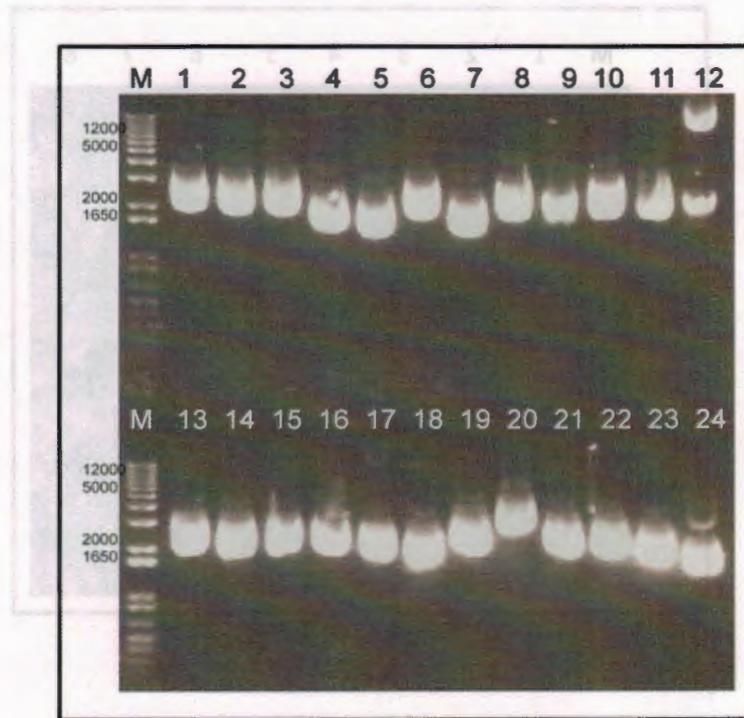


Figura 2.18 Aislamiento de plásmidos recombinantes. Una alícuota de los plásmidos aislados mediante lisis alcalina fue fraccionada por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carriles 1-24: Plásmidos correspondientes a diferentes clonas recombinantes. M: Marcador de peso molecular (1 kb plus DNA Ladder de Invitrogen).

Para demostrar que los plásmidos aislados tuvieran inserto, se realizó un corte con la enzima de restricción *Eco* RI, la cual flanquea ambos lados en el sitio múltiple de clonación del vector y que permite liberar el fragmento.

Como puede observarse en la figura 2.19, solo en un plásmido (carril 20) se logró escindir claramente el inserto, el cual correspondió al tamaño esperado. Sin embargo, en otros casos no se logró escindir el inserto o se observaron otros tamaños al esperado.

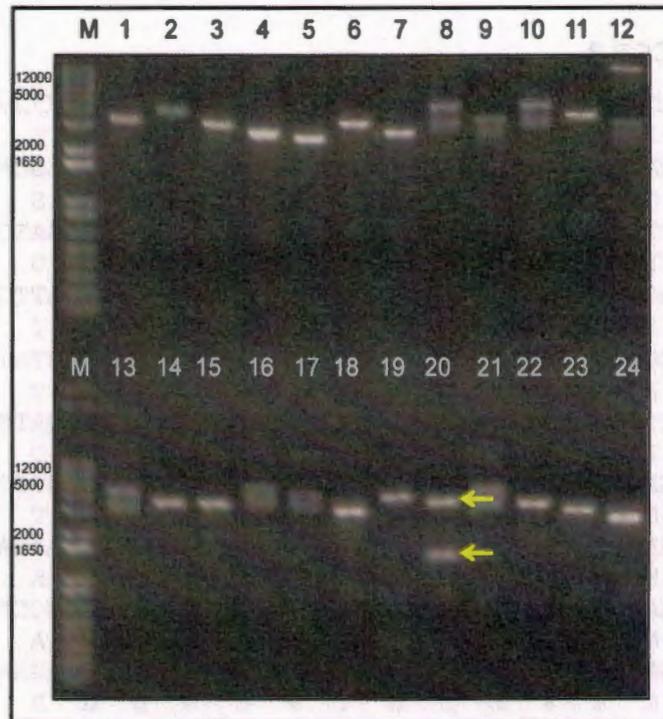


Figura 2.19 Liberación de insertos. Una alícuota de los productos de la digestión con la enzima Eco RI fue fraccionada por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carriles 1-24: productos de digestión de diferentes plásmidos aislados. Tamaño del vector: 3015 pb. Tamaño esperado del fragmento: 1494 pb. M: Marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA Ladder de Invitrogen).

El plásmido del que se liberó el inserto fue enviado para su secuenciación a la empresa "Macrogen" en Corea del sur, la secuencia recibida se comparó con bancos de datos empleando el programa Blast de la agencia "National Center of Biotechnology Information", desplegado en Internet con la siguiente dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

El resultado de la secuenciación del ADNc parcial de aproximadamente 1490 pb de CchCCS-2 fue el siguiente:

Secuencia de CchCCS-2

5'CCTTTACTTTCCATTCTACTCCTAACATGTATAGTTTCAAACACAACCTCCACTTTTCCA
P L L S I P T P N M Y S F K H N S T F P
AATCCAACCAAAACAAAAGATTCAAGAAAGTTCCATTATAGAAACAAAAGCAGTACACAT
N P T K Q K D S R K F H Y R N K S S T H
TTTTGTAGCTTCTTGATTTAGCACCCACATCAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTTAACATC
F C S F L D L A P T S K P E S L D V N I
TCATGGGTTGATACTGATCTGGACCGGGCTGAATTCGATGTGATCATCATTGGAAGTGGC
S W V D T D L D R A E F D V I I I G T G
CCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAATTAAGGTATGTTGCGTT
P A G L R L A E Q V S K Y G I K V C C V
GACCCTTCAACACTTCCATGTGGCCAAATAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGAGTTTGAA
D P S P L S M W P N N Y G V W V D E F E
AAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCATAAGTGGCCCGTGAGTTGTGTTTCATATAAGT
K L G L E D C L D H K W P V S C V H I S
GATCACAAGACTAAGTATTTGGACAGACCATATGGTAGAGTAAGTAGAAAGAAGTTGAAG
D H K T K Y L D R P Y G R V S R K K L K
TTGAAATTGTTGAATAGTTGTGTTGAAAATAGAGTGAAGTTTATAAAGCCAAGGTTTGG
L K L L N S C V E N R V K F Y K A K V L
AAAGTGAAGCATGAAGAATTTGAGTCTTCGATTGTTTGTGATGATGGTAGGAAGATAAGT
K V K H E E F E S S I V C D D G R K I S
GGTAGCTTGATTGTTGATGCAAGTGGCTATGCTAGTGATTTTATAGAGTATGACAAGCCA
G S L I V D A S G Y A S D F I E Y D K P
AGAAACCATGGTTATCAAGTTGCTCATGGGATTTTAGCAGAAGTTGATAATCATCCATT
R N H G Y Q V A H G I L A E V D N H P F
GATTTGGATAAAATGATGCTCATGGATTGGAGGGATTCTCATTAGGTAATGAGCCATAT
D L D K M M L M D W R D S H L G N E P Y
CTGAGGGTGAAGAATACTAAAGAACCAACATTCTTGTATGCAATGCCATTTGATAAGAAT
L R V K N T K E P T F L Y A M P F D K N
TTGGTATTCTTGAAGAGACTTCTTTAGTGAGTCGGCCTATGTTATCGTATATGGAAGTG
L V F L E E T S L V S R P M L S Y M E V
AAAAGAAGGATGGTAGCAAGATTAAGACATTTGGGGATCAAAGTGAGAAGTGTCCTTGAG
K R R M V A R L R H L G I K V R S V L E
GAAGAGAAGTGTGTGATCACTATGGGGAGGACCACTTCCGCGGATTCCCTCAAAATGTTAT
E E K C V I T M G R T T S A D S S K C Y
GGCTATTGGTGGGACTTCAGGGATAGTTCATCCATCGTC3'
G Y W W D F R D S S S I V

Con base en la secuencia nucleotídica de CchCCS-2, se realizó una comparación con varias secuencias con las que tuvo mayor similitud. La secuencia de CchCCS-2 mostró un 99% de identidad con otras CCS de diferentes cultivares de *C. annuum* (cuadro 2.7).

Cuadro 2.7 Comparación de la secuencia del gen CCS con secuencias similares

Accesión	Descripción	Longitud similar	Valor E	Similitud
GU122939.1	Gen capsantina/capsorrubina sintasa (Ccs) de <i>Capsicum annuum</i> cultivar Dove , cds parcial.	1910	0.0	99%
GU122938.1	Gen capsantina/capsorrubina sintasa (Ccs) de <i>Capsicum annuum</i> cultivar Oriole, cds parcial.	1910	0.0	99%
GU122937.1	Gen capsantina/capsorrubina sintasa (Ccs) de <i>Capsicum annuum</i> cultivar Canary, cds parcial.	1910	0.0	99%
GU122936.1	Gen capsantina/capsorrubina sintasa (Ccs) de <i>Capsicum annuum</i> cultivar Orange, cds parcial.	1910	0.0	99%
GU122935.1	Gen capsantina/capsorrubina sintasa (Ccs) de <i>Capsicum annuum</i> cultivar NuMex Sunset, cds parcial.	1910	0.0	99%
GU122934.1	Gen capsantina/capsorrubina sintasa (Ccs) de <i>Capsicum annuum</i> cultivar Valencia, cds parcial.	1910	0.0	99%
X76165.1	ARNm de <i>Capsicum annuum</i> de capsantina/capsorrubina sintasa.	1910	0.0	99%
X77289.1	Gen capsantina/capsorrubina sintasa (Ccs) de <i>Capsicum annuum</i>	1910	0.0	99%
X78030.1	Gen óxido reductasa cromoplástica de <i>Capsicum annuum</i> (Yolo Wonder).	1899	0.0	99%
GU122933.1	Gen capsantina/capsorrubina sintasa (Ccs) de <i>Capsicum annuum</i> cultivar Fogo, alelo ccs3, secuencia parcial.	1893	0.0	99%

CAPÍTULO II

De igual manera se realizó el árbol filogenético del gen *CCS* mediante el programa MEGA, en el cual, se puede observar que la secuencia nucleotídica de *CchCCS-2* (*CCS Capsicum chinense* Jacq.) es muy cercana evolutivamente a otras *CCS* de diferentes cultivares de *C. annuum* (figura 2.20).

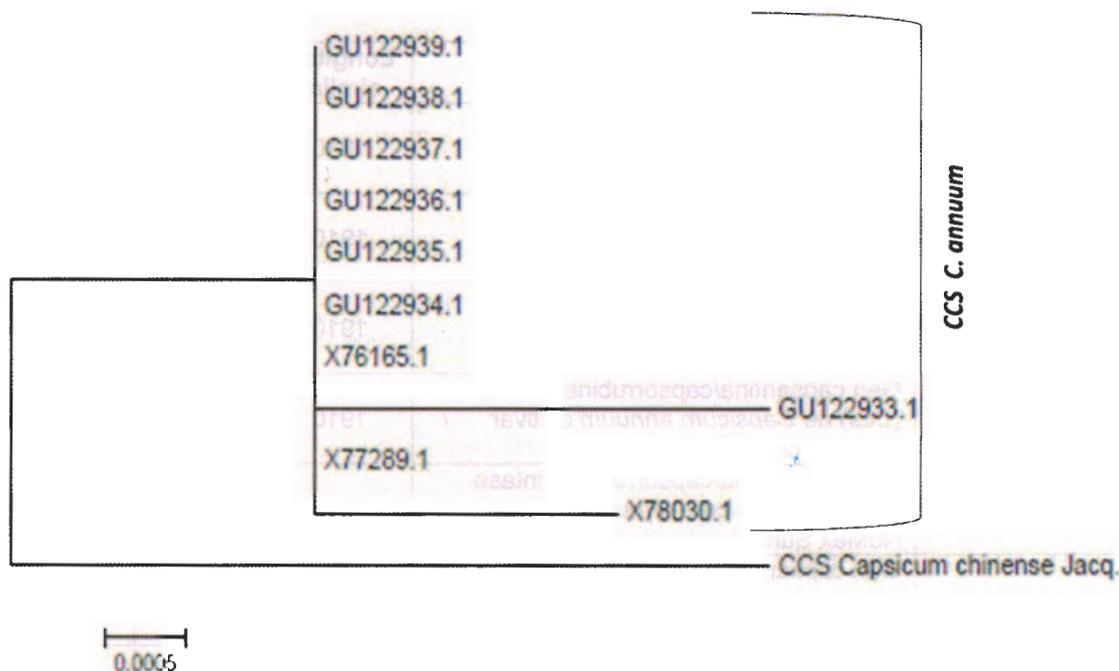


Figura 2.20 Árbol filogenético del gen *CCS*. GU122939.1: Capsantina-capsorubina sintasa de *Capsicum annuum* cultivar Dove, GU122938.1: capsantina-capsorubina sintasa de *Capsicum annuum* cultivar Oriole, GU122937.1: Capsantina-capsorubina sintasa de *Capsicum annuum* cultivar Canary, GU122936.1: Capsantina-capsorubina sintasa de *Capsicum annuum* cultivar Orange Grande, GU122935.1: Capsantina-capsorubina sintasa de *Capsicum annuum* cultivar NuMex Sunset, GU122934.1: Capsantina-capsorubina sintasa de *Capsicum annuum* cultivar Valencia, X76165.1: mRNA de capsantina-capsorubina de *C.annuum*, GU122933.1: Alelo *ccs3* de capsantina-capsorubina sintasa de *Capsicum annuum* cultivar Fogo, X77289.1: Capsantina-capsorubina sintasa de *C.annuum*, X78030.1: Óxido-reductasa cromoplástica de *C.annuum* (Yolo Wonder).

De manera general, se pudo observar que los cebadores de *CCS* reportados para *C.annuum* si amplificaron para *C. chinense* debido a que estas dos especies pertenecen al mismo género y al analizar sus secuencias se observa que poseen un alto porcentaje de similitud y una cercanía evolutiva muy cercana.

2.3.11 Análisis bioinformático de CchCCS-2

Para poder realizar un análisis bioinformático de la secuencia CchCCS-2 de *C. chinense* se utilizaron diferentes secuencias de aminoácidos de CCS, β -LCY y ϵ -LCY en varias especies entre las cuales se encuentran *C. annum*, *A. thaliana* y *L. esculentum* y posteriormente se realizó el alineamiento de éstas en el programa Clustal W2. Las secuencias fueron obtenidas del banco de datos dentro del NCBI.

En la figura 2.21, se muestra un probable sitio de unión a dinucleótido o FAD (línea morada). Una función adicional para FAD podría esperarse ya que en el caso de la cadena media de la acil-CoA deshidrogenasa, FAD es necesario para el plegamiento y ensamblaje de las subunidades. De igual manera se muestran los motivos I y II (línea azul y naranja) que son regiones altamente conservadas y probablemente son de importancia fundamental en la reacción catalítica (Saijo y Tanaka, 1995).

Como puede observarse la secuencia CchCCS-2 solo posee el motivo de unión a FAD y el motivo I.

C.annuum_CCS	-----METLLKPFPSPLLSIPTPNMYSFKHNSTFF-----NPTKQKDS	38
C.chinense_CCS	-----PLLSIPTPNMYSFKHNSTFF-----NPTKQKDS	28
L.esculentum_B-LCY	-----MDTLLK-TPNNLEFLNPHHGFAVKASTFRS-----EKHHNFGS	37
L.esculentum_E-LCY	MECVGAQNVGAMAVFTRPRLKPLVGRRVMPRKQSFWR----MSMKVKCNSSSGSDSC	55
A.thaliana_E-LCY	MECVGARNFAAMAVSTFPFSWS---CRRKFPVVKRYSYRNIRFGLCSVRASGGGSSGSESC	57
. . .		
C.annuum_CCS	RKFHYRNKSSTHF---CSFLDLAPTSPKPELDVNI SWVD---TDLDGAEFDVIIIGTG	90
C.chinense_CCS	RKFHYRNKSSTHF---CSFLDLAPTSPKPELDVNI SWVD---TDLDRAEFDVIIIGTG	80
L.esculentum_B-LCY	BKECETLGRSVCVKQSSSALLELVPTKKNLDFELEMVD---PSKG-VVVDLAVVGGG	92
L.esculentum_E-LCY	VVDKEDFADEEDIYKAGGSQLVFVQMQQKMDQSKLSDEL RQISAGQTVL DLVVGCG	115
A.thaliana_E-LCY	VAVREDFADEEDFVKAGGSEILFVQMQQKMDQSKLVDR LPPISIGD GALDLVVGCG	117
	. : : . : : * : * . . . * : : *	
C.annuum_CCS	PAGLRLAEQVSKYGIKVCQVDPSPLSMWPNNYGVWVDEFKLGLEDCLDHKWPVSCVHIS	150
C.chinense_CCS	PAGLRLAEQVSKYGIKVCQVDPSPLSMWPNNYGVWVDEFKLGLEDCLDHKWPVSCVHIS	140
L.esculentum_B-LCY	PAGLAVAQVSEAGLSVCSIDNPKLWPNYGVWVDEFEAMDLLDCLDQATWSGAAVYLD	152
L.esculentum_E-LCY	PAGLALAAESAKLGLNVGLVG--PDLPFTNNYGVWVDEFKDLGLQACIEHVWRDTIVYLD	173
A.thaliana_E-LCY	PAGLALAAESAKLGLKVLGLIG--PDLPFTNNYGVWVDEFNDLGLQKACIEHVWRDTIVYLD	175
	**** * : : : * : * . . * : : ***** * : : * * : : * : * : *	
C.annuum_CCS	DHKTKYLD RPYGRVSRKKLKLKLLNSCVENRVKFKYKAVLKV KHEEF-ESSIVCDDGRKI	209
C.chinense_CCS	DHKTKYLD RPYGRVSRKKLKLKLLNSCVENRVKFKYKAVLKV KHEEF-ESSIVCDDGRKI	199
L.esculentum_B-LCY	DN T AKDLH RPYGBVNRKQLKSKMMQKUMN GVKF HQAKV LK V LHEES-KSM L LCN DGLU	211
L.esculentum_E-LCY	DDEPILIGRAYGRVSRHFLHEELLKRCVEAGVLYLNSKVDRIVEATNGQSLVECEGDVVI	233
A.thaliana_E-LCY	DDKPITIGRAYGRVSRRLHHEELLRRCV ESGVSYLSSKVDSITEASDGLRLVACDDNNVI	235
	* . . : * , ***** : * : : : . * : * : : * : : * : : * : : *	

CAPÍTULO II

C. annum_CCS	SGSLIVDASGYAS-DFIEYDKP-RNHGYQVAHGILAEVDNHPDLDKMLMDWRDShLGN	267
C. chinense_CCS	SGSLIVDASGYAS-DFIEYDKP-RNHGYQVAHGILAEVDNHPDLDKMLMDWRDShLGN	257
L. esculentum_B-LCY	QATVVLDTAGFSR-SLVOYDKP-YNPGYQVAYGILAEVEEHPDVNKMVFMWRDShLKN	269
L. esculentum_E-LCY	PCRFTVTASGAASGKFLQYELGGPRVSVQYAYGVEVEVDNHPDPSLMVFMRYDYVR--	291
A. thaliana_E-LCY	PCRLATVASGAASGKLLQYEVGGPRVCVQYAYGVEVEVENSPYDPDQMFMDRYDYTN--	293
	: : : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
C. annum_CCS	EPYLRVKNTKEPTFLYAMPFDRNLVFLLEETSLVSRPMLSYMEVKRRMVARLRHLGIKVR	327
C. chinense_CCS	EPYLRVKNTKEPTFLYAMPFDRNLVFLLEETSLVSRPMLSYMEVKRRMVARLRHLGIKVR	317
L. esculentum_B-LCY	NTDLKERNRIPTFLYAMPFSSNRIFFLEETSLVARPGLRIDDIQERMVARLNHLGIKVR	329
L. esculentum_E-LCY	-HDAQSLEAKYPTFLYAMPSPTRVFEEETCLASKDAMPFDLLKMLRLNLTGLVRIKE	350
A. thaliana_E-LCY	-EKVRSLEAEYPTFLYAMPMTKSRLEFEEETCLASKDVMPFDLLKTKMLRLDITGLIRILK	352
	: : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
C. annum_CCS	VLEEEKCVITMGGPLRIPQNVMAIGGTSIVHPS SGMVARSMALAPVLAELVESLGS	387
C. chinense_CCS	VLEEEKCVITMG-----	330
L. esculentum_B-LCY	IEDEHCLIPMGGPLPVLQPVVGGIGGTTAGMVPSTGYMVARTLAAAPVANAIIQYLGS	389
L. esculentum_E-LCY	IYEEWSYIPVGGSLPNTQKTLAFGAAASMVHPATGYSVVRSLSEAPKASVLANILRQ	410
A. thaliana_E-LCY	TYEEWSYIPVGGSLPNTQKNLAFGAAASMVHPATGYSVVRSLSEAPKYASVIAEILRE	412
	: . * : *	
C. annum_CCS	TRMIRGSQLYHR-----VWNLWPSDRRRVRECYCFGMETLLKLDLEGARRLFDAFFDV	441
C. chinense_CCS	TTSDSSKCYG-----	341
L. esculentum_B-LCY	ERSHSGNELSTA-----VWKDLWPIERRRQREFFCGMDILLKLDLPATRRFFDAFFDL	443
L. esculentum_E-LCY	HYSKNMLTSSSIPSIQTQAWNTLWPQERKRQRSFPLFGLALILQLDIEGIRSFRAFRRV	470
A. thaliana_E-LCY	ETTKQINSN-----ISRQAWDTLWPPERKRQRAFFLFGALALIVQFDTEGIRSFRTFFRL	467
C. annum_CCS	DPKYWHGFLSSRLSVKELAVLSLYLFGHASNLARLDIVTKCTVPLVKLLGNLAIESL	498
C. chinense_CCS	---YWDPRDSSIV-----	353
L. esculentum_B-LCY	EPRYWHGFLSSRLFLPELIVFGLSLFASHASNTSRFEIMTKGTVPLVNMNNLLQDKE	500
L. esculentum_E-LCY	PKWMWQGFGLSSLSADLMLFAFYMFIIAPNDRKGLIRHLLSDPTGATLIRTYLTF	527
A. thaliana_E-LCY	PKWMWQGFGLGSLTSGDLVLFALYMFVISPNNLRKGLINHLISDPTGATMIKTYLKV	524
	* . * . *	

Figura 2.21 Alineamiento de secuencias de a.a. de CCS, β -LCY y ϵ -LCY de diferentes especies. La secuencia del gen CCS de *C. chinense* Jacq. se encuentra resaltada en color verde. La línea morada representa el motivo de unión a FAD. La línea azul representa el motivo I y la línea naranja representa el motivo II. CCS de *C. annum* (ADH04290.1), ϵ -LCY de *A. thaliana* (AED96836.1) y β -LCY de *L. esculentum* (CAA60170.1) y ϵ -LCY de *L. esculentum* (ACB28618.1).

2.4 DISCUSIÓN

En lo que se refiere a los genes β -LCY y ϵ -LCY, se lograron visualizar varios productos inespecíficos dentro de los que se encontraban los fragmentos esperados de 210 pb y 135 pb, respectivamente. Por este motivo, se decidió darle seguimiento a los genes CCS y ZDS.

Para la amplificación del fragmento del gen ZDS se utilizó la combinación 3: ZDS-F2 y ZDS-R2 y se observó una banda característica de 460 pb correspondiente al tamaño esperado. Este fragmento se purificó para posteriormente secuenciar y se obtuvo un 98% de similitud con secuencias reportadas de *C. annuum* y *S. lycopersicum*, sin embargo, no se tiene aún la secuencia completa de ZDS por lo que sería recomendable aislar los extremos de la secuencia para obtenerla completamente.

Posterior a su secuenciación, se diseñaron los cebadores para su análisis por RT-PCR en tiempo real pero antes se probaron por amplificación por PCR punto final (anexo). Los resultados que se obtuvieron fueron satisfactorios ya que con las cuatro combinaciones de cebadores y con todos los ADNc utilizados se lograron obtener los tamaños esperados del fragmento. Estos resultados son comparables en tomate (*L. esculentum*) en los que se observó la expresión del gen ZDS en todos los estados de maduración del fruto (Namitha *et al.*, 2011).

Posteriormente, se decidió escoger como única combinación para el análisis por PCR punto final el par ZDS-F3 y ZDS-R3 y el ADNc de chile habanero rojo maduro (Rf). El resultado de la PCR punto final amplificó un producto correspondiente al tamaño esperado de 264 pb, por lo que estos resultados se pueden comparar con los reportados en manzana, en los cuales la expresión del gen ZDS se hizo presente en los seis cultivares maduros de manzana (Ampomah *et al.*, 2012). Otro trabajo con el que se puede comparar este resultado es el reportado en níspero japonés (*Eriobotrya japonica*) en el cual analizan la expresión del gen ZDS tanto en la cáscara como en la pulpa del fruto y observan que el gen ZDS se expresó a diferentes niveles en los dos cultivares y en las seis etapas del desarrollo del fruto (Fu *et al.*, 2011).

De igual manera, en plantas ornamentales como *Ipomoea* se ha estudiado la expresión de varios genes de carotenoides y se encontró que la expresión de *ZDS* estuvo presente a diferentes niveles en los cuatro cultivares de *Ipomoea* y en las cuatro etapas de desarrollo de los pétalos de la flor (Yamamizo et al., 2010). Por último, en estudios de expresión de genes de biosíntesis de carotenoides realizados en zanahoria, se observaron diferentes niveles de expresión del gen *ZDS* en todas las etapas de desarrollo y en los cuatro cultivares de zanahoria (Clotault et al., 2008).

En general, podemos observar que la expresión de *ZDS* en las diferentes especies estuvo presente en todos los tejidos analizados al igual que en *C. chinense*.

Con las diferentes combinaciones de los cebadores para *CCS* por PCR punto final se pudieron observar productos inespecíficos, sin embargo, para la combinación 3: *CCS-F2* y *CCS-R2* se observó una banda de 50 pb correspondiente al tamaño esperado. Debido a que esta banda se visualizó de manera muy tenue, se decidió repetir la reacción de PCR pero utilizando ADNc de pericarpio de chile habanero en estado maduro ya que Ha Sun-Hwa y colaboradores (2007) mencionan que los chiles rojos y los chiles maduros acumulan altos niveles de capsantina y expresión del gen *CCS*. Se logró observar una banda más intensa y el producto de PCR purificado de *CchCCS-1* correspondiente a un tamaño de 50 pb se secuenció. Los resultados mostraron que no tuvo similitud con otras *CCS* de especies diferentes, esto pudiera deberse a que la secuencia fue muy corta y por ello no presentó similitud con otras secuencias. Por este motivo se decidió aislar un nuevo fragmento del gen *CCS* con nuevos cebadores y se logró obtener un tamaño esperado de 1494 pb, este resultado se corroboró con los reportados por Guzmán y colaboradores (2011) en el cual amplificaron un producto de 1495 pb correspondiente a 499 aminoácidos y que no contiene intrones. Este fragmento se purificó para posteriormente secuenciar y se obtuvo un 99% de similitud con secuencias reportadas de diferentes especies de *C. annuum*. De igual manera, sería recomendable aislar los extremos de la secuencia de *CCS* para obtenerla completamente.

BIBLIOGRAFÍA

Ampomah C, Dejnopratt S, Lewis D, Sutherland P, Volz R, Allan A. (2012) Metabolic and gene expression analysis of apple (*Malus x domestica*) carotenogenesis. *J. Exp. Bot.* 63: 4497-4511.

Ávila J, Hernández C, Martín P. (1995) Análisis del DNA. II: Clonar, secuenciar y PCR. *Nefrología*. Vol. 15: 31-43.

Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single Step Method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol-Chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.

Cloutault J, Peltier D, Berruyer R, Thomas M, Briard M, Geoffriau E. (2008) Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *J. Exp. Bot.* 59: 3563-3573.

Cunningham F, Sun Z, Chamovitz D, Hirschberg J, Gantt E. (1994) Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp strain PCC7942. *Plant C.* 6: 1107-1121.

Fu X, Kong W, Peng G, Zhou J, Azam M, Xu C, Grierson D, Chen K. (2012) Plastid structure and carotenogenic gene expression in red- and white- fleshed loquat (*Eriobotrya japonica*) fruits. *J. Exp. Bot.* 63: 341-354.

García, V. (2008) Evolución de compuestos funcionales durante la maduración de frutos de *Opuntia stricta*. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica de Cartagena. 92 p.

Gómez Uc, E. (2006) Clonación de genes expresados durante la inducción de sistemas de defensa en callos de *Cocos nucifera* L. tratados con quitosano. Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de Mérida. p.p. 83, Mérida, Yucatán, México.

Guzmán I, Hamby S, Romero J, Bosland P, O'Connell M. (2011). Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. *Plant Sci.* 179: 49-59.

Ha S, Kim J, Park J, Lee S, Cho K. (2007). A comparison of the accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin- capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *J. Exp. Bot.* 58: 3135-3144.

Matthews P, Luo R, Wurtzel E. (2003) Maize phytoene desaturase and zeta-carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *J. Exp. Bot.* 54 (391): 2215-2230.

Namitha K, Archana S, Negi P.(2011) Expression of carotenoid biosynthetic pathway genes and changes in carotenoid during ripening in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Food Func.* 2: 168-173.

Saijo T. and Tanaka K. (1995) Isoalloxazin ring of FAD is required for the formation of the core in the Hsp60 assisted folding of medium chain acyl-CoA dehydrogenase subunit into the assembly competent conformation in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 270: 1899-1907.

Simonne A, Green N, Bransby D. (1996) Consumer acceptability and β -carotene content of beef as related to cattle finishing diets. *J. Food Sci.* 61: 1254-1256.

Yamamizo C, Kishimoto S, Ohmiya A. (2010) Carotenoid composition and carotenogenic gene expression during *Ipomoea* petal development. *J. Exp. Bot.* 61: 709-719.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL ADNc PARCIAL DE ZDS POR RT-PCR EN TIEMPO REAL

3.1 INTRODUCCIÓN

Hasta el momento, no se tienen reportes acerca del patrón de expresión de ZDS en frutos en el género *Capsicum*, sin embargo, se tienen algunos reportes del análisis de expresión de ZDS en otras especies.

En los sacos de jugo de frutos de mandarina, la expresión de ZDS, que participa en la producción de β - β xantofilas, condujo a la acumulación de β - criptoxantina durante la etapa madura (Kato *et al.*, 2004).

Durante la maduración de tomate, se observó que el nivel transcripcional de ZDS incrementó, sugiriendo una respuesta por la acumulación de licopeno en las tres primeras etapas tempranas de maduración. La acumulación de licopeno coincidió con la alta regulación de ZDS (Namitha *et al.*, 2011).

En frutos de níspero japonés, la expresión de ZDS se presentó en todas las etapas de maduración del fruto variando su expresión en la cáscara y en la pulpa. En la cáscara de los frutos, en las tres primeras etapas de maduración fue menor la expresión de ZDS incrementándose en la cuarta etapa, volviendo a disminuir en la etapa de maduración cinco y seis (Fu *et al.*, 2012).

En frutos de kiwi, la expresión de ZDS, mostró variación en las 4 etapas de maduración evaluadas. La expresión de ZDS fue muy elevada en la etapa 1, disminuyó en la etapa 2, volvió a incrementarse en la etapa 3 y finalmente, en la etapa 4, volvió a disminuir esta expresión (Dwamena *et al.*, 2009).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

Para el análisis por RT-PCR en tiempo real se empleó el ADNc proveniente del ARN de los dos morfotipos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.): rojo y naranja, en sus seis estados de maduración identificados de la letra “a” a la “f” correspondientes a 2, 4, 8, 15-17, 30 y 35-40 días después de la completa floración y el ADNc de hojas jóvenes de estos dos morfotipos de chile habanero como otro tejido para analizar.

3.2.2. Amplificación para ZDS

Componente	Cantidad (1X)
Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG	12 µl
Cebador directo (10 µM)	0.6 µl
Cebador reverso (10 µM)	0.6 µl
ADNc	1 µl
H ₂ O	Hasta 18 µl
Volumen final	18 µl

Programa de reacción para ZDS

50°C 2 minutos

95°C 1 minuto

95°C 30 segundos	} 35 X
62°C 30 segundos	

20°C infinito

3.2.3 Análisis de la expresión génica

Para analizar los niveles de expresión del gen *ZDS* se hizo una cuantificación relativa de la expresión de este gen, empleando una curva estándar o de eficiencia. En esta metodología se utilizan muestras de concentración conocida de ADNc para construir una curva de eficiencia que se emplea como referencia en la cuantificación de la expresión del gen *ZDS*.

Se utilizó el gen ARNr 18S como gen de referencia para normalizar los valores. El gen de referencia 18S se define como una señal activa de amplificación para normalizar las diferencias de la cantidad de ADNc adicionado a cada reacción. Los genes utilizados como referencia son genes que son constantemente expresados de manera basal en todas las células de los tejidos en una misma cantidad.

La escala relativa de cuantificación se construyó normalizando los valores de la fluorescencia del gen *ZDS* con el valor de la fluorescencia del gen 18S, ya que el producto amplificado puede ser estimado en cualquier punto por la cantidad de fluorescencia emitida por reactivos comerciales como SYBR Green I (Muller *et al.*, 2002).



3.3 RESULTADOS

3.3.1 Obtención del material vegetal

Se cosecharon frutos naranjas y rojos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en seis estados de desarrollo. Los frutos de chile habanero del morfotipo naranja del estado de desarrollo 1 presentaron un color verde intenso y un tamaño de 1cm de largo por 0.5 cm de ancho, los frutos del estado de desarrollo 2 presentaron un color verde intenso y un tamaño de 1.5 cm de largo por 1 cm de ancho, los frutos del estado de desarrollo 3 presentaron un color verde intenso y un tamaño de 2 cm de largo por 1.5 cm de ancho, los frutos del estado de desarrollo 4 presentaron un color verde bajo y un tamaño de 3 cm de largo por 2.5 cm de ancho, los frutos del estado de desarrollo 5 presentaron un color entre verde/ naranja y un tamaño de 4 cm de largo por 3 cm de ancho y los frutos del estado de desarrollo 6 presentaron un color naranja y un tamaño de 4 cm de largo por 3 cm de ancho (figura 3.1).



Figura 3.1. Obtención de frutos del morfotipo naranja de *Capsicum chinense* Jacq. 1: Chile habanero de 2 días después de la completa floración, 2: Chile habanero de 4 días después de la completa floración, 3: Chile habanero de 8 días después de la completa floración, 4: Chile habanero de 15-17 días después de la completa floración, 5: Chile habanero de 30 días después de la completa floración, 6: Chile habanero de 35-40 días después de la completa floración.

Los frutos de chile habanero del morfotipo rojo del estado de desarrollo 1 presentaron un color verde bajo y un tamaño de 1 cm de largo por 0.8 cm de ancho, los frutos del estado de desarrollo 2 presentaron un color verde bajo y un tamaño de 1.5 cm de largo por 1 cm de ancho, los frutos del estado de desarrollo 3 presentaron un color verde bajo y un tamaño de 2.5 cm de largo por 1.5 cm de ancho, los frutos del estado de desarrollo 4 presentaron un color verde bajo y un tamaño de 3.5 cm de largo por 3 cm de ancho, los frutos del estado de desarrollo 5 presentaron un color entre verde/ rojo y un tamaño de 4.5 cm de largo por 4 cm de ancho y los frutos del estado de desarrollo 6 presentaron un color rojo y un tamaño de 4.5 cm de largo por 4 cm de ancho (figura 3.2).

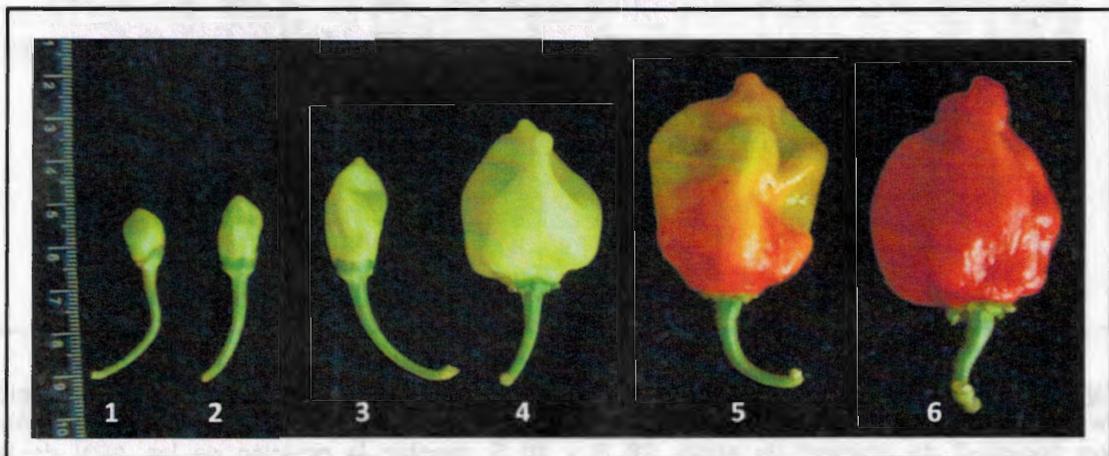


Figura 3.2. Obtención de frutos del morfotipo rojo de *Capsicum chinense* Jacq. 1: Chile habanero de 2 días después de la completa floración, 2: Chile habanero después de la completa floración, 3: Chile habanero de 8 días después de la completa floración, 4: Chile habanero de 15-17 días después de la completa floración, 5: Chile habanero de 30 días después de la completa floración, 6: Chile habanero de 35-40 días después de la completa floración.

3.3.2 Extracción de ARN de pericarpio de chile habanero

Se realizó la extracción de ARN de pericarpio de los 2 morfotipos de chile habanero en sus seis estados de desarrollo o maduración. En la figura 3.3 se muestra el fraccionamiento del ARN total en la que se puede notar una buena calidad del mismo.

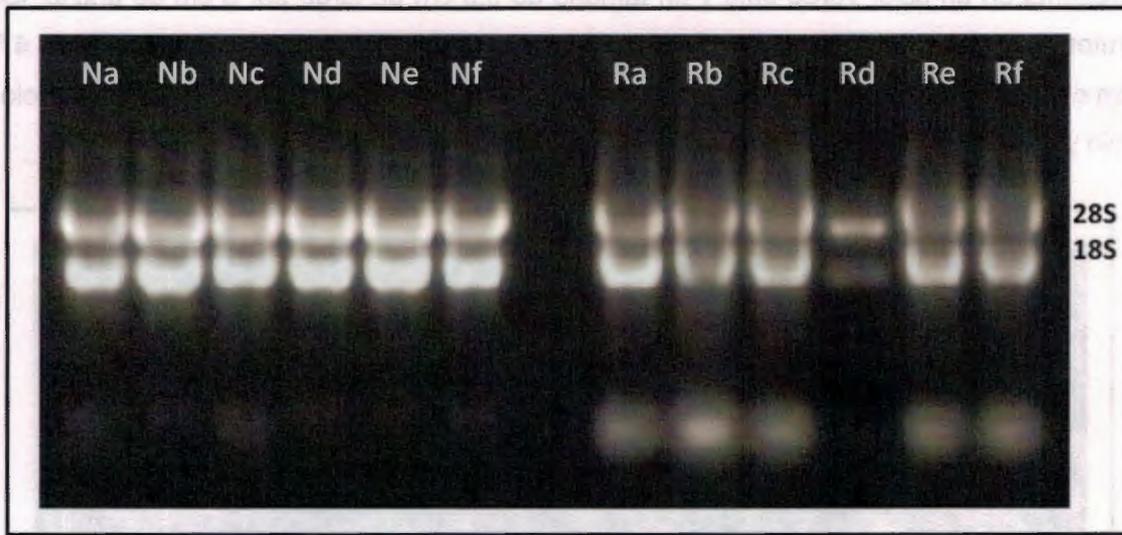


Figura 3.3 RNA de pericarpio de chile habanero. Muestras de dos microlitros de ARN extraído de diferentes muestras fueron fraccionadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%, teñido con $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. 28 S y 18 S denotan la posición de los ARN de las subunidades ribosomales. Na, Nb, Nc, Nd, Ne y Nf: Estados de maduración 1, 2, 3, 4, 5, y 6 del morfotipo naranja, respectivamente. Ra, Rb, Rc, Rd, Re y Rf: Estados de maduración 1, 2, 3, 4, 5, y 6 del morfotipo rojo, respectivamente.

3.3.3 Amplificación de los ADN complementarios

Se sintetizó ADNc de primera cadena (figura 3.4) y se observó una buena calidad del mismo.

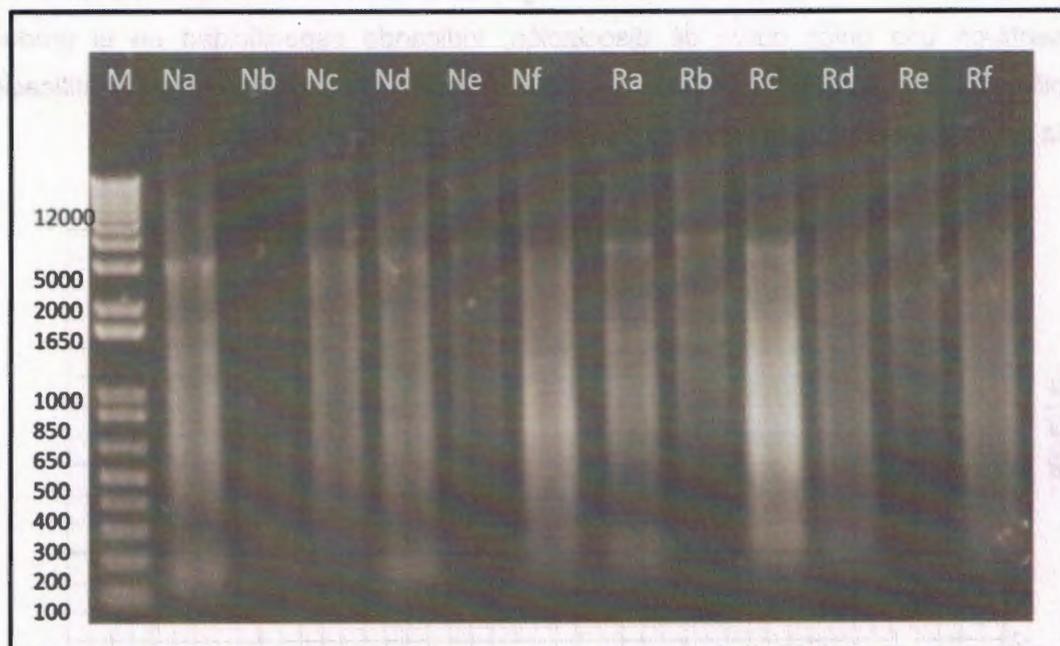


Figura 3.4 Síntesis de ADNc. Muestras de 8 microlitros de ADN complementario fueron fraccionadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1 teñido con $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen). Na, Nb, Nc, Nd, Ne y Nf: Estados de maduración 1, 2, 3, 4, 5, y 6 del morfortipo naranja, respectivamente. Ra, Rb, Rc, Rd, Re y Rf: Estados de maduración 1, 2, 3, 4, 5, y 6 del morfortipo rojo, respectivamente.

3.3.4 Amplificación de las muestras por RT-PCR Tiempo real

Se obtuvo amplificación en tiempo real de CchZDS. El gen ARNr 18S utilizado como referencia también mostró amplificación cuantificable, por lo que se pudo utilizar como normalizador en la cuantificación relativa del gen ZDS. Estos dos (CchZDS-1 y ARNr 18S) presentaron una única curva de disociación, indicando especificidad en el producto amplificado, lo que asegura un buen nivel de confiabilidad en los datos de cuantificación. En la figura 3.5 se ilustra la curva de disociación de ZDS y ARNr 18S.

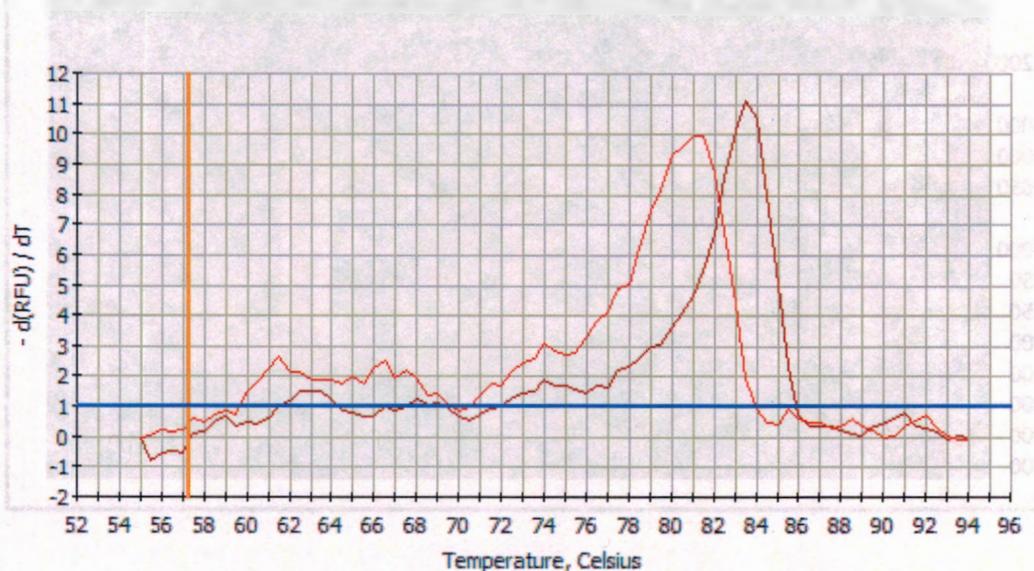


Figura 3.5 Curva de disociación de los genes ZDS y ARNr 18S. En la imagen se aprecia un solo pico para los genes ZDS (rojo) y 18S (café) por lo que se infiere que hubo amplificación de un solo producto específico.

Por otro lado, se realizó la curva estándar o de eficiencia para CchZDS-1 para la cual se emplearon muestras estándar o muestras con concentración conocida de ADNc. En expresión génica, se emplean diluciones seriadas de un ADNc de concentración conocida. En este caso se hicieron cinco diluciones (1:5) ó (50ng/μl:250ng/μl). Las eficiencias de la PCR en tiempo real se calculan a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR en tiempo real (Pfaffl, 2004) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$E=10[-1/\text{slope}]-1$$

Donde: E= eficiencia y slope= pendiente.

Es importante mencionar que la eficiencia de la PCR en tiempo real es la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de ADN o ADNc en cada ciclo (Bustin y Nolan, 2004). Para confiar en los resultados de la cuantificación, se recomienda un rango de eficiencia de amplificación entre 95- 105%. En este trabajo se obtuvo una eficiencia de 95.1%, la cual es proporcionada por el equipo de tiempo real, indicando una eficiente confiabilidad y reproducibilidad de los resultados (figura 3.6).

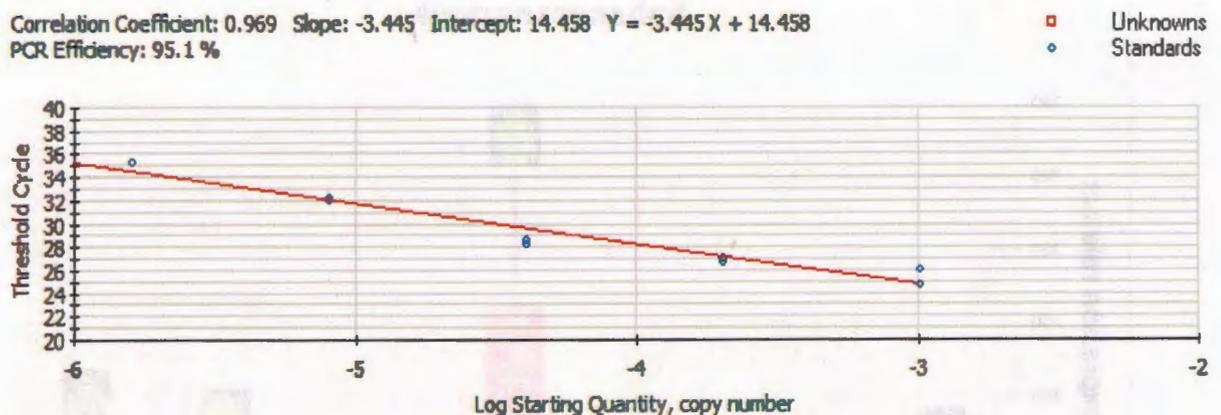


Figura 3.6. Curva estándar o de eficiencia del gen ZDS. Los resultados mostraron un 95.1% de la eficiencia de la amplificación del gen ZDS.

Posteriormente, se llevaron a cabo las amplificaciones por PCR tiempo real, en las figuras 3.7 y 3.8 se resumen los análisis de expresión de ZDS en el morfotipo de chile habanero naranja y rojo y en los diferentes tejidos analizados, respectivamente.

En el morfotipo naranja, la expresión de CchZDS-1 se presentó en todos los estados de desarrollo del fruto y en las hojas jóvenes de chile habanero siendo mayor su expresión en frutos con 15-17 días después de la completa floración. Los niveles de expresión en los frutos con 4, 8 y 30 días después de la completa floración, fueron menores comparados con los frutos con 2, 15-17 y 35-40 días después de la completa floración y con hojas jóvenes de chile habanero (figura 3.7).

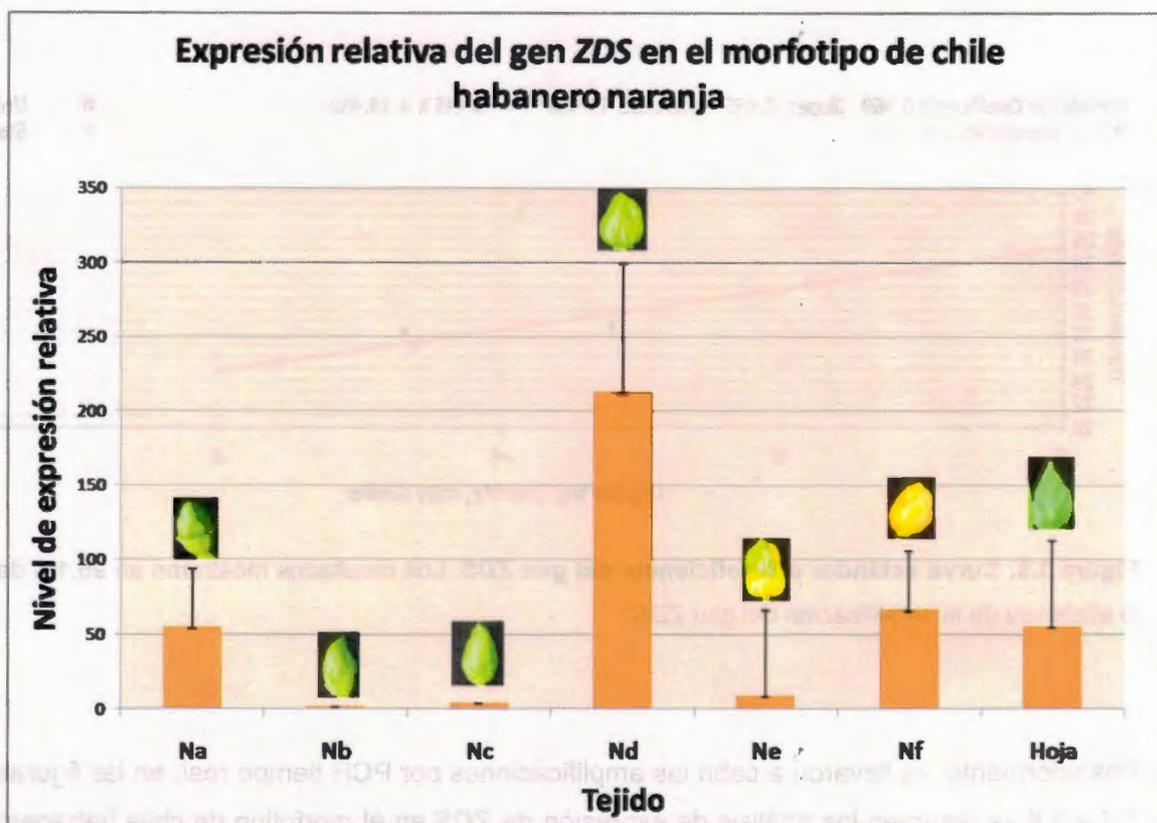


Figura 3.7 Expresión relativa del gen ZDS en el morfotipo de chile habanero naranja. Na: Chile habanero de 2 días después de la completa floración, Nb: Chile habanero de 4 días después de la completa floración, Nc: Chile habanero de 8 días después de la completa floración, Nd: Chile habanero de 15-17 días después de la completa floración, Ne: Chile habanero de 30 días después de la completa floración, Nf: Chile habanero de 35-40 días después de la completa floración y hoja joven de chile habanero.

De igual manera, se analizó el nivel de expresión de CchZDS-1 en el morfotipo rojo y se observó que estuvo presente en todos los estados de desarrollo del fruto y en las hojas jóvenes de chile habanero siendo mayor su expresión en frutos con 30 días después de la completa floración. Los niveles de expresión en los frutos con 2, 8, 15-17 y 35-40 días después de la completa floración fueron menores comparados con los frutos con 4 y 30 días después de la completa floración y con hojas jóvenes de chile habanero (figura 3.8).

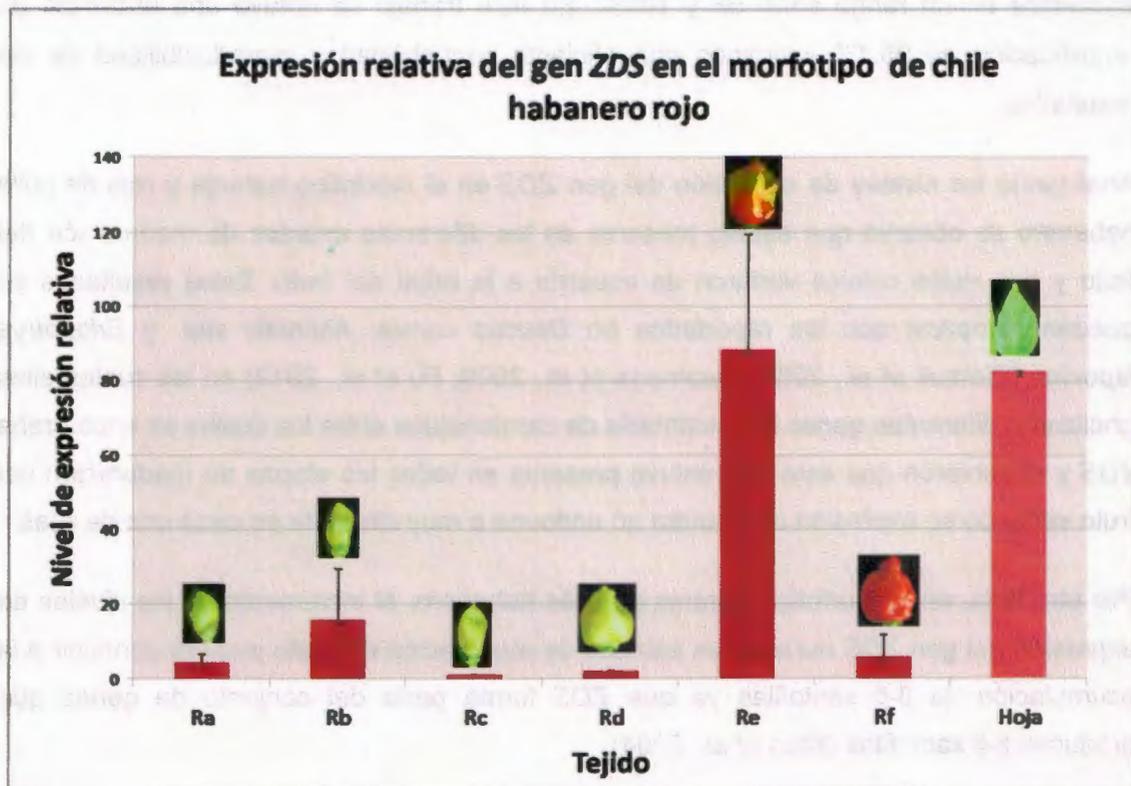


Figura 3.8 Expresión relativa del gen ZDS en el morfotipo de chile habanero rojo. Ra: Chile habanero de 2 días después de la completa floración, Rb: Chile habanero de 4 días después de la completa floración, Rc: Chile habanero de 8 días después de la completa floración, Rd: Chile habanero de 15-17 días después de la completa floración, Re: Chile habanero de 30 días después de la completa floración, Rf: Chile habanero de 35-40 días después de la completa floración y hoja joven de chile habanero.

3.4 DISCUSIÓN

Como pudo observarse en los resultados, la curva de disociación para *ZDS* indicó especificidad de un solo producto amplificado, lo que asegura un buen nivel de confiabilidad en los datos de cuantificación.

Por otro lado, se realizó la curva estándar o de eficiencia la cual se recomienda que se encuentre en un rango entre 95 y 105%. En este trabajo se obtuvo una eficiencia de amplificación de 95.1% indicando una eficiente confiabilidad y reproducibilidad de los resultados.

Analizando los niveles de expresión del gen *ZDS* en el morfotipo naranja y rojo de chile habanero se observó que estuvo presente en los diferentes estados de maduración del fruto y que estos niveles variaron de acuerdo a la edad del fruto. Estos resultados se pueden comparar con los reportados en *Daucus carota*, *Actinidia* spp. y *Eriobotrya japonica* (Clotault *et al.*, 2008; Dwamena *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2012) en los cuales ellos analizaron diferentes genes de biosíntesis de carotenoides entre los cuales se encontraba *ZDS* y observaron que este gen estuvo presente en todas las etapas de maduración del fruto variando su expresión de manera no uniforme o muy diferente en cada una de ellas.

Por otro lado, en el morfotipo naranja de chile habanero, el incremento de los niveles de expresión del gen *ZDS* durante los estados de maduración del fruto pudiera conducir a la acumulación de β - β xantofilas ya que *ZDS* forma parte del conjunto de genes que producen β - β xantofilas (Kato *et al.*, 2004).

En el morfotipo rojo de chile habanero, el nivel de expresión de *ZDS* disminuyó en el fruto maduro por lo que esta baja expresión sugiere que podrían existir elevados niveles de expresión del gen *CCS* y por lo tanto una elevada acumulación de capsantina según los reportes realizados en chiles rojos (Bouvier *et al.*, 1994). De igual manera, la expresión de *ZDS* en todos los estados de maduración del fruto pudiera llevar a la acumulación de β - β carotenoides (β - caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina y violaxantina) (Fu *et al.*, 2012).

En la cuantificación de carotenoides en los frutos de color naranja en estado maduro a 450 nm se observó que no muestran la presencia de β -caroteno en comparación con la muestra de color rojo pero si tienen un rango variable de otros carotenoides. En los frutos rojos maduros se detectó la presencia del carotenoide β -criptoxantina y de dos carotenoides a 15.49 min y 21.9 min ausentes en los frutos naranja. Estos resultados se pueden comparar con los reportados en chiles rojos maduros (*C. annuum* cultivar Dove) en los cuales se presentó el carotenoide β -criptoxantina (Guzmán *et al.*, 2011).

El carotenoide más abundante en los chiles maduros (etapa 6) rojos fue β -criptoxantina y β -caroteno, sin embargo, para los chiles maduros naranjas (etapa 6) solo se sabe que hay un rango variable de otros carotenoides pero no se sabe cuáles son. Por otro lado, no se llevó a cabo la cuantificación de los carotenoides en los chiles pertenecientes a los estados de desarrollo 1 al 5 por lo que esto limita para hacer un diagrama comparativo por cada estado de desarrollo.

En el caso de las hojas jóvenes de chile habanero de los morfotipos naranja y rojo, el nivel de expresión de *ZDS* fue elevado, lo cual no ha sido reportado para otras especies, sin embargo, en hojas de plantas de achiote (*Bixa orellana*) reportan altos niveles de expresión de β -*LCY* y ϵ -*LCY* sugiriendo que estos pudieran estar participando en la acumulación de pigmentos fotosintéticos (Rodríguez *et al.*, 2011). Esto nos indica que muy probablemente *ZDS* por formar parte de la biosíntesis de carotenoides también esté implicado en la acumulación de pigmentos fotosintéticos.

BIBLIOGRAFÍA

Bouvier F, Hugueney P, d'Harlingue A, Kuntz M, Camara B. (1994) Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5, 6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant J.* 6: 45–54.

Bustin, S. (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocr.* 29: 23–39.

Bustin S. y Nolan T. (2004) Analysis of mRNA Expression by Real-Time PCR. In: *Real-Time PCR; An Essential Guide*. K.J. Edwards et al., editors. Horizon Bioscience. Wymondham, 125-184.

Bustin S, Benes V, Nolan T, Pfaffl M. (2005) Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J. Mol. Endocr.* 34: 597–601.

Clotault J, Peltier D, Berruyer R, Thomas M, Briard M, Geoffriau E. (2008) Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *J. Exp. Bot.* 59: 3563-3573.

Dwamena C, Mc Ghie T, Wibisono R, Montefiori M, Hellens R, Allan A. (2009) The kiwifruit lycopene beta- cyclase plays a significant role in carotenoid accumulation in fruit. *J. Exp.* 60: 3765-3779.

Fu X, Kong W, Peng G, Zhou J, Azam M, Xu C, Grierson D, Chen K. (2012) Plastid structure and carotenogenic gene expression in red- and white- fleshed loquat (*Eriobotrya japonica*) fruits. *J. Exp. Bot.* 63: 341-354.

Ginzinger D. (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hemat.* 30: 503–512.

Guzmán I, Hamby S, Romero J, Bosland P, O' Connell M. (2011). Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. *Plant Sci.* 179: 49-59.

Kato M, Ikoma Y, Matsumo H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M. (2004) Accumulation of carotenoid and expression of carotenoid biosynthesis genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol.* 143: 824-837.

Namitha K, Archana S, Negi P.(2011) Expression of carotenoid biosynthetic pathway genes and changes in carotenoid during ripening in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Food Func. 2: 168-173.

Muller P, Janovajak H, Miserey A, Dobbie Z. (2002) Processing of gene expression data general by quantitative Real- Time PCR. Biotechniques. 32: 1-7.

Pfaffl M. (2004) Quantification Strategies in Real-Time PCR. In: A-Z of Quantitative PCR S.A.Bustin, editor. International University Line. La Jolla, 87-120.

Rodríguez N, Narváez J, Aguilar M, Rivera M. (2011) Regulation of pigment- related genes during flower and fruit development of *Bixa orellana*. Plant Mol. Bio. Rep. 29: 43:50.



CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 CONCLUSIONES

En lo que se refiere a los genes β -LCY y ϵ -LCY, se lograron visualizar varios productos inespecíficos dentro de los que se encontraban los fragmentos esperados de 210 pb y 135 pb, respectivamente. Por este motivo, se decidió darle seguimiento a los genes CCS y ZDS.

El fragmento esperado del CchZDS-1 de *C. chinense* Jacq. fue aislado y el resultado obtenido de la secuenciación mostró un 98% de identidad con otras ZDS de *C. annuum* y *S. lycopersicum*.

Se diseñaron los cebadores para el análisis por RT-PCR en tiempo real del gen ZDS y se probaron antes por PCR punto final (anexo) obteniéndose los tamaños esperados de los fragmentos como los reportados por Namitha y colaboradores (2011), en cual ellos analizan la expresión de varios genes de biosíntesis de carotenoides en tomate (*Lycopersicon esculentum*) y detectan que los niveles de expresión del gen ZDS estuvo presente en todos los estados de maduración del fruto.

Analizando los niveles de expresión del gen ZDS por RT-PCR en tiempo real en los morfotipos naranja y rojo de chile habanero se observó que estuvo presente en los diferentes estados de maduración del fruto y que estos niveles variaron de manera no uniforme de acuerdo a los días de la completa floración.

En el morfotipo naranja de chile habanero, el incremento de los niveles de expresión del gen ZDS durante los estados de maduración del fruto pudiera conducir a la acumulación de β - β xantofilas ya que ZDS forma parte del conjunto de genes que producen β - β xantofilas (Kato *et al.*, 2004).

En el morfotipo rojo de chile habanero, el nivel de expresión de *ZDS* disminuyó en el fruto maduro por lo que esta baja expresión sugiere que podrían existir elevados niveles de expresión del gen *CCS* y por lo tanto una elevada acumulación de capsantina según los reportes realizados en chiles rojos (Bouvier *et al.*, 1994).

En el caso de las hojas jóvenes de chile habanero del morfotipo naranja y rojo, el nivel de expresión de *ZDS* fue elevado, lo cual no ha sido reportado para otras especies.

El carotenoide más abundante en los chiles maduros (etapa 6) rojos fue β -criptoxantina y β -caroteno, sin embargo, para los chiles maduros naranjas (etapa 6) solo se sabe que hay un rango variable de otros carotenoides pero no se sabe cuáles son. Por otro lado, no se llevó a cabo la cuantificación de los carotenoides en los chiles pertenecientes a los estados de desarrollo 1 al 5 por lo que esto limita para hacer un diagrama comparativo por cada estado de desarrollo.

Se aisló un nuevo fragmento del gen *CCS* con nuevos cebadores y se logró obtener un tamaño esperado de 1495 pb, este resultado se corroboró con los reportados por Guzmán y colaboradores (2011) en el cual amplificaron un producto de 1495 pb correspondiente a 499 aminoácidos y que no contiene intrones.

El fragmento esperado del gen *CCS* de *Capsicum chinense* Jacq. fué aislado y el resultado obtenido de la secuenciación mostró un 99% de similitud con secuencias reportadas de diferentes especies de *Capsicum annuum*.

De forma general, este trabajo aportó información sobre los niveles de expresión de *ZDS* en frutos de chile habanero naranja y rojo. En el morfotipo naranja, el nivel de expresión de este gen es mayor en los primeros estados de maduración que en el estado maduro del fruto, sin embargo, no existe una tendencia uniforme en los niveles de expresión del gen. Por otro lado, en el morfotipo rojo, existe un bajo nivel de expresión de *ZDS* en los 4 primeros estados de desarrollo mientras que en el estado 5 aumenta notablemente, sin embargo, en el estado maduro del fruto o estado de desarrollo 6, vuelve a disminuir.

Es muy interesante observar elevados niveles de expresión de *ZDS* en hojas de chile habanero de los morfotipos naranja y rojo, por lo que es muy probable que *ZDS* esté implicado en la acumulación de pigmentos fotosintéticos en tejido foliar.

4.2 PERSPECTIVAS

Para los genes β -LCY y ϵ -LCY se obtuvieron varios productos inespecíficos por lo que sería recomendable purificar el fragmento correspondiente al tamaño esperado para su posterior secuenciación.

La expresión por RT-PCR en tiempo real de los genes CCS, β -LCY y ϵ -LCY ayudaría a conocer mejor el comportamiento de la expresión de estos genes de biosíntesis de carotenoides en la especie *Capsicum chinense* Jacq. De igual manera, la cuantificación de compuestos carotenoides en estos dos morfotipos de chile habanero aportarían parte del conocimiento necesario para entender la relación que pudiera existir entre la expresión de genes de biosíntesis de carotenoides y la cuantificación de los pigmentos carotenoides.

El análisis bioinformático de los genes ZDS y CCS demostró que son secuencias incompletas por lo que sería conveniente obtener los extremos de los genes mediante la técnica RACE.

Con base a los resultados obtenidos en este trabajo, se propone al chile habanero como una fuente de pigmentos naturales, ya que como se pudo observar, en frutos maduros de chiles pertenecientes al morfotipo rojo se encontró la presencia de β -criptoxantina y que en los frutos naranjas existe una gran cantidad de otros pigmentos carotenoides.

La expresión de ZDS en los dos morfotipos nos indica que muy probablemente se está sintetizando un nivel bajo de licopeno en las primeras etapas de maduración del fruto pero no en el estado maduro ya que ni en frutos naranja ni rojos se detectó la presencia de licopeno en el último estado de maduración del fruto. Posiblemente, en los frutos maduros del morfotipo rojo, pudiesen existir elevados niveles de expresión de CCS que pudieran estar relacionados con niveles altos de capsantina y capsorrubina. Sin embargo, esto no se puede afirmar hasta que se lleven a cabo sus respectivos análisis de cuantificación de carotenoides y expresión de CCS. De esta manera, se tendrían disponibles morfotipos de chile habanero con un alto potencial para la industria de colorantes o para los fines que se deseen.

De igual forma, sería interesante realizar un diagrama que ilustrará en que etapas de desarrollo del fruto de chile ocurren los cambios en la expresión de los genes *ZDS*, *CCS*, *β-LCY* y *ε-LCY* y la relación que existe con la acumulación de los carotenoides, sin embargo, por ahora este comportamiento no se puede analizar hasta obtener la expresión de estos cuatro genes y la cuantificación de carotenoides en las seis etapas de desarrollo del fruto de chile habanero.

En general, los objetivos del trabajo quedaron inconclusos, quedando por realizar el aislamiento de los ADNc parciales correspondientes a *β-LCY* y *ε-LCY* para su posterior clonación y secuenciación. De igual manera, falta conocer el patrón de expresión de *CCS*, *β-LCY* y *ε-LCY* en los dos morfotipos de chile habanero.

BIBLIOGRAFÍA

Bouvier F, Hugueney P, d'Harlingue A, Kuntz M, Camara B. (1994) Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5, 6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant J.* 6: 45–54.

Guzmán I, Hamby S, Romero J, Bosland P, O'Connell M. (2011). Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. *Plant Sci.* 179: 49-59.

Kato M, Ikoma Y, Matsumo H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M. (2004) Accumulation of carotenoid and expression of carotenoid biosynthesis genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol.* 143: 824-837.

Namitha K, Archana S, Negi P.(2011) Expression of carotenoid biosynthetic pathway genes and changes in carotenoid during ripening in tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Food Func.* 2: 168-173.

ANEXO

En la figura A.1, se observan los tamaños esperados de los fragmento de *ZDS* de 264 pb y 117 pb, con la combinación 1 y 2, respectivamente. Sin embargo con la combinación 2, se puede ver otro producto amplificado además del esperado.

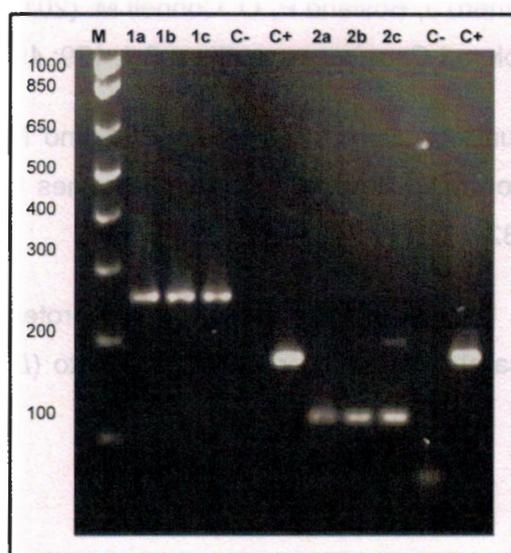


Figura A.1 Productos obtenidos con las combinaciones de cebadores para *ZDS*. 1a, 1b y 1c: Combinación 1: *ZDS*-F3 y *ZDS*-R3 con ADNc de chile habanero amarillo en los estados de desarrollo 4, 5 y 6, respectivamente. TEF: 264 pb. 2a, 2b y 2c: Combinación 2: *ZDS*-F2 y *ZDS*-R8 con ADNc de chile habanero amarillo en los estados de desarrollo 4, 5 y 6, respectivamente. TEF: 117 pb. T óptima: 64°C. C-: Control negativo. C+: Control positivo de ARNr 18S. M: Marcador de peso molecular 1 Kb.

En la figura A.2, se observan los tamaños esperados de los fragmentos de *ZDS* de 128 pb y 150 pb, con la combinación 3 y 4, respectivamente.

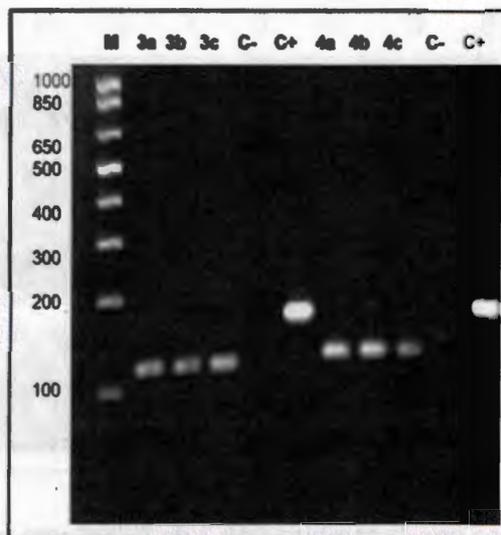


Figura A.2 Productos obtenidos con las combinaciones de cebadores para *ZDS*. 3a, 3b y 3c: Combinación 3: *ZDS*-F7 y *ZDS*-R3 con ADNc de chile habanero amarillo en los estados de desarrollo 4, 5 y 6, respectivamente. TEF: 128 pb. 4a, 4b y 4c: Combinación 4: *ZDS*-F8 y *ZDS*-R8 con ADNc de chile habanero amarillo en los estados de desarrollo 4, 5 y 6, respectivamente. TEF: 150 pb. T óptima: 64°C. C-: Control negativo. C+: Control positivo de ARNr 18S. M: Marcador de peso molecular 1 Kb.

Como se observaron algunos pocos productos inespecíficos con las combinaciones de cebadores para *ZDS*, se decidió trabajar únicamente con la combinación 1 de cebadores y por lo tanto se realizó otra PCR, en la cual se utilizó un gradiente de temperatura de 62°C a 68°C y se observó que a una temperatura de alineamiento de 62°C se obtenía una banda más intensa en comparación con las demás temperaturas (figura A.3) por lo que se decidió utilizar esa temperatura para la amplificación por RT-PCR en tiempo real de CchZDS-1.

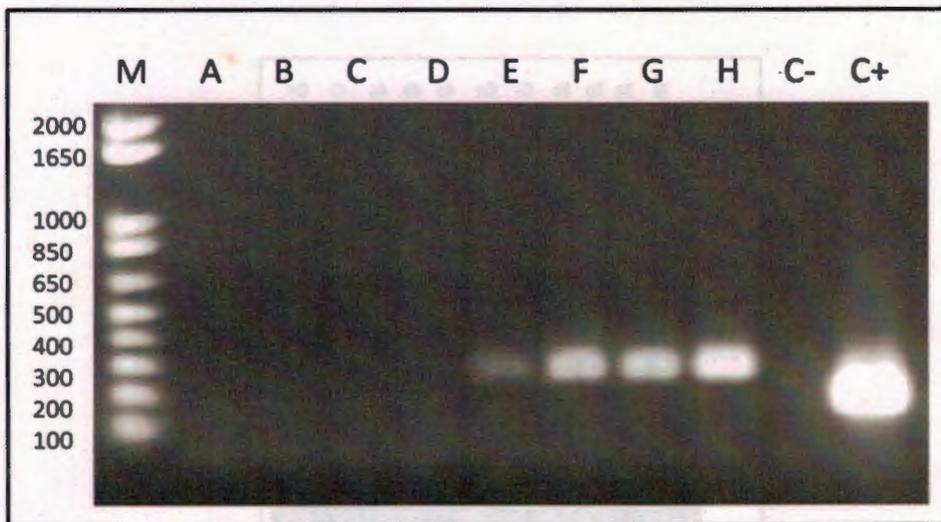


Figura A.3 Productos obtenidos con la combinación 3 de cebadores para ZDS. Los productos de PCR fueron fraccionados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% teñido con $1\mu\text{g. mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA Ladder de Invitrogen). Combinación de cebadores ZDS-F3 y ZDS- R3, gradiente de temperatura (62°C - 68°C) A= 68°C , B= 67.6°C , C= 66.8°C , D= 65.6°C , E= 64.2°C , F= 63.1°C , G= 62.4°C y H= 62°C . Tamaño esperado del fragmento: 264 pb. 9: Control negativo. 10: Control positivo de ARNr 18S.